



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

- PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL -

04-111388

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO

"COMPOSICION VACUNAL CONTRA LAS ALERGIAS, METODO PARA SU OBTENCION
Y EMPLEO EN EL TRATAMIENTO DE LAS MISMAS"

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

INSTITUTO FINLAY, CENTRO DE INVESTIGACION - PRODUCCION DE
VACUNAS Y SUEROS y CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS

DOMICILIO

Ave. 27 No. 19805 e/ 198 y 202, La Coronela, La Lisa. Ciudad
Habana 13500, CUBA y Carretera de Beltrán Km 1½, Bejucal, La
Habana 6048, CUBA

74. APODERADO

DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

22. BOGOTA, D.C.,

05-11-1994

(SS)

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I☒ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: INSTITUTO FINLAY. CENTRO DE INVESTIGACION - PRODUCCION DE VACUNAS Y SUEROS y CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS
Dirección: Ave. 27 No. 19805 e/ 198 y 202, La Coronela, La Lisa, Ciudad Habana 13500, CUBA y Carretera de Beltrán Km 11/2, Bejucal, La Habana 6048, CUBA
Nacionalidad o Domicilio: La Habana - CUBA
Lugar de Constitución: CUBA

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

Teléfono: _____ Fax: _____
E-mail: _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO (74)

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: CARRERA 9 No. 93-09

Teléfono: 610 74 80 Fax: 610 07 06
E-mail: acastell@impeat.net.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐Número 39'779.654 TPA 70.819

④

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: (VER ANEXO No. 1)

Dirección:

Nacionalidad o Domicilio (VER ANEXO No. 1)

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/CU03/00007Fecha 08/05/2003Publicación Internacional No. WO 03/094964Fecha 20/11/2003

⑥

Título (54)

"COMPOSICION VACUNAL CONTRA LAS ALERGIAS, METODO PARA SU OBTENCION Y EMPLEO EN EL TRATAMIENTO DE LAS MISMAS"

⑦

Clasificación Internacional (51)

A61K 39/39

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

CU

(32) Fecha

08/05/2002

(31) Número de Solicitud

91/2002

⑨

Comprobante de pago No.

04-85.683

Fecha

Noviembre 3, 2004

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

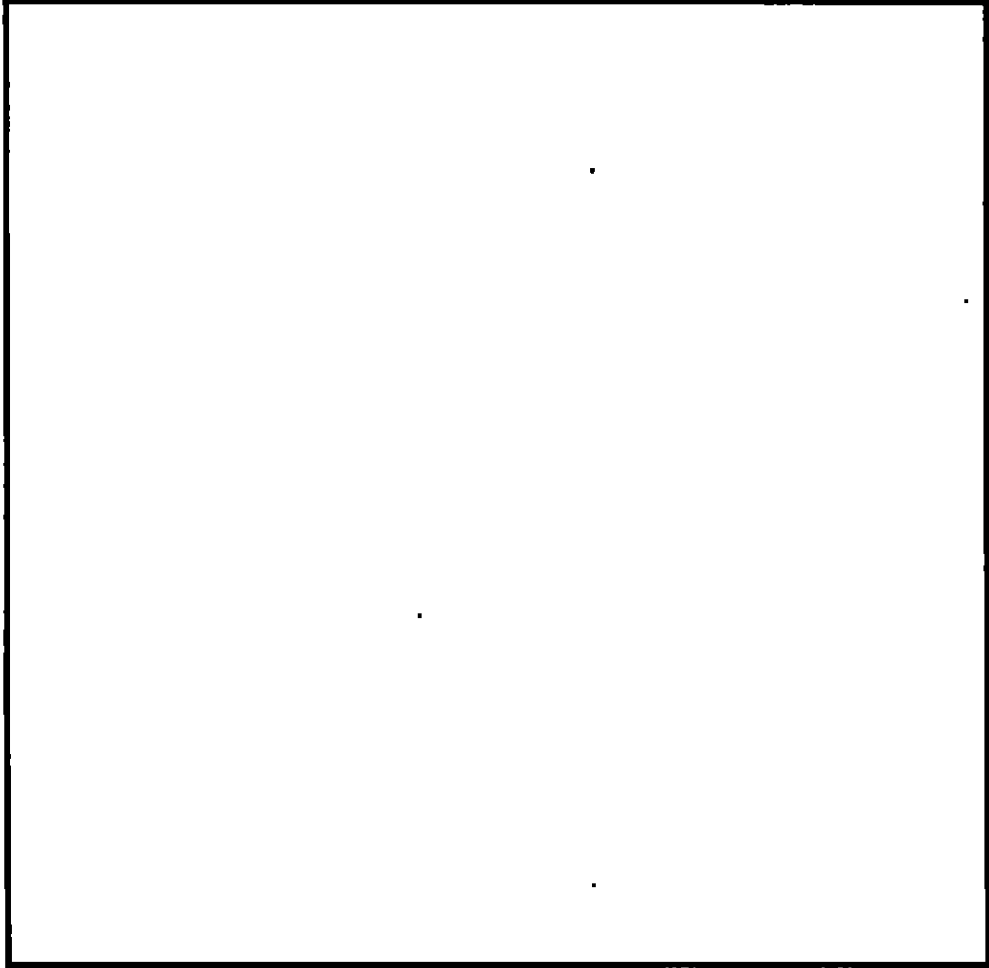
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo hecha a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros

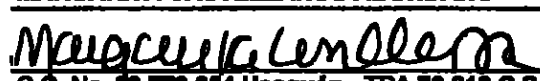
11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
FIRMA: 
C.C. No. 39.779.654 Uuaquén - TPA 70.819 C.S.J.

05 NOV. 2004

ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.
A B O G A D O S
Carrera 9 No. 83-88
Apartado 6348
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

ANEXO No. 1

INVENTORES

NOMBRE	DOMICILIO	NACIONALIDAD
1. MIRIAM DE SAN JUAN BOSCO LASTRE GONZALEZ	Calle 66 No. 913 entre 9 y 11, Playa, Ciudad Habana 11300, CUBA	CUBANA
2. OLIVER GERMAN PEREZ MARTIN	Calle 66 No. 913 entre 9 y 11, Playa, Ciudad Habana 11300, CUBA	CUBANO
3. ALEXIS LABRADA ROSADO	Edificio 3, Apto 4, Comunidad Científica Bejucal, La Habana 8048, CUBA	CUBANO
4. IGOR BIDOT MARTINEZ	San Lino No. 1101 entre Varona y Pintó, Guantánamo, CUBA	CUBANO
5. JORGE ERNESTO PEREZ LASTRE	Calle 66 No. 913 entre 9 y 11, Playa, Ciudad Habana 11300, CUBA	CUBANO
6. GUSTAVO RAFAEL BRACHO GRANADO	Calle 124 No. 2509 entre 25 y 27, Rpto Zamora, Marianao, Ciudad Habana 11500, CUBA	CUBANO
7. JUDITH MONICA DEL CAMPO ALONSO	Calle 23 No. 508 Apto 3B entre G y H, Plaza de La Revolución, Ciudad Habana 10400, CUBA	CUBANA
8. DAINERYS ALEIDA PEREZ LASTRE	Calle 66 No. 913 entre 9 y 11, Playa, Ciudad Habana 11300, CUBA	CUBANA
9. ELISA FACENDA RAMOS	Calle 14 No. 41120 entre 15 y 17, Santiago de Las Vegas, Boyeros, Ciudad Habana 17200, CUBA	CUBANA
10. CARIDAD ZAYAS VIGNIER	Calle 27D No. 12212, entre 122 y 122A, Marianao, Ciudad Habana 11500, CUBA	CUBANA
11. CLAUDIO RODRIGUEZ MARTINEZ	Edificio 2 Apto 4, Comunidad Científica, Bejucal, La Habana 8048, CUBA	CUBANO
12. VICTORIANO GUSTAVO SIERRA GONZALEZ	Calle 158 No. 3114 entre 31 y 33, Playa, Ciudad Habana 12100, CUBA	CUBANO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 04111300 00000000 Folios: 90
Fecha (HNB): 2004-11-05 14:12:32
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NRCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800174089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 85,693
FECHA : NOVIEMBRE 3 DE 2004

===== CONSIGNACION =====

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	29810326	02/11/2004	2,369,000.00

===== CONCEPTO =====

CANT. CONTABILISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	110 PTC SOLICITUD DE PATENTE DE INVEN	422,000.00
	TOTAL :	5 422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
20 de Noviembre de 2003 (20.11.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 03/094964 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes: A61K 39/39,
39/35

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/CU03/00007

(22) Fecha de presentación internacional:
8 de Mayo de 2003 (08.05.2003)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
91/2002 8 de Mayo de 2002 (08.05.2002) CU

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo
US): INSTITUTO FINLAY, CENTRO DE INVESTI-
GACIÓN- PRODUCCIÓN DE VACUNAS Y SUEBOS
[CU/CU]; Ave 27 N° 19805 s/198 y 202, La Casona,
La Lisa, Ciudad Habana 13500 (CU). CENTRO NA-
CIONAL DE BIOPREPARADOS [CU/CU]; Carretera
Beltrán Km 1 1/2, Bejucal, Provincia La Habana 6048
(CU).

(72) Inventores: s

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): LASTRE
GONZÁLEZ, Miriam de San Juan [CU/CU]; Calle 66
N°913 entre 9 y 11, Playa, Ciudad Habana 11300 (CU).
PÉREZ MARTÍN, Oliver, Germán [CU/CU]; Calle
66 N°913 entre 9 y 11, Playa, Ciudad Habana 11300
(CU). LABRADA ROSADO, Alexis [CU/CU]; Edificio
3, Apto 4, Comunidad Científica, Bejucal, La Habana

6048 (CU). BIDOT MARTÍNEZ, Igor [CU/CU]; San
Lino N°1101 entre Varona y Pinó, Guanabacoa (CU).
PÉREZ LASTRE, Jorge, Ernesto [CU/CU]; Calle 66
N°913 entre 9 y 11, Playa, Ciudad Habana 11300 (CU).
BRACHO GRANADA, Gustavo, Rafael [CU/CU]; Calle
124 N°2509 entre 25 y 27, Rpto Zamora, María, pao,
Ciudad Habana 11500 (CU). DEL CAMPO ALONSO,
Judit, Mónica [CU/CU]; Calle 23 N°508 Apto 3B entre
G Y H, Plaza de la Ma, volución, Ciudad Habana 10400
(CU). PÉREZ LASTRE, Dalmorys, Aleida [CU/CU];
Calle 66 N°913 entre 9 y 11, Playa, Ciudad Habana 11300
(CU). FACENDA RAMOS, Elías [CU/CU]; Calle 14
N°41120 entre 15 y 17, Santiago de las Ve, gas, Boyeros,
Ciudad Habana 17200 (CU). ZAYAS VIGNIER, Carli-
dad [CU/CU]; Calle 27D N°12212 entre 122 y 122A,
Mariano, Ciudad Habana 11500 (CU). RODRÍGUEZ
MARTÍNEZ, Claudio [CU/CU]; Edificio 2 Apto 4,
Comunidad Científica, Bejucal, La Habana 6048 (CU).
SIERRA GONZÁLEZ, Victoriano, Gustavo [CU/CU];
Calle 158 N° 3114 entre 31 y 33, Playa, Ciudad Habana
12100 (CU).

(74) Mandatarios: MORENO SAMPER, Olga, Lidia; Ave
Ira No. 1001, Esq. 10, Miramar, Playa, 11300 Ciudad
de la Habana (CU).

(81) Estados designados (nacionales): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO.

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: ALLERGY VACCINE COMPOSITION, PRODUCTION METHOD THEREOF AND USE OF SAME IN ALLERGY
TREATMENT

(54) Título: COMPOSICIÓN VACUNAL CONTRA LAS ALERGIAS, MÉTODO PARA SU OBTENCIÓN Y EMPLEO EN EL
TRATAMIENTO DE LAS MISMAS

(57) Abstract: The invention relates to the field of immunology, immunology and, in particular, the use of adjuvants or carriers
in order to modulate the immunological response to allergens. The technical objective of the invention is: to produce a therapeutic
or prophylactic pharmaceutical preparation using bacterial protoconjugates, which, when applied to allergic individuals, transforms
the Th2- and IgE-dependent allergic response into a protective Th1 response; and to prevent the appearance and development of
allergies in not-yet allergic individuals. The vaccine composition consists of protoconjugates of gram-negative bacteria coupled
with allergens and, optionally, other antigens or adjuvants. The invention also relates to the method of producing the inventive
vaccine composition and to the two-dose schedule for immunisation with said vaccine composition.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con el campo de la inmunología, la inmunología y en particular con el empleo de
adyuvantes o portadores para modular la respuesta inmunológica hacia los alérgenos. El objetivo técnico que se persigue es obtener
una preparación farmacéutica de uso terapéutico o profiláctico utilizando protoconjugados bacterianos, la cual al ser aplicada en
individuos alérgicos transforma la respuesta alérgica Th2 e IgE dependiente, hacia una respuesta Th1 protectora; así como logra
prevenir la aparición y el desarrollo de alergias en individuos aún no alérgicos. La composición vacunal consiste en protoconjugados
de bacterias Gram-negativas acopladas a alérgenos y opcionalmente otros antígenos o adyuvantes. Se provee el método para su
obtención y se incluye el esquema de 2 dosis para la inmunización con dicha composición vacunal.

WO 03/094964 A1



RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (regionales): patente ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente
europea (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TO).

Publicada:
— con informe de búsqueda internacional
— antes de la expiración del plazo para modificar las reivin-
dicaciones y para ser republicada si se reciben modifica-
ciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidelines Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

**COMPOSICIÓN VACUNAL CONTRA LAS ALERGIAS, MÉTODO PARA SU
OBTENCIÓN Y EMPLEO EN EL TRATAMIENTO DE LAS MISMAS.**

Sector Técnico

- 5 La presente invención se relaciona con el campo de la inmunología, específicamente con la rama de la Inmunoalergia y en particular con el empleo de adyuvantes o portadores para modular la respuesta inmunológica hacia los alérgenos, con el objetivo de inducir cambios que reduzcan o prevengan el efecto patológico de dicha respuesta hacia esos compuestos.
- 10 **Técnica Anterior**
- Las alergias son una patología muy frecuente, sobre todo en los países industrializados. En la alergia intervienen una serie de mecanismos inmunopatológicos, el más común de ellos es la denominada hipersensibilidad de tipo-I o anafiláctica. La fisiopatogenia de la misma está basada en la producción
- 15 incrementada de IgE, un anticuerpo citotrópico, que se produce frente a sustancias denominadas alérgenos, tras un primer contacto que se conoce como sensibilización. La IgE se une a los mastocitos tisulares y basófilos sanguíneos logrando así prolongar su vida media de horas en sangre a meses en los tejidos. En contactos posteriores con el alérgeno se produce el reconocimiento de los
- 20 mismos y el entrecruzamiento de las IgE de superficie, la transmisión de señales hacia el citoplasma y la degranulación celular y liberación de los mediadores de las alergias entre los que se encuentran la histamina, la serotonina y las kininas. Las enfermedades alérgicas más comunes son la rinitis, el asma, y la dermatitis atópica. El asma alérgica es una enfermedad inflamatoria crónica. La
- 25 inmunopatogénesis del asma es compleja y en ella participan, además de los mecanismos IgE dependientes (causantes de la respuesta anafiláctica inmediata tipo I), los linfocitos Th2, los cuales inducen y mantienen la respuesta inflamatoria mediante el reclutamiento y activación de otras células y en particular a través de la producción de IL-5, la cual es responsable del reclutamiento y activación de los
- 30 eosinófilos. La eosinofilia juega un papel importante en el surgimiento de la hiperreactividad bronquial, la cual es una característica esencial del asma. Los alérgenos más comunes son el polen, los ácaros, el polvo de las casas, el moho, las drogas, los alimentos y los pelos de los animales. En particular los

alergenos domésticos y en primer lugar los ácaros, son causantes de alergias respiratorias y asma.

Las manifestaciones clínicas son tratadas fundamentalmente con antihistamínicos, simpaticomiméticos, cromoglicato de sodio y esteroides. Estos tratamientos son
5 generalmente inadecuados, pues tratan los signos y síntomas y no su etiopatogenia, por lo que en la actualidad se va en busca de otros procedimientos más efectivos entre los que se encuentran la inmunoterapia o vacunas terapéuticas.

Tradicionalmente la terapia de hiposensibilización o inmunoterapia con extractos
10 alérgicos ha sido ampliamente utilizada en el tratamiento de las enfermedades alérgicas. En este tipo de tratamiento los pacientes son hiposensibilizados mediante la administración por vía subcutánea de los alérgenos específicos. Se comienza con la inyección de una pequeña dosis de dicho alérgeno y si no ocurren reacciones alérgicas, se va aumentando la misma con una frecuencia
15 semanal. Las dosis se continúan incrementando gradualmente hasta alcanzar una dosis de mantenimiento mensual o bimensual. Este tratamiento se puede prolongar varios años (WHO Position Paper. Allergen Immunotherapy: Therapeutic Vaccines against Allergic Diseases. Geneva, January 1998).

A pesar de considerarse un método relativamente eficaz en ciertas alergias, la
20 inmunoterapia ha sido cuestionada debido a su falta de seguridad, pues se expone al paciente a reacciones anafilácticas que eventualmente puede incluso causar su muerte. También el elevado número de inyecciones a administrar, que pueden alcanzar hasta unas 100 ó 200 en un tratamiento de 3 años, constituye un serio inconveniente en su aplicación práctica, lo cual causa frecuentemente el
25 abandono prematuro del mismo sin lograr la eficacia esperada.

Cada vez se conoce más sobre los mecanismos de inducción de los altos niveles de IgE en los alérgicos. Estos son inducidos a través de mecanismos inmunológicos propios de la respuesta de tipo Th2 y en particular por una
30 sobreproducción de IL-4. Las células Th2 están involucradas patológicamente no sólo a través de su papel regulatorio (la IL-4 induce el cambio de clase hacia IgE en los linfocitos B, mediado por una señal de contacto provista por las Th) sino también que participan también de modo más directo en la fase efectora de la respuesta alérgica tardía y en la inflamación crónica asmática.

La exposición a alérgenos ambientales, además de la predisposición genética propia del individuo, constituye el fenómeno desencadenante de la sensibilización alérgica, en primer lugar y de las reacciones alérgicas posteriores en los individuos previamente sensibilizados.

- 5 El mecanismo inmunológico responsable de la mejoría clínica de los pacientes durante la inmunoterapia con extractos alérgicos no está aún totalmente dilucidado. Sin embargo, se conoce que se producen cambios inmunológicos vinculados con la disminución a largo plazo de los anticuerpos IgE específicos al alérgeno, la disminución de la secreción de IL-4 e IL-5 y el incremento de
- 10 anticuerpos IgG e IFN- γ . Estos cambios indican una disminución del patrón de respuesta Th2 como posible consecuencia de la inducción de un patrón Th1 concurrente no patogénico (WHO Position Paper. Allergen Immunotherapy: Therapeutic Vaccines Against Allergic Diseases. Geneva, January 1998)
- 15 Los patrones Th1/Th2 de respuesta inmunológica se distinguen primeramente por el patrón típico de citoquinas que secretan las células Th, fundamentalmente, IFN- γ e IL-2 por las Th1 e IL-4 e IL-5 por las Th2 (Mossman, T. R., Cherwinaki, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and R. L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cells clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol. 136:2348-2357). Por otra parte, también es posible valorar el
- 20 tipo de respuesta inducida determinando los perfiles de clases y subclases de inmunoglobulinas séricas que estos inducen. Así en los murinos, el patrón Th1 induce preferentemente anticuerpos de la subclase IgG2a (dependiente de IFN- γ), mientras que el Th2 induce IgE y subclase IgG1 (dependientes de IL-4). En los humanos el Th1 cursa con anticuerpos IgG1/IgG3 y el Th2 con IgE.
- 25 Aunque la aparición y desarrollo de las alergias está relacionada con factores de tipo ambiental, el papel básico en la propensión del individuo a desarrollar una respuesta Th2/IgE hacia antígenos ambientales, es de orden genético (Holgate ST. Genetic and environmental interaction in allergy and Asthma. J Allergy Clin Immunol 1999; 104:1139-1146). Esto se traduce en que, la descendencia de
- 30 padres alérgicos lo serán también con una mayor frecuencia que los hijos de padres no alérgicos. Esta frecuencia se ha estimado en 75, 50 y 25% si ambos parentales, la madre o el padre son alérgicos, respectivamente, lo que significa que existe una alta probabilidad de predecir el comportamiento de un individuo

dentro de la población y por tanto de ésta, si se tiene un sistema de detección a nivel parental. También es conocido que el afianzamiento del patrón patológico Th2 ocurre en los primeros 6-24 meses de vida del niño y que factores ambientales como la exposición a infecciones bacterianas pueden influir de forma positiva en la enfermedad induciendo un patrón Th1, que contraregula el Th2 alérgico (Holt PG, Programming of Allergen Specific Th-memory during Childhood. Proceedings XVII International Congress of Allergology and Clinical Immunology. Sydney 2000. Allergy Clin Immunol International Suppl. 1, 2000 pp 83-85). Estos hallazgos dejan entrever la posibilidad de diseñar vacunas anti-alérgicas profilácticas, que prevengan el afianzamiento del patrón Th2 hacia los alérgenos, en la temprana infancia. Estas vacunas podrían estar basadas en el empleo de adyuvantes Th1 que fueran efectivos durante la lactancia.

Se han intentado varias formas de mejorar la inmunoterapia con alérgenos, tratando de reducir sus aspectos negativos, preservando o ampliando sus beneficios. En particular, se conoce que existen varios métodos para modificar los alérgenos de modo que se reduzca su alergenidad (es decir, su afinidad por los anticuerpos IgE) y su capacidad para inducir IgE tras la inmunización, así como incrementar su inmunogenicidad (es decir, su capacidad para inducir una respuesta eventualmente terapéutica o protectora). Entre ellos se encuentran métodos físicos por adsorción o inclusión de los alérgenos para crear un efecto de depósito (adyuvantes) o métodos químicos que modifican las moléculas alérgicas mediante enlaces covalentes con otros compuestos o entre ellas mismas.

Como agentes físicos se han empleado la tirosina (Patente No. GB 1,377,074), el éster de tirosina (Patente No. US 4,428,932); los liposomas (Solicitud de patente WO 89/10753); el monofosforil lípido A (MLA) y el MLA 3 desacilado (Patente No. US. 5,762,943); la saponina (Patente No. US. 4,432,969) y los tradicionales hidróxido de aluminio y fosfato de calcio.

Entre los agentes químicos que se han empleado para la polimerización de los alérgenos está el formaldehído (Marsch DG et al. Studies on allergoids from naturally occurring allergens. III. Preparation of Ragweed pollen allergoids by aldehyde modification. J. Allergy Clin. Immunol. 1981;68:448-59); Alginato (Corrado OJ et al. Allergy 1989;44:108-5) y glutaraldehído (Patente No. GB

1,282,163). También se han empleado mPEG (Dreborg et al. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1990;8:316-85) y conjugaciones a polisacáridos (Solicitud de patente europea No. EP 008 3497 A2).

Estas soluciones logran, en algunos casos (por Ej. los alérgenos polimerizados con glutaraldehído y adyuvados con Alúmina, Grammer et al, Modified forms of allergen immunotherapy, J Allergy Clin Immunol 1985;44:108-15), incrementar los títulos de anticuerpos IgG dirigidos contra los alérgenos en modelos animales. Sin embargo, el incremento de esta clase de anticuerpos no implica necesariamente una mejoría clínica del paciente, sobre todo si va acompañada de un incremento paralelo de los anticuerpos IgE. De hecho, algunas de las subclases de la IgG (IgG1 en los ratones e IgG4 en humanos) están implicadas también en diferentes formas de la reacción alérgica, por ser capaces de fijarse, aunque transitoriamente, a los mastocitos. Por otra parte, las evidencias clínicas en humanos indican que el incremento de los anticuerpos IgG no está directamente correlacionado con la mejoría clínica del paciente, sugiriendo que el mismo juega solamente un papel secundario en el mecanismo regulatorio inducido por el tratamiento (Rak S, Lowhagen O, Venge P. The effect of immunotherapy on bronchial hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein in pollen-allergic patients. J Allergy Clin Immunol 1988; 82:470-80 y Jutel M, Müller U, Fricker M, Rihs S, Pichler W, Dahinden C. Influence of bee venom immunotherapy on degranulation and leukotriene generation in human blood basophils. Clin Exp Immunol 1998;12:1112-18).

El empleo de alérgenos modificados químicamente (alergoides) aunque tiene algunas ventajas en cuanto a reducción de las reacciones secundarias durante el tratamiento, en comparación con los extractos alérgénicos tradicionales, no producen una significativamente mejoría clínica (Bousquet et al. J. Allergy Clin. Immunol. 1989;84:546-58 y Grammer et al. J Allergy Clin Immunology 1985;76:397-401). Otro de los inconvenientes de los alergoides empleados hasta el momento en la clínica (modificados por glutaraldehído o formaldehído), es la imposibilidad práctica de lograr una composición estandarizada de los productos, ya que los mismos se obtienen mediante reacciones químicas a partir de los extractos alérgénicos, los cuales constituyen mezclas heterogéneas de polipéptidos y otras biomoléculas. En estas reacciones se obtienen

Inevitablemente especies moleculares con diferentes grados de polimerización o modificación química, las cuales pueden constituir subproductos no deseables, difíciles de eliminar.

- El empleo de hidróxido de aluminio sólo ha logrado reducir el número de inyecciones necesarias para lograr el mismo efecto que con los alérgenos no adyuvados, lo cual se debe a su efecto de depósito y liberación lenta. Sin embargo, este adyuvante propicia la producción de IgE, tanto en animales como en humanos provocando un típico patrón Th2, lo cual podría eventualmente reforzar la respuesta alérgica patogénica durante su administración.
- 10 El fosfato de calcio o la tirosina se han empleado también como adsorbentes para crear depósitos y producir la liberación lenta de los alérgenos, sin embargo no han mostrado ventajas de consideración con respecto a los extractos acuosos o adyuvados con Alúmina, en cuanto a mejorar la eficacia o la seguridad del tratamiento (Altintas DU *et al.* Comparison between the use of adsorbed and aqueous immunotherapy material in Dermatophagoides pteronyssinus sensitive
- 15 asthmatic patients. *Allergologie et Immunopathologie* 1999; 27(6):309-317).

- Ninguna de las soluciones existentes en la actualidad, enumeradas anteriormente, logra inducir una modulación inmunológica completamente efectiva (expresada en inhibición o reducción del patrón Th2 o inducción del Th1) ya sea en animales o en humanos, ni eficacia clínica en estos últimos, empleando un número reducido de inyecciones.
- 20

- El empleo de liposomas que contienen alérgenos ha sido descrito en la solicitud de patente WO 89/10753. Los liposomas, además de crear un depósito y reducir la alergenidad del producto, se cree que influyen en los mecanismos de presentación de los antígenos al sistema inmune, debido a su naturaleza lipídica y particulada (WHO Position Paper. Allergen Immunotherapy: Therapeutic Vaccines against Allergic Diseases. Geneva, January 1998). Sin embargo, este enfoque no ha podido extenderse a la práctica clínica debido a la inestabilidad característica de estos preparados, así como a inconvenientes relacionados con la tecnología para la inclusión de forma consistente de los alérgenos dentro de los liposomas.
- 25
- La falta de estabilidad de la formulación de los liposomas durante su conservación o durante su administración al paciente tiene implicaciones serias en la seguridad del producto, ya que la eventual liberación de los alérgenos de los liposomas
- 30

puede provocar reacciones anafilácticas severas, de la misma forma que ocurren con los alérgenos en estado acuoso. Tampoco en ese caso se han logrado evidencias de la inducción de una respuesta inmunológica que afecte el balance Th1/Th2 y que induzca un patrón no patológico o protectogénico.

- 5 Las estrategias más recientes que se conocen intentan emplear formulaciones de alérgenos con adyuvantes inductores de respuesta Th1, tales como el monofosforil lipido A (MLA) (Patente US. 5,762,943), proteínas de shock térmico ("Heat Shock Proteins", HSP, siglas en inglés), también conocidas como proteínas de estrés de micobacterias, lo cual es descrito en la patente WO9823735. En el caso del MLA,
 - 10 el cual constituye una variante detoxificada de LPS, se ha demostrado que reduce los niveles de IgE específica, incrementando la IgG en experimentos en ratones, sin embargo no se ha demostrado que reduzca de modo efectivo el componente celular Th2 de la respuesta alérgica, de modo que su uso estaría limitado estrictamente a las enfermedades alérgicas para las cuales el mecanismo de
 - 15 hipersensibilidad tipo 1 sea el principal, lo cual excluiría el asma. Otro de los inconvenientes, es que aunque se logra atenuar el efecto tóxico de los LPS, no se elimina por completo la toxicidad (Baldrick P et al. Vaccine 20, 2002 737-743), lo cual podría limitar su uso en niños de pequeña edad. En el caso de las HSP, no se han provisto evidencias experimentales de que las mezclas o conjugados de dicha
 - 20 proteínas con los alérgenos produzcan un efecto de desviación de la respuesta Th2 específica a los alérgenos, ya sea en modelos animales o en humanos.
- El empleo de proteoliposomas derivados de la membrana externa de bacterias Gram-negativas se ha descrito para la preparación de vacunas profilácticas contra enfermedades infecciosas por Ruegg CL y cols. (Preparation of proteosome-based
- 25 vaccines. J Immunological Methods 1990;135:101-9); Lowell y cols. (Proteosome-Lipopeptide Vaccines: Enhancement of Immunity for Malaria CS Peptides. Science 1988;240:800-2); también en la Pat. No. US No. 5,597,572. En esta última, el núcleo fundamental es el proteoliposoma o vesículas de membrana externa (VME) derivados de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, cuya estructura particulada, sus
 - 30 trazas de lipooligosacáridos (LPS) incorporadas en las VME, el polisacárido C, su composición lipídica característica y su adsorción en alúmina, están relacionadas con su inmunogenicidad y probada protectogenicidad en humanos.

A pesar de contener LPS, dicha formulación vacunal no provoca efectos tóxicos en humanos ni animales, lo cual es atribuido a la peculiar estructura y composición de las VME. Por otra parte se logra retener el efecto inmunomodulador y adyuvante de los LPS.

- 5 La vacuna basada en este proteoliposoma ha sido aplicada en más de 50 millones de dosis y ha demostrado ser segura, no reactogénica y eficaz para proteger contra *N. meningitidis* serogrupos B y C. Es además, aplicada durante la lactancia de forma segura y eficaz, donde convierte la T-Independencia del Polisacárido C en un antígeno T-dependiente. Esta vacuna induce un patrón preferencial Th1
- 10 caracterizado por la inducción en humanos y animales de linfoproliferación; anticuerpos IgG anti-VME; subclases IgG1 en humanos e IgG2a en ratones; IFN γ , IL-2 e IL-12 a nivel de ARNm y proteínas, y la no inducción de IgE anti-VME ni incrementos en la IgE total, ni tampoco de la IL-4, IL-5 a nivel de ARNm ni proteico (Infect Immun. 2001, 69(72001):4502-4508). La respuesta inducida por la vacuna,
- 15 como es característico de la inmunidad adaptativa, es específica a los antígenos bacterianos que componen el producto, y por consiguiente, no hay evidencias de que induzca respuesta alguna contra los alérgenos conocidos.

Divulgación de la invención

- El objetivo técnico de la presente invención es obtener una preparación
- 20 farmacéutica de uso terapéutico o profiláctico empleando proteoliposomas bacterianos, en lo adelante denominados proteoliposomas, la cual al ser aplicada en un paciente que padece de alergias, es capaz de transformar la respuesta alérgica (Th2) inducida por el alérgeno, hacia una respuesta celular Th1. La invención también incluye el esquema de inmunización con dicha composición
- 25 vacunal. Es también un objetivo de la presente invención proveer una composición farmacéutica capaz de prevenir la aparición y desarrollo de la enfermedad alérgica en niños con antecedentes familiares atópicos.

- Esta composición puede contener uno o varios alérgenos los cuales se pueden acoplar o administrar conjuntamente con un proteoliposoma, induciéndose una
- 30 respuesta inmunológica terapéutica o protectora en el individuo alérgico, al o a los alérgenos en cuestión. Esta respuesta se caracteriza por una menor producción de anticuerpos IgE con respecto a la inmunoterapia tradicional, la no inducción de IL-5, así como la inducción de anticuerpos de subclase IgG1 (en humanos) e

IgG2a (en murinos) y las citocinas IFN γ e IL-2 (en ambos), correspondientes a una respuesta Th1, elementos que evidencian la transformación de la respuesta Th2 alérgica hacia una celular, Th1.

Es otro objetivo de esta invención proveer el método para acoplar dicho (a)
5 alérgeno (a) con el proteoliposoma y otros adyuvantes, así como proveer una composición farmacéutica apropiada para su administración por vía parenteral.

La novedad de la invención radica primeramente en el uso de proteoliposomas derivados de proteínas de la membrana externa de bacterias Gram-negativas y más particularmente de *Neisseria meningitidis* B, los cuales pueden estar solos o
10 unidos a un polisacárido; para ser posteriormente acoplados de forma no covalente o covalente con una o varias proteínas alérgicas y de esa forma ser administrados a los individuos alérgicos.

Es particularmente novedoso que la composición farmacéutica de la presente invención induce una modulación de la respuesta inmune específica a los
15 alérgenos incluidos en la misma, hacia un patrón Th1 no patogénico y protector, empleando solamente 2 inyecciones.

Otro aspecto novedoso es su aplicación profiláctica en descendientes de parentales alérgicos o en individuos atópicos diagnosticados tempranamente.

Es también novedoso el procedimiento empleado para el acople no-covalente de
20 los componentes de la formulación y particularmente del proteoliposoma y de los alérgenos, así como el empleo de alérgenos purificados con ese propósito.

En la presente invención se emplean proteoliposomas o VME purificadas a partir del cultivo de bacteria Gram-negativas en particular de *N. meningitidis* B según se describe en la Patente No. US 5,587,572.

25 En la presente invención se emplean alérgenos preferentemente de naturaleza proteica o glicoproteica aunque también es posible emplear alérgenos polisacarídicos. Los mismos son obtenidos a partir de fuentes alérgicas naturales por métodos de extracción y purificación conocidos en el arte o de forma recombinante expresados en microorganismos o células superiores.

30 Alternativamente se pueden emplear polipéptidos obtenidos por síntesis química cuya secuencia de aminoácidos se corresponde con los alérgenos nativos. Particularmente, se emplean alérgenos respiratorios y en primer lugar de ácaros del polvo doméstico de la familias *Piroglyphidae* o *Glyciphagidae*, especialmente

de los géneros *Dermatophagoides* o *Blomia* y específicamente de las especies *Dermatophagoides siboney*, *Dermatophagoides pteronyssinus* o *Dermatophagoides farinae*. Los alérgenos purificados de dichas especies de ácaros se obtienen a partir de cualquier extracto alérgénico comercial, el cual es
5 sometido primeramente a liofilización o concentración por ultrafiltración hasta una concentración de proteínas de 10 a 100 mg/mL y a continuación a precipitación salina en solución de sulfato de amonio 50 – 100%. El precipitado es fraccionado mediante cromatografía de tamizaje molecular empleando como matrices Sephacryl S-100, Sephacryl S-200 o Sephacryl S-300 o Superdex 75,
10 colectándose el pico que corresponde a los pesos moleculares 10-60 kDa. Esta fracción contiene fundamentalmente los Alérgenos mayores del Grupo 1 (glicoproteínas de 25 kDa: Der s 1, Der p 1) y Grupo 2 (proteínas de 15 kDa: Der s 2, Der p 2). Alternativamente, puede ser empleado un procedimiento de purificación independiente para cada uno de los alérgenos por separado, basado
15 en la cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales anti-Grupo 1 y anti-Grupo 2, acoplados a una resina, con la posterior formulación de ambos componentes importantes en un solo preparado o la unión a los Proteoliposomas por separado.

La unión de ambos componentes básicos (alérgeno y proteoliposoma) se realiza
20 por métodos covalentes o no covalentes, teniendo en cuenta las propiedades de cada alérgeno en particular. En el caso de la unión no covalente, los alérgenos de ácaros, se incorporan en concentraciones de alérgeno de 0,1 a 1 µg por cada 10 µg de proteoliposoma. Esta incorporación se realiza mediante agitación durante 30 a 90 minutos a 60 a 600 rpm, aprovechando las interacciones de tipo hidrofóbico o
25 lipofílico entre ambos componentes. La mezcla obtenida puede ser administrada directamente en solución acuosa o adsorbida en alúmina. En el caso del empleo de alúmina, el alérgeno se adsorbe a la misma antes del proteoliposoma o preferentemente posterior a éste. La alúmina se emplea de 10 a 25 veces la cantidad de proteoliposoma, manteniéndose la proporción entre ésta y el alérgeno.
30 La adsorción a la alúmina se realiza mediante agitación lenta entre 60 a 600 rpm y pH de 6 a 8.

La efectividad de la adsorción de cada alérgeno a la Alúmina puede determinarse empleando métodos ELISA específicos a los mismos, como por ejemplo los ELISA

para Der s 1 (Sewer et al. Int Arch Allergy Immunol 2000;123:242-248) o para Grupo 2 del género *Dermatophagoides* (Haymann PW, Chapman MD et al J Allergy Clin Immunol 1989;83:1055-1067.)

La unión del proteoliposoma y el alérgeno también puede realizarse de forma covalente a través de la unión de un espaciador al proteoliposoma por los grupos amino libres presentes en éste y a continuación la unión del grupo maleimido a los grupos sulfhidrilo libres presentes en el alérgeno. Tales grupos existen en los alérgenos mayores de los ácaros del polvo (grupo 1 y 2), pero pueden ser también inducidos en otros alérgenos mediante la reducción de los puentes disulfuro o incluidos mediante la derivatización de las proteínas por métodos conocidos. Los conjugados obtenidos se purifican posteriormente mediante diálisis o ultrafiltración y por último mediante cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S-300 ó Superdex 200) para eliminar los reactivos de conjugación, así como los alérgenos no unidos al proteoliposoma. Las moléculas alérgicas deben constituir entre el 1 y el 10% de la masa total del conjugado con el objetivo de lograr la respuesta inmunogénica adecuada. El conjugado se administra por vía inyectable en un excipiente acuoso apropiado o también adsorbido en gel de Hidróxido de Aluminio u otro adyuvante de depósito.

La presente invención también comprende la conjugación por el método antes descrito, de residuos lipofílicos a los alérgenos, tales como ácidos grasos bipolares de 16 a 20 carbonos, para facilitar su incorporación no covalente al proteoliposoma.

Alternativamente, la composición vacunal incluye otros antígenos que no afecten al patrón celular inducido y el potencien la respuesta deseada contra el alérgeno, lo cual permite la obtención de una vacuna polivalente. Los polisacáridos pueden ser uno de estos antígenos y particularmente el polisacárido C de *N. meningitidis*. Estos se adicionan de forma no covalente en concentraciones de 0.5 - 4 veces con respecto al proteoliposoma.

La presente invención también comprende el empleo de alérgenos de naturaleza polisacáridica, tales como los determinantes polisacáridicos con reactividad cruzada ("Cross-reactive Carbohydrate Determinants", CCD, siglas en Inglés) (Aalberse, RC. Crossreactivity of IgE antibodies to allergens. Allergy 56 (8), 2001, pp478-490), encontrados en algunos pólenes y alimentos vegetales. En ese caso

los mismos se añaden a la formulación al igual que el polisacárido C de *N. meningitidis*.

De forma inesperada, la administración de esta composición por vía parenteral en solo dos dosis, produce no solo una respuesta de tipo Th1 específica a los antígenos del proteoliposoma como ya se conocía con anterioridad, sino también una respuesta similar de tipo Th1 dirigida contra los alérgenos incluidos en la formulación. Sorprendentemente también esta respuesta Th1 se impone, a pesar del empleo en la formulación de Hidróxido de Aluminio preservándose, sin embargo, el efecto de depósito del mismo. Esta respuesta se caracteriza por un patrón de citoquinas compuesto preferentemente por IFN- γ , con ausencia de respuesta de IL-5, también por una inducción de anticuerpos de la subclase IgG2a y una reducción de los anticuerpos IgE e IgG1 en ratones, específicos al alérgeno. La administración de dicha composición no afecta una respuesta preexistente contra los antígenos bacterianos, inducida por una inmunización anterior.

La solución propuesta tiene las siguientes ventajas:

El efecto inmunológico logrado por este preparado permite contrarrestar la respuesta alérgica tanto de tipo anafiláctico (reducción de IgE e IgG1) como la inflamatoria tardía y crónica (reducción de IL-5), lo cual la hace efectiva también en el tratamiento del asma. El efecto terapéutico se debe a la presentación de los alérgenos al sistema inmune en un contexto no alérgico y se alcanza en un número reducido de inyecciones y en un menor tiempo con respecto a la inmunoterapia tradicional con extractos alérgicos. Tal efecto se emplea ventajosamente no solo en el tratamiento de los pacientes alérgicos, sino también permite prevenir el agravamiento de la enfermedad en individuos con un estado alérgico incipiente o prevenir el desarrollo de nuevas alergias a alérgenos diferentes.

El efecto inmunológico de los proteoliposomas como adyuvante inmunomodulador es eficaz y seguro en edades tempranas durante la lactancia, lo cual posibilita la administración de la formulación vacunal en esa edad con fines profilácticos, antes de la aparición y desarrollo de la enfermedad, en niños con antecedentes familiares alérgicos y por lo tanto con alta probabilidad de serlo también.

- La adsorción de los componentes activos de la formulación en un adyuvante de depósito, particularmente en gel de hidróxido de Aluminio, permite la reducción de la alergenicidad del preparado (o sea la capacidad de unión de IgE) en más de 10 veces con relación a una dosis similar de alérgeno en estado acuoso, lo cual
- 5 implica una reducción considerable de los riesgos de reacciones anafilácticas severas durante su administración. También la adsorción al gel de hidróxido de Aluminio contribuye a prolongar la estabilidad del preparado durante su conservación, al disminuir la cinética de las reacciones químicas que puedan eventualmente causar degradación de los componentes activos.
- 10 El empleo de alérgenos purificados y particularmente de los alérgenos purificados de ácaros del género *Dermatophagoides*, incluyendo alérgenos de los grupos 1 y 2, permite estandarizar la composición de los productos, determinando y ajustando de forma precisa su contenido en la formulación y su incorporación al proteoliposoma o al gel de hidróxido de aluminio. También en el caso del acople
- 15 covalente, es posible separar fácilmente los productos no deseados (tales como los polímeros alérgeno-alérgeno) de los productos activos (conjugados proteoliposoma-alérgeno) gracias a la gran diferencia de masa existente entre ambos componentes, lo cual se realiza empleando métodos de cromatografía de exclusión molecular, disponibles comercialmente. La tecnología es aplicable a
- 20 alérgenos de diferente naturaleza, siendo posible emplear varios alérgenos en una misma formulación.
- La ausencia de toxicidad de la formulación a pesar de contener pequeñas cantidades de LPS, los cuales retienen su efecto inmunogénico, es otra de las ventajas de la solución propuesta que lo hacen apropiado para su administración
- 25 segura a humanos y en particular a niños en edad temprana.
- Los proteoliposomas también convierten a antígenos T-Independientes, tales como carbohidratos, en antígenos T-dependientes. Esta propiedad se aplica también de forma ventajosa a los alérgenos de naturaleza polisacáridica, tales como los CCD.
- 30 La presente invención será descrita a través de los siguientes ejemplos específicos.
- Ejemplo 1. Obtención y purificación de alérgenos de ácaros.**

Estos preparados se obtienen a partir del cultivo completo de los ácaros, el cual contiene ácaros muertos, exuvias, heces, así como ingredientes no alergénicos de bajo peso molecular provenientes del medio de cultivo. Los alérgenos son extraídos en solución de bicarbonato de amonio o bicarbonato de sodio o solución salina o solución salina tamponada con fosfato, a un pH cercano al fisiológico. El extracto crudo es clarificado mediante centrifugación y filtración y los componentes de bajo peso molecular son removidos mediante cromatografía de tamizaje molecular (Sephadex G-25) o diafiltración (límite de corte 5-10 kD) o ambos. Este preparado es entonces concentrado mediante ultrafiltración y liofilizado para garantizar su estabilidad. Para lograr un producto con un mayor grado de pureza, el extracto liofilizado es resuspendido en solución acuosa y sometido a precipitación salina en solución de sulfato de amonio 50 – 100%. El precipitado es fraccionado mediante cromatografía de tamizaje molecular empleando Superdex 75, colectándose el pico intermedio que corresponde a los pesos moleculares 10-60 kDa. Esta fracción contiene fundamentalmente los Alérgenos mayores del Grupo 1 (25 kDa) y Grupo 2 (15 kDa). Por último, la fracción colectada es liofilizada de nuevo para ser reconstituida en una concentración apropiada para su conjugación o mezcla con el proteoliposoma

20 Ejemplo 2. Obtención del proteoliposoma.

Para la obtención del proteoliposoma se realiza un cultivo de *N. meningitidis* B y la biomasa colectada mediante centrifugación se somete a un proceso de extracción con detergente, enzimas y ultrasonido. El debris celular es removido mediante centrifugación y el sobrenadante es sometido entonces a digestión con nucleasas para eliminar los ácidos nucleicos. El extracto es recuperado mediante ultracentrifugación, resuspendido en solución con detergente y purificado del resto de los componentes de bajo y mediano peso molecular mediante cromatografía de exclusión molecular. El proteoliposoma así obtenidos contienen menos del 10% de ácidos nucleicos y alrededor de 10% de LPS insertados en su estructura; pero nunca libres. Opcionalmente, se añade polisacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C producido según Gold y Gotschlich (Gold et al., 1969-1970, WHO Bull. 45: 279-282 and Gotschlich et al., 1969, J. Exp. Med. 129: 1349-1365) de 0.5 a 4 veces el contenido de proteoliposoma. También opcionalmente se puede

- añadir alúmina al polisacárido-proteoliposoma, como un adyuvante adicional en una proporción de 10 a 25 veces la cantidad de Proteoliposoma. El pH final es $7,0 \pm 0,4$, la adsorción al gel de alúmina del proteoliposoma-polisacárido es mayor del 80% y un contenido de LPS menor del 6% es garantizado. El LPS presente está
- 5 Insertado en el proteoliposoma, por lo que se logra una adecuada presentación al sistema inmune y reduce la posibilidad de inducir reacciones indeseables. Se puede adicionar thiomersal como preservativo a una concentración entre 0.005-0.02%. El producto final es sometido a un conjunto de controles biológicos y físico-químicos.
- 10 **Ejemplo 3. Determinación de la alergenicidad (unión de IgE humana) de la formulación adsorbida en hidróxido de Aluminio.**
- La actividad alergénica, expresada como la capacidad de unión de anticuerpos IgE humanos, se determinó mediante ELISA de inhibición de IgE el cual determina la habilidad de la muestra en solución de inhibir la unión de la IgE humana al
- 15 alérgeno fijado a una fase sólida. La formulación muestra es alérgeno de *D. siboney* purificado según el Ej. 1, mezclado con los proteoliposomas según el Ej. 2 y adsorbidos en gel de hidróxido de Aluminio. La concentración de alérgeno mayor Der s 1, inicial es de 4 µg/mL y la actividad alergénica 400 UB/mL (UB: Unidades Biológicas según la definición de las Guías Nórdicas para el Registro de Productos alérgicos, 2da Edición. 10 000 UB equivalen a 10 mg/mL de Histamina HCl en la prueba de punción cutánea)
- 20 El ELISA se realiza de acuerdo al siguiente procedimiento. Se recubren microplacas de poliestireno con el Extracto Alergénico de Referencia. Se bloquean los sitios de unión inespecífica de la placa con PBS-BSA 1%. A continuación se realiza la inhibición de la IgE sérica del pool de sueros, mediante la incubación del suero con cantidades crecientes del alérgeno muestra y la Referencia, en paralelo. La IgE no-inhibida por los alérgenos en solución, se une al alérgeno fijado a la placa. Después de efectuar el procedimiento de lavado de los anticuerpos unidos inespecíficamente, se realiza la detección de la IgE unida al alérgeno, mediante un
- 30 conjugado anti-IgE-Peroxidasa. El revelado se realiza mediante la adición de un sustrato cromogénico. La intensidad del color producto de la reacción enzimática es cuantificada mediante un lector de placas ELISA. La interpretación de los resultados del ensayo se realiza mediante el método estadístico de las rectas

paralelas. Se construyen curvas de inhibición para la Referencia y las muestras por separado. Se lleva a cabo una regresión lineal de los valores de Absorbancia vs Inhibición, comprobándose el paralelismo de cada muestra con la Referencia. Por último, se calcula la potencia relativa como el antilogaritmo de la distancia horizontal entre las rectas paralelas.

En el análisis de la muestra dada se obtuvieron los siguientes resultados:

Actividad alergénica: 21.2 UB/mL (IC95% 13.6 – 32.4). Corresponde a un 5.3% de la actividad del alérgeno en estado acuoso inicial.

Ejemplo 4. Determinación del esquema y dosis menos inductoras de IgE total.

Para la determinación del esquema de inmunización (espaciamiento entre dosis) y la concentración de alérgeno, ratones Balb/c fueron tratados por vía intramuscular con dos inmunizaciones en las semanas: 0 y 2 (esquema corto) ó 0 y 4 (esquema largo) con Alérgeno (Al) + Alúmina (A) en concentraciones de 1 ó 5 µg/ratón de alérgeno. En el esquema corto los animales fueron sangrados en la semana 0, 2 y 5, y en el largo en la semanas 0, 4 y 7. El nivel de IgE total en las mezclas de sueros fue determinado por ELISA.

Como puede observarse en la Fig. 1 el esquema corto induce una respuesta de IgE total significativamente menor que el esquema largo. Por otro lado, la menor concentración, 1 µg de alérgeno, no indujo respuesta de IgE total en ninguno de los esquemas. Por ello, los siguientes experimentos fueron realizados con el esquema corto y con concentraciones de alrededor de 1 µg/ratón.

Para aún precisar más la dosis, ratones Balb/c fueron tratados por vía intramuscular con dos inmunizaciones en la semana 0 y 2 y fueron sangrados en la semana 0 y 4. El grupo I recibió proteoliposoma + polisacárido de *N. meningitidis* del serogrupo C + Al(OH)₃. Los grupos II, III y IV recibieron Al(OH)₃ + alérgeno con una concentración de alérgeno de 0,5; 1,25 ó 2,5 µg/ratón/dosis, respectivamente. El nivel de IgE total en los mezclas de sueros fueron determinados por ELISA. Como puede observarse en la Fig. 2, la IgE total no se elevó significativamente en ninguno de los grupos evaluados.

Ejemplo 5. Ausencia de efecto de la incorporación del alérgeno sobre la respuesta anti proteoliposoma y modulación de la respuesta de subclases de IgG anti-alérgeno.

Para la determinación de la ausencia de efecto del alérgeno sobre la respuesta hacia el adyuvante, ratones Balb/c fueron tratados por vía Intramuscular con dos inmunizaciones en la semana 0 y 2. El grupo I recibió proteoliposoma + polisacárido de *N. meningitidis* del serogrupo C + Al(OH)₃ (Va). Los grupos II, III y IV recibieron 0,5; 1,25 y 2,5 µg de Alérgeno + Va por ratón. El sangramiento se realizó a los 0, 15 y 35 días después de la primera dosis de inmunización y se determinó la respuesta de IgG y subclases anti-proteoliposoma y anti-alérgeno en las mezclas de los sueros por ELISA.

En la Fig. 3 se muestra los elevados títulos de IgG anti-proteoliposoma detectados y sorprendentemente la no afectación de la incorporación del alérgeno en esta respuesta ni en las subclases de IgG anti-Proteoliposoma estimuladas (Fig. 4). Los altos títulos de IgG2a son la expresión de la preferencial respuesta Th1 inducida por este adyuvante. En la Fig. 5 aparecen las subclases de IgG estimuladas, donde se puede observar el incremento de respuesta IgG2a anti-Alérgeno en las concentraciones menores de alérgeno y preferencialmente en 1,25 y 0,5 µg. La inducción de respuesta de IgG2a frente al alérgeno refleja que el adyuvante fue capaz de modular la respuesta Th2 hacia una Th1.

Ejemplo 6. Producción de IFN γ y no IL-5 por células de bazo de ratones inmunizados y desafiados *in vitro* con proteoliposoma o alérgeno y su correlación con la IgG y las subclases de IgG anti-alérgeno inducidas por los adyuvantes: proteoliposoma + polisacárido C + Al(OH)₃ en comparación con el Al(OH)₃.

Para la determinación de la respuesta de citocinas Th1 (IFN- γ) y Th2 (IL-5) se inmunizaron ratones Balb/c con dos dosis en las semanas 0 y 2. El grupo I recibió proteoliposoma + polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C + Al(OH)₃ (Va). Los grupos II, III y IV recibieron 0,5; 1,25 y 2,5 µg de Alérgeno + Va por ratón. El grupo V recibió una dosis inicial con Va y otra de 0,5 µg de Alérgeno + Va. Los animales fueron sacrificados 7 días después de la última dosis, se procesó su bazo por técnicas rutinarias y las células fueron enfrentadas a proteoliposoma o alérgeno. A las 72 horas, los sobrenadantes fueron extraídos y procesados por ELISA para la determinación de IFN- γ e IL-5.

El proteoliposoma indujo la producción de IFN- γ en todos los grupos, en

- correspondencia con el patrón Th1 inducido por este adyuvante. No obstante, con 0,5 µg de alérgeno, sorprendentemente, la producción de IFN-γ se vio potenciada tanto en dos dosis como cuando se empleó una dosis previa de Va y una sola con Alérgeno (Fig. 6). Sorprendentemente, el alérgeno también indujo respuesta de IFN-γ en todas las concentraciones empleadas, aunque inesperadamente, ésta fue superior en la concentración de 0,5 µg tanto con dos dosis como con una dosis y una previa de Va (Fig. 7). No se detectó respuesta de IL-5 frente al proteoliposoma ni al alérgeno. Estos resultados reflejan la modulación por el adyuvante del patrón Th2 inducido por los alérgenos hacia un patrón Th1.
- 10 Para determinar la IgG y las subclases de IgG anti-alérgeno se evaluó un grupo en paralelo inmunizado en iguales condiciones a las referidas anteriormente; pero con tres grupos adicionales que contenían Al(OH)₃ y el alérgeno en las mismas tres concentraciones (0,5; 1,25 y 2,5). El sangramiento se realizó a los 0, 15 y 35 días después de la inmunización. Las respuestas séricas fueron evaluadas por
- 15 ELISA. La respuesta de IgG anti-alérgeno fue significativamente superior cuando se empleó Va como adyuvante que con Al(OH)₃ y sorprendentemente las diferencias entre las respuestas de los dos adyuvantes también fue superior con las concentraciones menores de 0,5 y 1,25 µg. No obstante, la mayor respuesta de IgG anti-alérgeno fue con la mayor concentración con ambos adyuvantes (Fig. 8).
- 20 La subclase de IgG anti-alérgeno predominante fue IgG1 en todas las combinaciones y adyuvantes. No obstante, se estimuló la IgG2a en todas las combinaciones con Va y fueron ligeramente positivas con Al(OH)₃ sólo con las dos concentraciones mayores (2,5 y 1,25 µg). Por el contrario, sorprendentemente, también la mayor diferencia de las IgG2a anti-alérgeno, entre los dos adyuvantes
- 25 fue encontrada con la menor concentración (0,5 µg), donde es negativa con el adyuvante Al(OH)₃ y positiva con Va (Fig. 9).

Ejemplo 7. Determinación de la inducción de IgE anti-Alérgeno, su funcionabilidad y modulación en el preparado vacunal.

- Para la determinación de la respuesta de IgE anti-alérgeno, se inmunizaron
- 30 ratones Balb/c con dos dosis en las semanas 0 y 2. El grupo I recibió AL(OH)₃. El grupo II recibió proteoliposoma + polisacárido C + Al(OH)₃ (Va). Los grupos III y IV recibieron 1 y 5 µg de alérgeno + AL(OH)₃, respectivamente. Los grupos V y VI

- recibieron 0,5; 1,25 y 2,5 μg de alérgeno + Va. Los animales fueron sangrados a 0, 15 y 35 días de inmunizados. La respuesta de IgE se evaluó en ratas Wistar machos por el método de anafilaxia cutánea pasiva (PCA) cualitativa y semicuantitativa. Las respuestas fueron expresadas en tiempo y dilución de suero que resultó positiva y en densidades de las manchas.
- Los sueros fueron evaluados antes T_0 , después de 1ra, T_{15} y 14 días después de 2da dosis, T_{35} . Como puede observarse las últimas diluciones positivas del preparado vacunal (grupos V a VII) son inferiores al de los grupos en alúmina (grupos III y IV). De igual forma ocurre en las densidades ópticas. Esto aboga hacia una reducción importante en la respuesta de IgE anti-alérgeno inducida. No se observó respuesta en los controles negativos (I y II).
- En los dos primeros grupos controles negativos, las respuestas fueron negativas. En el grupo III, se observó respuesta a los 35 días, con una intensidad de 10860 y detectable hasta una dilución de 1:16. El grupo IV fue positivo desde la primera dosis (15 días) con una intensidad de 9345 y detectable hasta la dilución de 1:8. A los 35 días se observó una potente respuesta con 39843 de intensidad y detectable hasta la dilución de 1:32. Por el contrario, sorprendentemente con nuestro preparado vacunal Va, las respuestas de IgE anti-alérgeno fueron muy inferiores, sólo detectables al día 35, con intensidades bajas y detectables siempre a menores diluciones. Es de señalar que con la menor concentración, 0,5 μg de alérgeno sólo se detectó una ligera respuesta en el suero puro (1:1), es decir, desaparecía la respuesta cuando el suero era diluido 1:2 (Fig. 10 y Tabla 1). En la Tabla 1 se muestra la intensidad de las manchas de las reacciones y última dilución del suero donde la anafilaxia cutánea pasiva fue positiva.
- Estos resultados de menor inducción de IgE anti-alérgeno con el adyuvante Va que con $\text{AL}(\text{OH})_3$ y en las menores concentraciones de alérgeno, están en correspondencia con los resultados de los Ejemplos anteriores donde se encuentra menor IgE total, inducción de $\text{IFN}\gamma$ y subclase IgG2a con este adyuvante.

Tabla 1

Grupo	Inmunización	Positividad, días después de 2da dosis	Densidad (Ud arbitrarias)	Última difusión positiva
I	AI	-	0	-
II	P + PC + AI (Va)	-	0	-
III	1 µg A + AI	35	10860	1:16
IV	5 µg A + AI	15* 35	8345 39843	1:8 1:32
V	0,5 µg A + Va	35	1246	1:1
VI	1,25 µg A + Va	35	4054	1:4
VII	2,5 µg A + Va	35	4574	1:8

Leyenda: AI, Al(OH)₃; P, Proteoliposoma; PC, Polisacárido C de *N. meningitidis* serogrupo C; A, Alérgeno y *días después de 1ra dosis.

Ejemplo No. 8. Unión covalente del alérgeno al Proteoliposoma.

La unión covalente mediante conjugación química puede realizarse por alguno de los métodos conocidos, como por ejemplo los descritos en la patente US 4,695,694 y en las solicitudes de patente USSN 382,179; 555,558; 555,974; 555,986 y 555,939. Los métodos preferidos emplean reactivos homobifuncionales como Glutaraldehído o Anhídrido Succínico logrando la unión a través de los grupos amino libres, tanto del alérgeno como del proteoliposoma (en particular los grupos amino de las Lianas). También se emplean reactivos heterobifuncionales, preferiblemente Ésteres de N-Hidroxysuccinimida-Maleimida (tales como MBS, MPS, SMPB, GMBS, EMCS). La reacción en este caso se realiza primero a través de la unión del espaciador al Proteoliposoma por los grupos amino libres presentes en éste, y a continuación la unión del grupo Maleimido a los grupos Sulfhidro libres presentes en el alérgeno. En el presente ejemplo se expone la conjugación del alérgeno purificado de Dermatophagoides albonay al proteoliposoma empleando el método de Glutaraldehído y la respuesta inmunológica obtenida en ratones con el preparado.

Conjugación: Las proteínas alérgicas purificadas según el Ejemplo 1 se mezclaron a una concentración de 20 µg/mL con 200 µg/mL de Proteoliposoma en solución Salina Tamponada con Fosfato pH 7.0 (PBS); se adicionó igual volumen de Glutaraldehído al 0.4%; se agitó durante 1 hora y se detuvo la reacción con 0.25 mol/L de Glicina (concentración final). Seguidamente, se ajustó

- el pH a 7.0 – 7.8. El Glutaraldehído no enlazado se eliminó mediante gel-filtración en una columna de Sephadex G25. Para lograr un mayor grado de purificación del conjugado Alergeno-Proteoliposoma y eliminar el Alergeno libre, se pasó el preparado por una columna cromatográfica con Sephacryl S-300 con la adición
- 5 previa de detergente Deoxicolato de Sodio hasta una concentración final de 1%, colectando el primer pico correspondiente al volumen de exclusión de la matriz. Posteriormente se eliminó el detergente por diálisis empleando PBS. El preparado obtenido fue concentrado 10 veces por Ultrafiltración (Amicon, USA) con una membrana de 10 000 KD como valor de corte. Se determinó el contenido de Der s
- 10 1 en el conjugado empleando un ELISA sándwich con anticuerpos monoclonales específicos a dicho alergeno y se ajustó la concentración, mediante dilución con PBS hasta un valor apropiado para el proceso de adyuvación: 10 µg/mL. Por último el preparado se esterilizó mediante filtración por membrana de 0.2µm.
- Adyuvación:** Se mezclaron cantidades iguales de Hidróxido de Aluminio a 1.2
- 15 mg/mL y la solución de Alergeno estéril a 10 µg/mL de Der s 1, ambos en solución PBS a un pH de 7.0. Se agitó la mezcla ligeramente durante 30 min a 200 rpm. Se comprobó la adsorción de las proteínas al gel de Aluminio monitoreando la absorbancia a 280 nm del sobrenadante de la suspensión, resultando ser superior al 90 %.
- 20 **Inmunización:** Se inmunizaron 3 grupos de ratones Balb/C con 7 ratones en cada grupo, con dos dosis de cada preparado respectivamente: Alergeno en solución de PBS ("Ds"), Conjugado de Alergeno Proteoliposoma en PBS ("PLS-Ds") y Conjugado adsorbido en Hidróxido de Aluminio ("PLS-Ds)Alum"). La dosis empleada fue de 5 µg/mL de alergeno Der s 1, por vía intraperitoneal. Las
- 25 inmunizaciones se realizaron en las semanas 0 y 4. A los ratones se les extrajo sangre al inicio del experimento y en las semanas 4 y 8.
- Resultados:** Se determinaron los anticuerpos séricos de las clases IgE (total) e IgG (específicos al alergeno). También las subclases IgG1, IgG2a e IgG2b. Dichas determinaciones fueron realizadas mediante ELISA. Por último se determinó la
- 30 respuesta IgE específica hacia el alergeno, empleando el método de Anafilaxia Cutánea Pasiva (PCA) en ratas. En la Fig. 11 se observan los resultados obtenidos en cuanto a anticuerpos. Se aprecia que en general las variantes que contienen conjugados inducen una respuesta IgG significativamente mayor que el

- alergeno solo, lo cual es también válido para todas las subclases IgG1, IgG2a e IgG2b. Sin embargo, la respuesta IgE total fue menor para la variante que contiene al conjugado no adyuvado en Hidróxido de Aluminio. También los resultados del PCA (IgE específica) demostraron que esa variante no indujo
- 5 respuesta detectable (mayor que el Control Negativo), mientras que el alergeno libre y el conjugado adyuvado en Aluminio sí inducían respuestas detectables a las diluciones 1:1 y 1:10, respectivamente.

Ejemplo 9. Formulación de varios alergen

- La formulación de diferentes alergen
- 10 ser llevado a cabo tanto de forma no covalente, mediante mezcla o adsorción en el gel de Hidróxido de Aluminio, como de forma covalente, según el Ejemplo 8. En ese caso cada alergeno se conjuga por separado al proteoliposoma y se formulan en conjunto mediante mezcla o adsorción en Hidróxido de Aluminio. En el presente ejemplo se expone la preparación de una formulación no covalente de
- 15 tres alergen
- de diferentes especies de ácaros, comunes en regiones tropicales: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides siboney* y *Blomia tropicalis*.

- Los alergen
- de dichos ácaros se preparan por separado según el Ejemplo 1. En el caso de *Blomia* se emplea el extracto alérgico completo, liofilizado, sin
- 20 fraccionar. El contenido de alergen
- principales Der p 1, Der s 1 y Blo t 5 se determina empleando ensayos ELISA con anticuerpos monoclonales específicos. La actividad Alérgica total se determina mediante ELISA de inhibición de IgE humana, según se describe en el Ejemplo 3. Los alergen
- liofilizados se resuspenden en PBS pH 7.0 a una concentración de 20 µg/mL de Der p 1 y Der s 1
- 25 y a 10 µg/ml de Blo t 5 y se esterilizan mediante filtración por membrana de 0.2 µm. La actividad Alérgica de los mismos es de 4000 UB/mL. Se añadió Proteoliposoma a cada alergeno por separado hasta una concentración final de 200 µg/mL y se homogenizó durante 30 min con agitación lenta a 150 rpm. Por último se mezclaron cantidades iguales de Hidróxido de Aluminio a 2 mg/mL y las
- 30 soluciones de Alergen
- con Proteoliposoma por separado, en solución PBS a un pH de 7.0. Se agitó la mezcla lentamente durante 60 min a 150 rpm. Se comprobó la adsorción de las proteínas al gel de Aluminio monitoreando la absorbancia a 280 nm del sobrenadante de la suspensión. Por último se mezclaron los tres

preparados de alérgenos individuales en una sola suspensión, con agitación lenta durante 10 minutos. La adsorción de los alérgenos y del proteoliposoma se demostró mediante análisis del sobrenadante de la suspensión con ELISA para Der p 1, Der s 1 y Bio t 5 (INDOOR Biotech, UK) y el método de Lowry para la determinación de proteínas. La actividad Alérgica residual (no adsorbida) se determinó según el Ejemplo 3. Se obtuvo más del 90 % de adsorción de los alérgenos en el gel y reducción de la actividad Alérgica a menos del 20 %.

Se administraron dos dosis de 0.5 mL (3.33 µg de Der s 1 y Der p 1 y 1.17 µg de Bio t 5) del preparado a ratones Balb/c con un intervalo de tres semanas por vía intraperitoneal. Pasadas 7 semanas del inicio de la inmunización se determinaron los niveles de anticuerpos IgG inducidos, mediante ELISA. Se encontró la existencia de anticuerpos dirigidos contra los tres alérgenos en una proporción de alrededor de 2:2:1, respectivamente a *D. pteronyssinus*, *D. siboney* y *Blomia tropicalis*. Los niveles de anticuerpos IgG observados fueron como promedio 80 % superiores a los obtenidos mediante la inmunización con la mezcla de los tres alérgenos en solución PBS.

Breve Descripción de las Figuras:

Figura 1: La Figura 1 muestra que el esquema de corto (0-14 días) es menos inductor de IgE total que esquema largo (0-28 días). Sangramiento 0, 15 y 35 en esquema corto y 0, 28 y 35 días después de la inmunización en esquema largo. Va, Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al (OH)₂; A, alérgeno; Al, Al (OH)₂; 1 y 5, µg de A/ratón. Como puede observarse la respuesta de IgE es significativamente superior ($p < 0.5$) en el grupo inmunizado con 5 µg de esquema largo que el de esquema corto aunque necesita dos dosis.

De hecho la respuesta secundaria en el grupo con igual concentración del esquema corto, tiende a disminuir.

Figura 2: Se observa que la concentración de alérgeno es menos inductora de IgE total. Sangramiento 0, 15 y 35 días después de la inmunización. Va, Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al (OH)₂; A, alérgeno; Al, Al (OH)₂; 0,5; 1,25 y 2,5, µg de A/ratón. Como puede observarse la inducción de IgE total por la concentración de 0.5 µg de alérgeno está a nivel del control con solo adyuvante (Va). Las otras dos concentraciones incrementan los niveles de IgE total.

Figura 3: Muestra como la inclusión del Alergeno no afecta la respuesta de IgG anti-proteoliposoma (PLS). Sangramiento 0, 15 y 35 días después de la inmunización. Va, Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al (OH)₃; A, alergeno; Al, Al (OH)₃; 0,5; 1,25 y 2,5, µg de A/ratón. El
5 preparado vacunal no afecta la respuesta de IgG anti-proteoliposoma, ni tras la primera ni segunda dosis en comparación con el adyuvante solo.

Figura 4: Se observa que las subclases de IgG anti-proteoliposoma (PLS) no son afectadas por inclusión de alergeno. Sangramiento 0, 15 y 35 días después de la inmunización. Va, Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al (OH)₃; A, alergeno; Al, Al (OH)₃; 0,5; 1,25 y 2,5, µg de A/ratón. El
10 preparado vacunal mantiene igual patrón de respuesta anti PLS a nivel de subclases que el adyuvante solo (Va)

Figura 5: Muestra IgG2a anti-alergeno inducida por bajas concentraciones de alergeno. Sangramiento 0, 15 y 35 días después de la inmunización. Va, Proteoliposoma (P) + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al (OH)₃; A, alergeno; Al, Al (OH)₃; 0,5; 1,25 y 2,5, µg de A/ratón. Fig.A, con
15 polisacárido y Fig.B sin polisacárido. Las dos concentraciones menores de alergeno inducen respuesta de IgG2a antialergeno.

Figura 6: Es referida a la determinación del IFN γ contra el proteoliposoma (PLS). Las células de bazo fueron tomadas 7 días después de dos dosis (0 y 2 semanas) de inmunización, respectivamente. Va, Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al (OH)₃; A, alergeno; Al, Al (OH)₃; 0,5; 1,25 y 2,5, µg de A/ratón; 1Va+Va-A0,5, dosis previa de Va. La inclusión de la menor
20 concentración de alergeno incrementa la respuesta de IFN γ contra el PLS con respecto al control (Va).

Figura 7: Muestra la producción de IFN γ contra el alergeno y no afectación de una dosis previa del adyuvante. Las células de bazo fueron tomadas 7 días después de dos dosis de inmunización a los 0 y 2 semanas, respectivamente. Va, Proteoliposoma (P) + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al (OH)₃; A, alergeno; Al, Al (OH)₃; 0,5; 1,25 y 2,5, µg de A/ratón; 1Va+Va-A0,5, dosis previa de Va. Fig.A, con polisacárido y Fig.B sin polisacárido. La respuesta
30 de IFN γ antialergeno se indujo por todas las concentraciones, pero fue muy

superior en la menor concentración. La aplicación previa del adyuvante no afectó esta respuesta.

- Figura 8: Se observa como las menores dosis de Alergenos inducen mayores diferencias de IgG anti-alergeno al comparar preparado vacunal con el adyuvante Alúmina. Los sueros fueron tomados 14 días después de la segunda dosis. Estas fueron aplicadas a los 0 y 21 días. Va, Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al (OH)₃; A, alergeno; Al, Al (OH)₃; 0,5; 1,25 y 2,5, µg de A/ratón. Como puede observarse las menores dosis (0.5 y 1.125) inducen mayores incrementos en las respuesta de IgG antialergeno que la mayor dosis.
- Figura 9: Se refiere a la inducción de IgG2a antialergeno. Los sueros fueron tomados 14 días después de la segunda dosis. Estas fueron aplicadas a los 0 y 21 días. Va, Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al (OH)₃; A, alergeno; Al, Al (OH)₃; 0,5; 1,25 y 2,5, µg de A/ratón. Como puede observarse todos los preparados vacunales inducen respuesta de IgG2a antialergeno. Esta no se induce por la concentración de 0.5 µg en alúmina y si con el adyuvante.

- Figura 10: Muestra la reducción de la IgE anti-alergeno en el preparado vacunal (Grupo V a VII) en comparación con controles positivos (Grupos III y IV) evaluados por anafilaxia cutánea pasiva. A, Alergeno; Va, VA-MENGOC-BC® y Al, AL(OH)₃. Los sueros fueron evaluados antes To, después de 1ra, T15 y 14 días después de 2da dosis, T35. Las respuesta en los grupos vacunales (V-VII) son menores que en los grupos inmunizados con alergeno en alúmina (III y IV). No se observo respuesta en los controles negativos (I y II).

- Leyenda: -, ausente; +, presente; A, Alergeno; Va, Proteoliposoma + polisacárido C de *N. meningitidis* + Alúmina (Al).

- Figura 11: Respuesta de anticuerpos hacia las formulaciones de alergenios unidos covalentemente (conjugados) al Proteoliposoma. Los ratones fueron inmunizados con 2 dosis de 5 µg de Der s 1, en diferentes variantes: De (alergeno libre); De-PLS (conjugado con Proteoliposoma); [De-PLS]Alum (Conjugado adyuvado en Hidróxido de Aluminio. La respuesta fue evaluada en la semana 8 después de la primera inmunización. Las barras verticales indican la desviación estándar.

REIVINDICACIONES

- 1) Composición vacunal contra las alergias caracterizada porque comprende:
 - a) proteoliposomas derivados de bacterias Gram-negativas que inducen un patrón de respuesta celular Th1;
 - b) uno o más alérgenos en su estado natural o modificados;
 - c) un adyuvante apropiado.
- 2) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque el proteoliposoma proviene de una bacteria del género *Neisseria*.
- 3) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada porque el proteoliposoma proviene de la especie *N. meningitidis*.
- 4) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizada porque el proteoliposoma proviene de *N. meningitidis* serogrupo B.
- 5) Composición vacunal según las reivindicaciones de la 1 a la 4, caracterizada por que la misma contiene entre 20 y 75 µg de proteoliposoma por dosis.
- 6) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque el alérgeno es de naturaleza peptídica, glicopeptídica o polisacáridica y causa sensibilización alérgica en humanos o en animales.
- 7) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque los alérgenos provienen de ácaros domésticos.
- 8) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada porque los alérgenos provienen de ácaros del género *Dermatophagoides*.
- 9) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizada porque el alérgeno proviene de la especie *D. siboney*.
- 10) Composición vacunal de acuerdo con las reivindicaciones 8 y 9, caracterizado porque los alérgenos principales son los alérgenos del Grupo 1 (Der s 1, Der p 1, Der f 1) y del Grupo 2 (Der s 2, Der p 2, Der f 2).
- 11) Composición vacunal de acuerdo con las reivindicaciones de la 6 a la 10, caracterizada porque el alérgeno se encuentra a razón de 0.1 a 1 unidad por cada 10 unidades de proteoliposoma y entre 0,25 y 7,5 µg por dosis.
- 12) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque el alérgeno se le incorpora un residuo lipofílico unido covalentemente.

- 13) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizada porque el residuo lipofílico unido covalentemente es un ácido graso bipolar con 16 a 20 carbonos.
- 14) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque el adyuvante es seleccionado del grupo consistente en Hidróxido de Aluminio y Fosfato de Aluminio.
- 15) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizada porque el adyuvante es adicionado a razón de 10 a 25 veces por unidad de proteoliposoma y su contenido final es de 250 a 1000 µg por dosis.
- 16) Composición vacunal según la reivindicación 1, caracterizada porque contiene adicionalmente polisacáridos naturales o sintéticos.
- 17) Composición vacunal según la reivindicación 16, caracterizada porque el polisacárido proviene del género *Neisseria*.
- 18) Composición vacunal según la reivindicación 17, caracterizada porque el polisacárido proviene de la especie *N. meningitidis*.
- 19) Composición vacunal según la reivindicación 18, caracterizada porque el polisacárido proviene de *N. meningitidis* serogrupo C.
- 20) Composición vacunal de acuerdo con las reivindicaciones 16 a la 19, caracterizada porque el polisacárido es adicionado en una razón de 0.5 a 4 veces con respecto al proteoliposoma.
- 21) Método para la obtención de las composiciones vacunales de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 20, caracterizada por que los alérgenos de ácaros del género *Dermatophagoides* son preparados y purificados siguiendo los siguientes pasos:
- a) liofilización o concentración por ultrafiltración del extracto alérgico hasta una concentración de proteínas de 10 a 100 mg/mL;
- b) precipitación en solución de sulfato de amonio 50 – 100% y colecta del precipitado;
- c) fraccionamiento mediante cromatografía de tamizaje molecular empleando como matrices Sephacryl S-100, Sephacryl S-200, Sephacryl S-300 o Superdex 75 y colecta de la fracción que corresponde a los pesos moleculares 10-60 kDa;

- d) liofilización o concentración por ultrafiltración hasta una concentración de proteínas entre 10 y 100 µg/mL para el proceso de adyuvación.
- e) unión del alergeno al proteoliposoma en proporciones de 0.1 a 1 unidad por cada 10 unidades de peso del proteoliposoma;
- 5 f) agitación de 60 a 600 rpm entre 30 y 90 minutos
- g) adición del adyuvante seleccionado del grupo compuesto por Hidróxido de Aluminio y Fosfato de Aluminio en proporciones de 2 a 6 veces el peso del proteoliposoma; y
- 10 h) homogenización de la mezcla con agitación de 60 a 600 rpm entre 30 y 90 minutos.
- 22) Método según la reivindicación 21 caracterizado porque la unión del alergeno al proteoliposoma del paso (e) es de forma covalente o no covalente.
- 23) Método según las reivindicaciones 21 y 22, caracterizado porque adicionalmente comprende los pasos de:
- 15 a) adición de un polisacárido en proporciones de 0.5 a 4 veces en relación al proteoliposoma; y
- b) homogenización por agitación a 60-600 rpm de 30 a 90 minutos.
- 24) Método de tratamiento profiláctico o terapéutico para las alergias, caracterizado porque se emplea la composición de las reivindicaciones de la 1
- 20 a la 20 en un esquema de aplicación de 2 hasta 4 dosis por vía parenteral o mucosal del alergeno espaciando dichas dosis entre 2 y 6 semanas.

Figura 1.

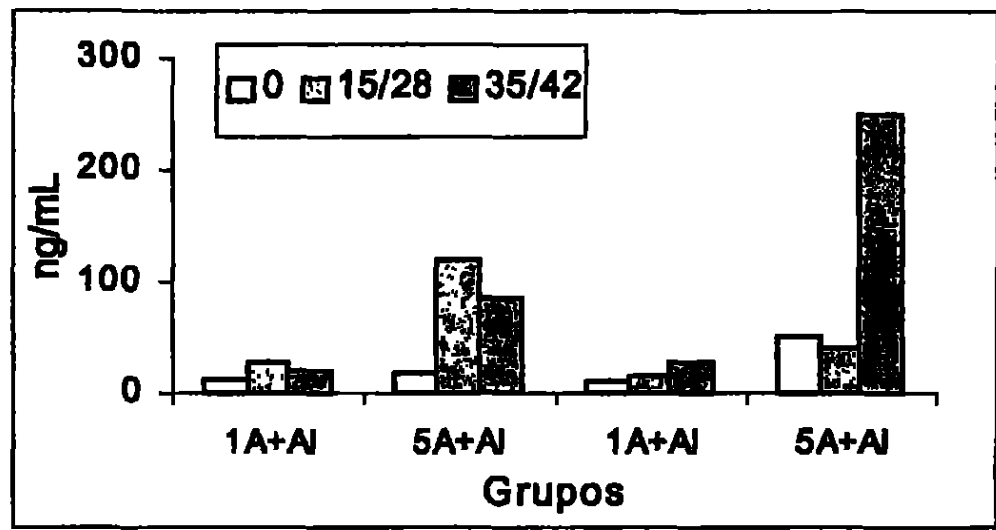


Figura 2.

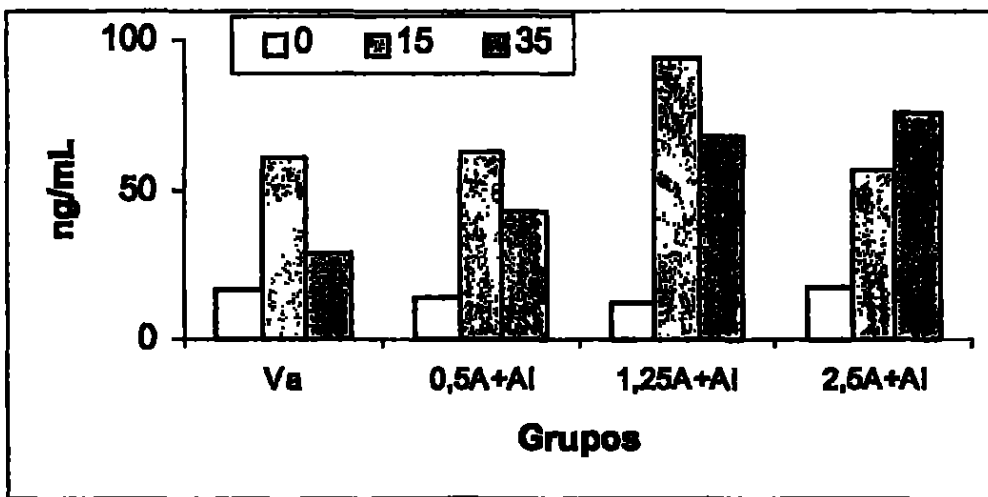


Figura 3.

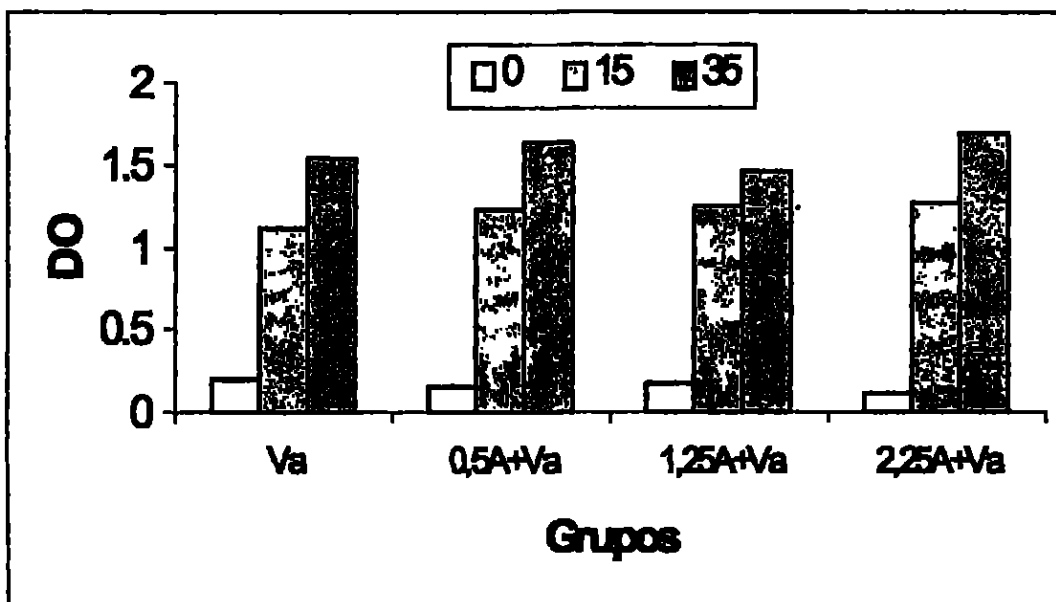


Figura 4.

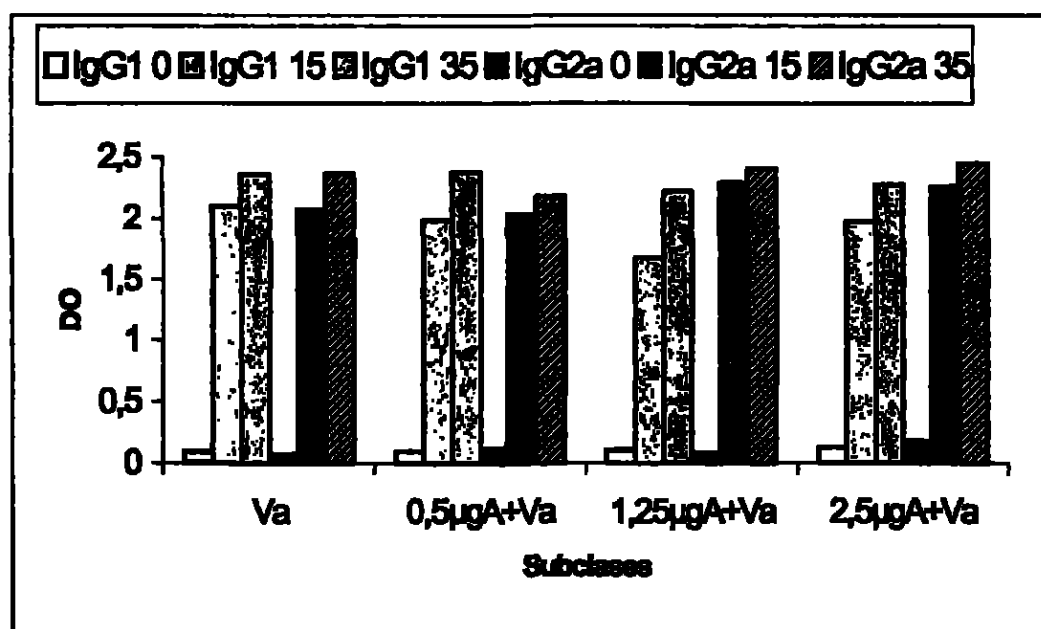


Figura 5A.

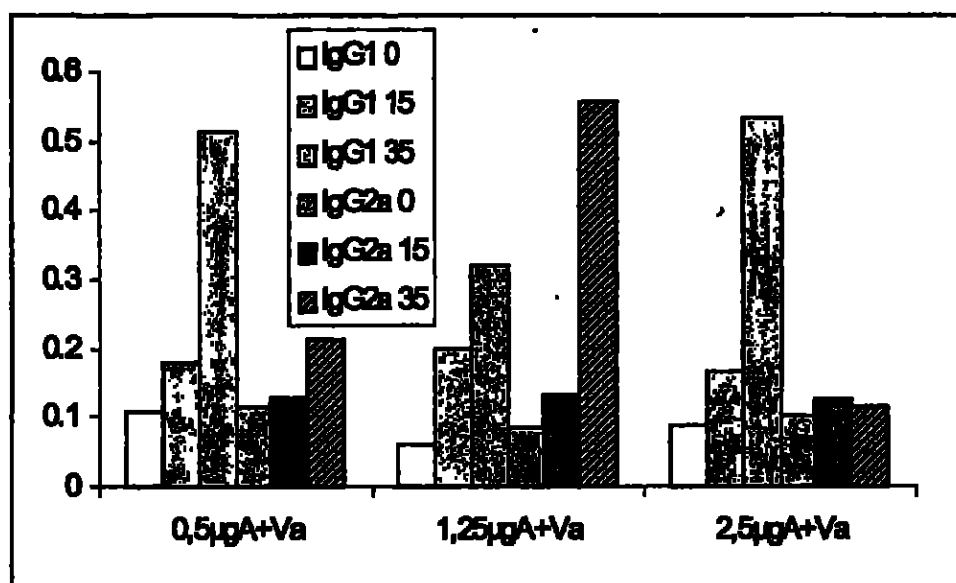


Figura 5B.

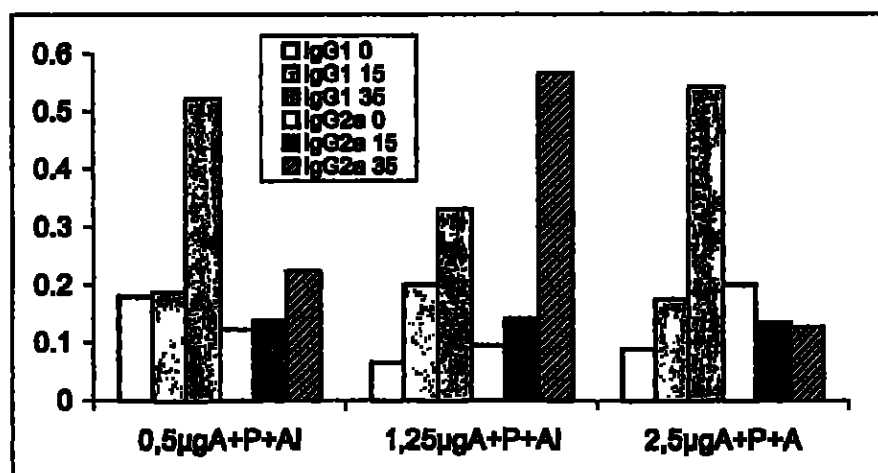


Figura 6.

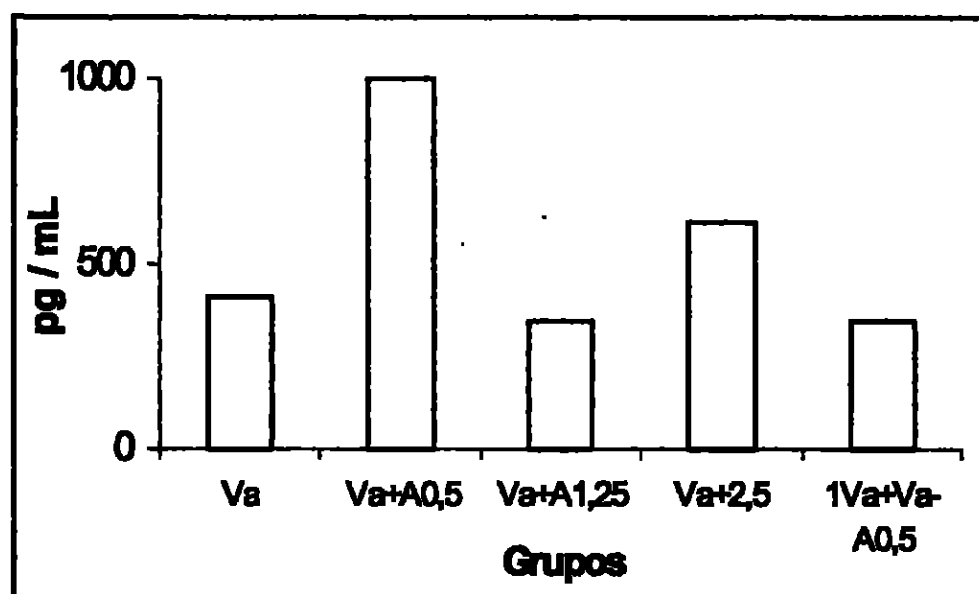


Figura 7A.

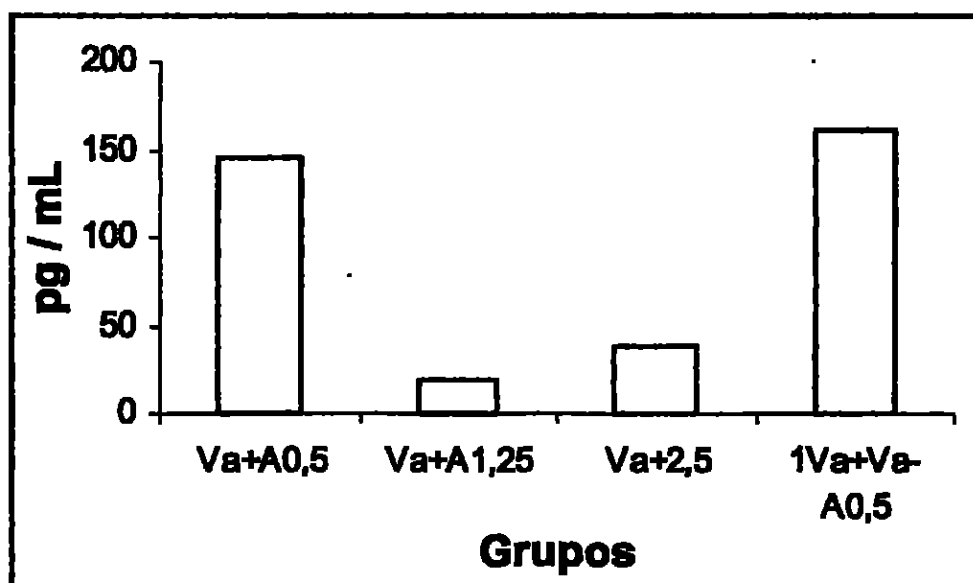


Figura 7B.

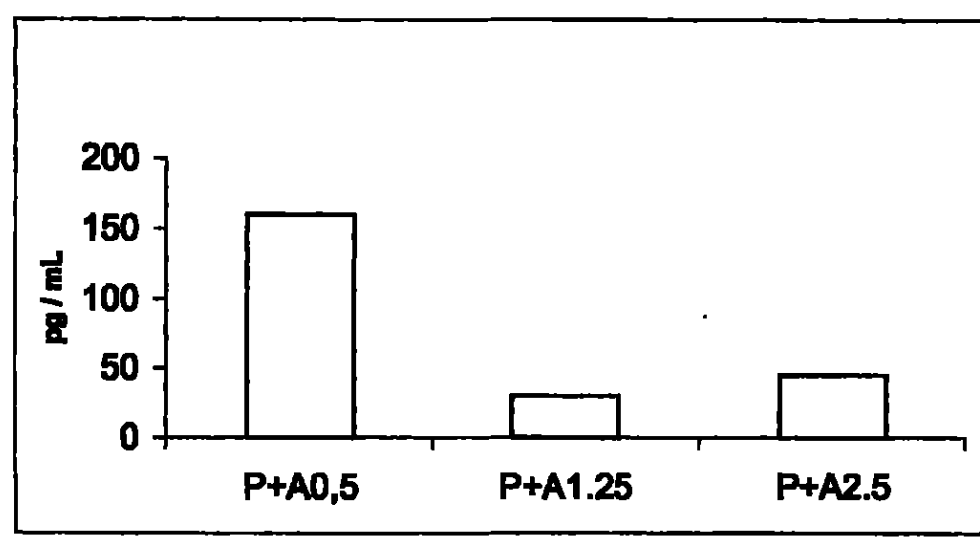


Figura 8.

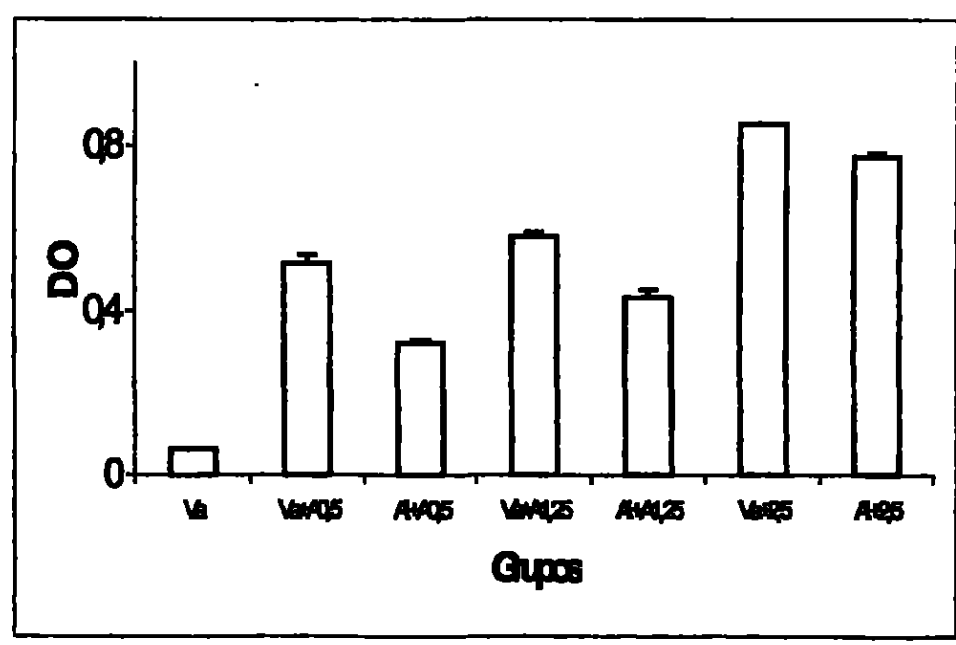


Figure 9.

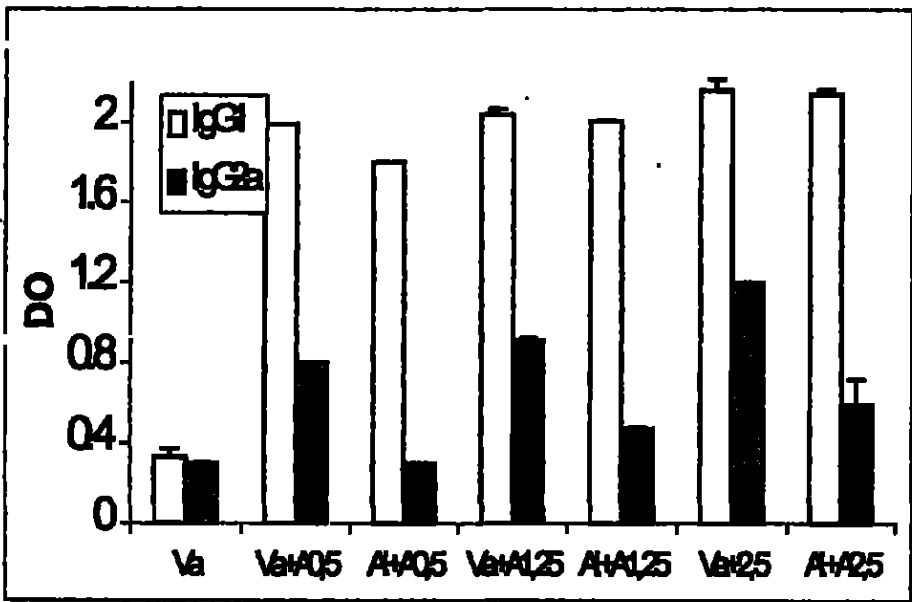


Figure 10.

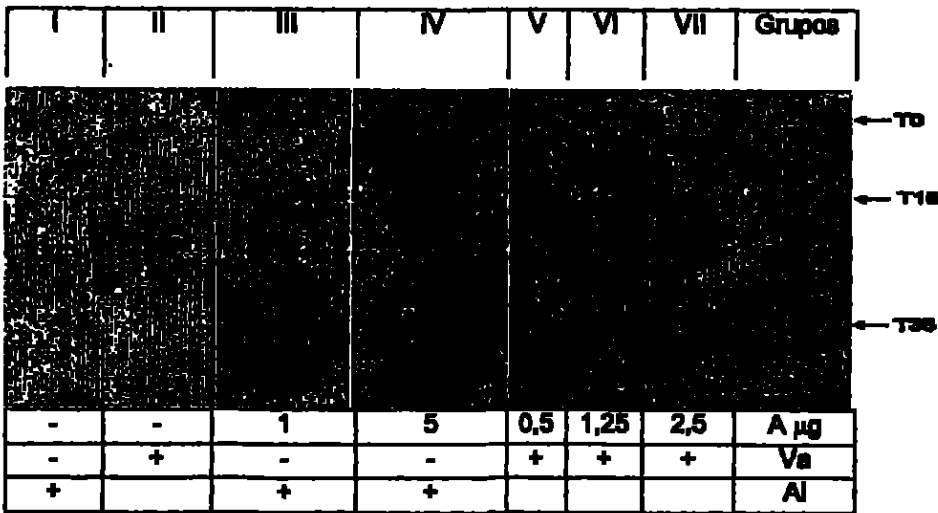
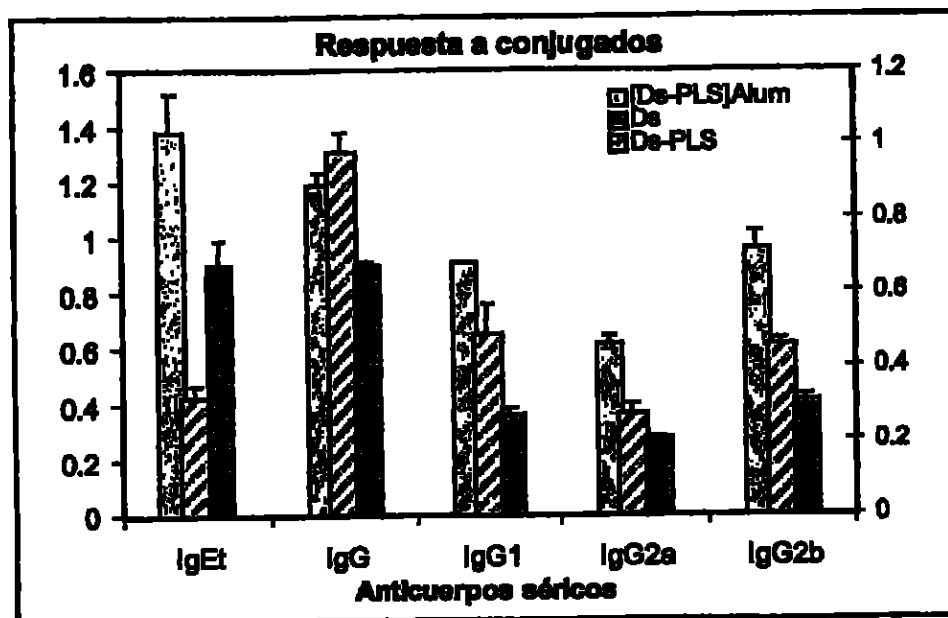


Figura 11.



COMPOSICIÓN VACUNAL CONTRA LAS ALERGIAS, MÉTODO PARA SU OBTENCIÓN Y EMPLEO EN EL TRATAMIENTO DE LAS MISMAS.

La presente invención se relaciona con el campo de la Inmunología,
5 específicamente con la rama de la Inmunoalergia y en particular con el empleo de
adyuvantes o portadores para modular la respuesta inmunológica hacia los
alergenos, con el objetivo de inducir cambios que reduzcan o prevengan el efecto
patogénico de dicha respuesta hacia esos compuestos.

10 Las alergias son una patología muy frecuente, sobre todo en los países
industrializados. En la alergia intervienen una serie de mecanismos
inmunopatológicos, el más común de ellos es la denominada. hipersensibilidad de
tipo-I o anafiláctica. La fisiopatogenia de la misma está basada en la producción
incrementada de IgE, un anticuerpo citotrópico, que se produce frente a sustancias
15 denominadas alergenios, tras un primer contacto que se conoce como
sensibilización. La IgE se une a los mastocitos tisulares y basófilos sanguíneos
logrando así prolongar su vida media de horas en sangre a meses en los tejidos.
En contactos posteriores con el alergenio se produce el reconocimiento de los
mismos y el entrecruzamiento de las IgE de superficie, la transmisión de señales
20 hacia el citoplasma y la degranulación celular y liberación de los mediadores de
las alergias entre los que se encuentran la histamina, la serotonina y las kininas.

Las enfermedades alérgicas más comunes son la rinitis, el asma, y la dermatitis
atópica. El asma alérgica es una enfermedad inflamatoria crónica. La
25 inmunopatogénesis del asma es compleja y en ella participan, además de los

mecanismos IgE dependientes (causantes de la respuesta anafiláctica inmediata tipo I), los linfocitos Th2, los cuales inducen y mantienen la respuesta inflamatoria mediante el reclutamiento y activación de otras células y en particular a través de la producción de IL-5, la cual es responsable del reclutamiento y activación de los eosinófilos. La eosinofilia juega un papel importante en el surgimiento de la hiperreactividad bronquial, la cual es una característica esencial del asma.

Los alérgenos más comunes son el polen, los ácaros, el polvo de las casas, el moho, las drogas, los alimentos y los pelos de los animales. En particular los alérgenos domésticos y en primer lugar los ácaros, son causantes de alergias respiratorias y asma.

Las manifestaciones clínicas son tratadas fundamentalmente con antihistamínicos, simpaticomiméticos, cromoglicato de sodio y esteroides. Estos tratamientos son generalmente inadecuados, pues tratan los signos y síntomas y no su etiopatogenia, por lo que en la actualidad se va en busca de otros procedimientos más efectivos entre los que se encuentran la inmunoterapia o vacunas terapéuticas.

Tradicionalmente la terapia de hiposensibilización o inmunoterapia con extractos alérgicos ha sido ampliamente utilizada en el tratamiento de las enfermedades alérgicas. En este tipo de tratamiento los pacientes son hiposensibilizados mediante la administración por vía subcutánea de los alérgenos específicos. Se comienza con la inyección de una pequeña dosis de dicho alérgeno y si no ocurren reacciones alérgicas, se va aumentando la misma con una frecuencia

semanal. Las dosis se continúan incrementando gradualmente hasta alcanzar una dosis de mantenimiento mensual o bimensual. Este tratamiento se puede prolongar varios años (WHO Position Paper. Allergen Immunotherapy: Therapeutic Vaccines against Allergic Diseases. Geneva, January 1998).

5

A pesar de considerarse un método relativamente eficaz en ciertas alergias, la inmunoterapia ha sido cuestionada debido a su falta de seguridad, pues se expone al paciente a reacciones anafilácticas que eventualmente puede incluso causar su muerte. También el elevado número de inyecciones a administrar, que pueden alcanzar hasta unas 100 ó 200 en un tratamiento de 3 años, constituye un serio inconveniente en su aplicación práctica, lo cual causa frecuentemente el abandono prematuro del mismo sin lograr la eficacia esperada.

10

15

Cada vez se conoce más sobre los mecanismos de inducción de los altos niveles de IgE en los alérgicos. Estos son inducidos a través de mecanismos inmunológicos propios de la respuesta de tipo Th2 y en particular por una sobreproducción de IL-4. Las células Th2 están involucradas patológicamente no sólo a través de su papel regulatorio (la IL-4 induce el cambio de clase hacia IgE en los linfocitos B, mediado por una señal de contacto provista por las Th) sino también que participan también de modo más directo en la fase efectora de la respuesta alérgica tardía y en la inflamación crónica asmática.

20

25

La exposición a alérgenos ambientales, además de la predisposición genética propia del individuo, constituye el fenómeno desencadenante de la sensibilización alérgica, en primer lugar y de las reacciones alérgicas posteriores en los individuos

previamente sensibilizados.

El mecanismo inmunológico responsable de la mejoría clínica de los pacientes durante la inmunoterapia con extractos alérgicos no está aún totalmente dilucidado. Sin embargo, se conoce que se producen cambios inmunológicos vinculados con la disminución a largo plazo de los anticuerpos IgE específicos al alérgeno, la disminución de la secreción de IL-4 e IL-5 y el incremento de anticuerpos IgG e IFN- γ . Estos cambios indican una disminución del patrón de respuesta Th2 como posible consecuencia de la inducción de un patrón Th1 concurrente no patogénico (WHO Position Paper. Allergen Immunotherapy: Therapeutic Vaccines Against Allergic Diseases. Geneva, January 1998)

Los patrones Th1/Th2 de respuesta inmunológica se distinguen primeramente por el patrón típico de citoquinas que secretan las células Th, fundamentalmente, IFN- γ e IL-2 por las Th1 e IL-4 e IL-5 por las Th2 (Mossman, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A, and R. L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cells clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol. 136:2348-2357). Por otra parte, también es posible valorar el tipo de respuesta inducida determinando los perfiles de clases y subclases de inmunoglobulinas séricas que estos inducen. Así en los murinos, el patrón Th1 induce preferentemente anticuerpos de la subclase IgG2a (dependiente de IFN- γ), mientras que el Th2 induce IgE y subclase IgG1 (dependientes de IL-4). En los humanos el Th1 cursa con anticuerpos IgG1/IgG3 y el Th2 con IgE.

Aunque la aparición y desarrollo de las alergias está relacionada con factores de

tipo ambiental, el papel básico en la propensión del individuo a desarrollar una respuesta Th2/IgE hacia antígenos ambientales, es de orden genético (Holgate ST. Genetic and environmental interaction in allergy and Asthma. J Allergy Clin Immunol 1999; 104:1139-1146). Esto se traduce en que, la descendencia de

5 padres alérgicos lo serán también con una mayor frecuencia que los hijos de padres no alérgicos. Esta frecuencia se ha estimado en 75, 50 y 25% si ambos parentales, la madre o el padre son alérgicos, respectivamente, lo que significa que existe una alta probabilidad de predecir el comportamiento de un individuo dentro de la población y por tanto de ésta, si se tiene un sistema de detección a

10 nivel parental. También es conocido que el afianzamiento del patrón patológico Th2 ocurre en los primeros 6-24 meses de vida del niño y que factores ambientales como la exposición a infecciones bacterianas pueden influir de forma positiva en la enfermedad induciendo un patrón Th1, que contraregula el Th2 alérgico (Holt PG, Programing of Allergen Specific Th-memory during Childhood. Proceedings XVII International Congress of Allergology and Clinical Immunology. Sydney 2000. Allergy Clin Immunol International Suppl. 1, 2000 pp 83-85). Estos

15 hallazgos dejan entrever la posibilidad de diseñar vacunas anti-alérgicas profilácticas, que prevengan el afianzamiento del patrón Th2 hacia los alergenos, en la temprana infancia. Estas vacunas podrían estar basadas en el empleo de

20 adyuvantes Th1 que fueran efectivos durante la lactancia.

Se han intentado varias formas de mejorar la inmunoterapia con alergenos, tratando de reducir sus aspectos negativos, preservando o ampliando sus beneficios. En particular, se conoce que existen varios métodos para modificar los

25 alergenos de modo que se reduzca su alergenidad (es decir, su afinidad por los

anticuerpos IgE) y su capacidad para inducir IgE tras la inmunización, así como incrementar su inmunogenicidad (es decir, su capacidad para inducir una respuesta eventualmente terapéutica o protectora). Entre ellos se encuentran métodos físicos por adsorción o inclusión de los alergen^{os} para crear un efecto de depósito (adyuvantes) o métodos químicos que modifican las moléculas alérgicas mediante enlaces covalentes con otros compuestos o entre ellas mismas.

Como agentes físicos se han empleado la tirosina (Patente No. GB 1,377,074), el éster de tirosina (Patente No. US 4,428,932); los liposomas (Solicitud de patente WO 89/10753); el monofosforil lípido A (MLA) y el MLA 3 desacilado (Patente No. US. 5,762,943); la saponina (Patente No. US. 4,432,969) y los tradicionales hidróxido de aluminio y fosfato de calcio.

Entre los agentes químicos que se han empleado para la polimerización de los alergen^{os} está el formaldehído (Marsch DG et al. Studies on allergoids from naturally occurring allergens. III. Preparation of Ragweed pollen allergoids by aldehyde modification. J. Allergy Clin. Immunol. 1981;68:449-59); Alginato (Corrado OJ et al. Allergy 1989;44:108-5) y glutaraldehído (Patente No. GB 1,282,163). También se han empleado mPEG (Dreborg et al. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1990;6:315-65) y conjugaciones a polisacáridos (Solicitud de patente europea No. EP 008 3497 A2).

Estas soluciones logran, en algunos casos (por Ej. los alergen^{os} polimerizados con glutaraldehído y adyuvados con Alúmina, Grammer et al, Modified forms of

allergen immunotherapy, *J Allergy Clin Immunol* 1985;44:108-15), incrementar los títulos de anticuerpos IgG dirigidos contra los alérgenos en modelos animales. Sin embargo, el incremento de esta clase de anticuerpos no implica necesariamente una mejoría clínica del paciente, sobre todo si va acompañada de un incremento paralelo de los anticuerpos IgE. De hecho, algunas de las subclases de la IgG (IgG1 en los ratones e IgG4 en humanos) están implicadas también en diferentes formas de la reacción alérgica, por ser capaces de fijarse, aunque transitoriamente, a los mastocitos. Por otra parte, las evidencias clínicas en humanos indican que el incremento de los anticuerpos IgG no está directamente correlacionado con la mejoría clínica del paciente, sugiriendo que el mismo juega solamente un papel secundario en el mecanismo regulatorio inducido por el tratamiento (Rak S, Lowhagen O, Venge P. The effect of immunotherapy on bronchial hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein in pollen-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82:470-80 y Jutel M, Müller U, Fricker M, Rihs S, Pichler W, Dahinden C. Influence of bee venom immunotherapy on degranulation and leukotriene generation in human blood basophils. *Clin Exp Immunol* 1996;12:1112-18).

El empleo de alérgenos modificados químicamente (alergoides) aunque tiene algunas ventajas en cuanto a reducción de las reacciones secundarias durante el tratamiento, en comparación con los extractos alérgicos tradicionales, no producen una significativamente mejoría clínica (Bousquet et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1989;84:546-56 y Grammer et al al. *J Allergy Clin Immunology* 1985;76:397-401). Otro de los inconvenientes de los alergoides empleados hasta el momento en la clínica (modificados por glutaraldehído o formaldehído), es la

imposibilidad práctica de lograr una composición estandarizada de los productos, ya que los mismos se obtienen mediante reacciones químicas a partir de los extractos alérgicos, los cuales constituyen mezclas heterogéneas de polipéptidos y otras biomoléculas. En estas reacciones se obtienen inevitablemente especies moleculares con diferentes grados de polimerización o modificación química, las cuales pueden constituir subproductos no deseables, difíciles de eliminar.

El empleo de hidróxido de aluminio sólo ha logrado reducir el número de inyecciones necesarias para lograr el mismo efecto que con los alérgenos no adyuvados, lo cual se debe a su efecto de depósito y liberación lenta. Sin embargo, este adyuvante propicia la producción de IgE, tanto en animales como en humanos provocando un típico patrón Th2, lo cual podría eventualmente reforzar la respuesta alérgica patogénica durante su administración.

El fosfato de calcio o la tirosina se han empleado también como adsorbentes para crear depósitos y producir la liberación lenta de los alérgenos, sin embargo no han mostrado ventajas de consideración con respecto a los extractos acuosos o adyuvados con Alúmina, en cuanto a mejorar la eficacia o la seguridad del tratamiento (Altintas DU et al. Comparison between the use of adsorbed and aqueous immunotherapy material in Dermatophagoides pteronyssinus sensitive asthmatic patients. Allergologie et Immunopathologie 1999; 27(6):309-317).

Ninguna de las soluciones existentes en la actualidad, enumeradas anteriormente, logra inducir una modulación inmunológica completamente efectiva (expresada en

inhibición o reducción del patrón Th2 o inducción del Th1) ya sea en animales o en humanos, ni eficacia clínica en estos últimos, empleando un número reducido de inyecciones.

5 El empleo de liposomas que contienen alergen^{os} ha sido descrito en la solicitud de patente WO 89/10753. Los liposomas, además de crear un depósito y reducir la alergen^{icidad} del producto, se cree que influyan en los mecanismos de presentación de los antígenos al sistema inmune, debido a su naturaleza lipídica y particulada (WHO Position Paper. Allergen Immunotherapy: Therapeutic Vaccines
10 against Allergic Diseases. Geneva, January 1998). Sin embargo, este enfoque no ha podido extenderse a la práctica clínica debido a la inestabilidad característica de estos preparados, así como a inconvenientes relacionados con la tecnología para la inclusión de forma consistente de los alergen^{os} dentro de los liposomas. La falta de estabilidad de la formulación de los liposomas durante su conservación
15 o durante su administración al paciente tiene implicaciones serias en la seguridad del producto, ya que la eventual liberación de los alergen^{os} de los liposomas puede provocar reacciones anafilácticas severas, de la misma forma que ocurren con los alergen^{os} en estado acuoso. Tampoco en ese caso se han logrado evidencias de la inducción de una respuesta inmunológica que afecte el balance
20 Th1/Th2 y que induzca un patrón no patológico o protectogénico.

Las estrategias más recientes que se conocen intentan emplear formulaciones de alergen^{os} con adyuvantes inductores de respuesta Th1, tales como el monofosforil lípido A (MLA) (Patente US. 5,762,943), proteínas de shock térmico ("Heat Shock
25 Proteins", HSP, siglas en inglés), también conocidas como proteínas de estrés de

micobacterias, lo cual es descrito en la patente WO9823735. En el caso del MLA, el cual constituye una variante detoxificada de LPS, se ha demostrado que reduce los niveles de IgE específica, incrementando la IgG en experimentos en ratones, sin embargo no se ha demostrado que reduzca de modo efectivo el componente celular Th2 de la respuesta alérgica, de modo que su uso estaría limitado estrictamente a las enfermedades alérgicas para las cuales el mecanismo de hipersensibilidad tipo 1 sea el principal, lo cual excluirla el asma. Otro de los inconvenientes, es que aunque se logra atenuar el efecto tóxico de los LPS, no se elimina por completo la toxicidad (Baldrick P et al. Vaccine 20, 2002 737-743), lo cual podría limitar su uso en niños de pequeña edad. En el caso de las HSP, no se han provisto evidencias experimentales de que las mezclas o conjugados de dicha proteínas con los alergenos produzcan un efecto de desviación de la respuesta Th2 específica a los alergenos, ya sea en modelos animales o en humanos.

El empleo de proteoliposomas derivados de la membrana externa de bacterias Gram-negativas se ha descrito para la preparación de vacunas profilácticas contra enfermedades infecciosas por Ruegg CL y cols. (Preparation of proteosome-based vaccines. J Immunological Methods 1990;135:101-9); Lowell y cols. (Proteosome-Lipopeptide Vaccines: Enhancement of Immunity for Malaria CS Peptides. Science 1988;240:800-2); también en la Pat. No. US No. 5,597,572. En esta última, el núcleo fundamental es el proteoliposoma o vesículas de membrana externa (VME) derivados de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, cuya estructura particulada, sus trazas de lipooligosacáridos (LPS) incorporadas en las VME, el polisacárido C, su composición lipídica característica y su adsorción en alúmina, están relacionadas con su inmunogenicidad y probada protectogenicidad en humanos.

A pesar de contener LPS, dicha formulación vacunal no provoca efectos tóxicos en humanos ni animales, lo cual es atribuido a la peculiar estructura y composición de las VME. Por otra parte se logra retener el efecto inmunomodulador y adyuvante de los LPS.

5

La vacuna basada en este proteoliposoma ha sido aplicada en más de 50 millones de dosis y ha demostrado ser segura, no reactogénica y eficaz para proteger contra *N. meningitidis* serogupos B y C. Es además, aplicada durante la lactancia de forma segura y eficaz, donde convierte la T-independencia del Polisacárido C en un antígeno T-dependiente. Esta vacuna induce un patrón preferencial Th1 caracterizado por la inducción en humanos y animales de linfoproliferación; anticuerpos IgG anti-VME; subclases IgG1 en humanos e IgG2a en ratones; IFN γ , IL-2 e IL-12 a nivel de ARNm y proteínas, y la no inducción de IgE anti-VME ni incrementos en la IgE total, ni tampoco de la IL-4, IL-5 a nivel de ARNm ni proteico (Infect Immun. 2001, 69(72001):4502–4508). La respuesta inducida por la vacuna, como es característico de la inmunidad adaptativa, es específica a los antígenos bacterianos que componen el producto, y por consiguiente, no hay evidencias de que induzca respuesta alguna contra los alérgenos conocidos.

10

15

20

25

El objetivo técnico de la presente invención es obtener una preparación farmacéutica de uso terapéutico o profiláctico empleando proteoliposomas bacterianos, en lo adelante denominados proteoliposomas, la cual al ser aplicada en un paciente que padece de alergias, es capaz de transformar la respuesta alérgica (Th2) inducida por el alérgeno, hacia una respuesta celular Th1. La invención también incluye el esquema de inmunización con dicha composición

vacunal. Es también un objetivo de la presente invención proveer una composición farmacéutica capaz de prevenir la aparición y desarrollo de la enfermedad alérgica en niños con antecedentes familiares atópicos.

- 5 Esta composición puede contener uno o varios alérgenos los cuales se pueden acoplar o administrar conjuntamente con un proteoliposoma, induciéndose una respuesta inmunológica terapéutica o protectora en el individuo alérgico, al o a los alérgenos en cuestión. Esta respuesta se caracteriza por una menor producción de anticuerpos IgE con respecto a la inmunoterapia tradicional, la no inducción de
10 IL-5, así como la inducción de anticuerpos de subclase IgG1 (en humanos) e IgG2a (en murinos) y las citocinas IFN γ e IL-2 (en ambos), correspondientes a una respuesta Th1, elementos que evidencian la transformación de la respuesta Th2 alérgica hacia una celular, Th1.
- 15 Es otro objetivo de esta invención proveer el método para acoplar dicho (s) alérgeno (s) con el proteoliposoma y otros adyuvantes, así como proveer una composición farmacéutica apropiada para su administración por vía parenteral.
- La novedad de la invención radica primeramente en el uso de proteoliposomas derivados de proteínas de la membrana externa de bacterias Gram-negativas y
20 más particularmente de *Neisseria meningitidis* B, los cuales pueden estar solos o unidos a un polisacárido; para ser posteriormente acoplados de forma no covalente o covalente con una o varias proteínas alérgicas y de esa forma ser administrados a los individuos alérgicos.

Es particularmente novedoso que la composición farmacéutica de la presente invención induce una modulación de la respuesta inmune específica a los alérgenos incluidos en la misma, hacia un patrón Th1 no patogénico y protector, empleando solamente 2 inyecciones.

5

Otro aspecto novedoso es su aplicación profiláctica en descendientes de parentales alérgicos o en individuos atópicos diagnosticados tempranamente.

Es también novedoso el procedimiento empleado para el acople no-covalente de los componentes de la formulación y particularmente del proteoliposoma y de los alérgenos, así como el empleo de alérgenos purificados con ese propósito.

10

En la presente invención se emplean proteoliposomas o VME purificadas a partir del cultivo de bacteria Gram-negativas en particular de *N. meningitidis* B según se describe en la Patente No. US 5,597,572.

15

En la presente invención se emplean alérgenos preferentemente de naturaleza proteica o glicoproteica aunque también es posible emplear alérgenos polisacáridicos. Los mismos son obtenidos a partir de fuentes alérgicas naturales por métodos de extracción y purificación conocidos en el arte o de forma recombinante expresados en microorganismos o células superiores. Alternativamente se pueden emplear polipéptidos obtenidos por síntesis química cuya secuencia de aminoácidos se corresponde con los alérgenos nativos. Particularmente, se emplean alérgenos respiratorios y en primer lugar de ácaros del polvo doméstico de la familias *Piroglyphidae* o *Glyciphagidae*, especialmente de los géneros *Dermatophagoides* o *Blomia* y específicamente de las especies

20

25

Dermatophagoides siboney, *Dermatophagoides pteronyssinus* o *Dermatophagoides farinae*. Los alergen^{os} purificados de dichas especies de ácaros se obtienen a partir de cualquier extracto al^{er}génico comercial, el cual es sometido primeramente a liofilización o concentración por ultrafiltración hasta una

5 concentración de proteínas de 10 a 100 mg/mL y a continuación a precipitación salina en solución de sulfato de amonio 50 – 100%. El precipitado es fraccionado mediante cromatografía de tamizaje molecular empleando como matrices Sephacryl S-100, Sephacryl S-200 o Sephacryl S-300 o Superdex 75, colectándose el pico que corresponde a los pesos moleculares 10-60 kDa. Esta

10 fracción contiene fundamentalmente los Alergenos mayores del Grupo 1 (glicoproteínas de 25 kDa: Der s 1, Der p 1) y Grupo 2 (proteínas de 15 kDa: Der s 2, Der p 2). Alternativamente, puede ser empleado un procedimiento de purificación independiente para cada uno de los alergen^{os} por separado, basado en la cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales anti-Grupo 1 y anti-

15 Grupo 2, acoplados a una resina, con la posterior formulación de ambos componentes importantes en un solo preparado o la unión a los Proteoliposomas por separado.

La unión de ambos componentes básicos (alergeno y proteoliposoma) se realiza

20 por métodos covalentes o no covalentes, teniendo en cuenta las propiedades de cada alergeno en particular. En el caso de la unión no covalente, los alergen^{os} de ácaros, se incorporan en concentraciones de alergeno de 0,1 a 1 µg por cada 10 µg de proteoliposoma. Esta incorporación se realiza mediante agitación durante 30 a 90 minutos a 60 a 600 rpm, aprovechando las interacciones de tipo hidrofóbico o

25 lipofílico entre ambos componentes. La mezcla obtenida puede ser administrada

directamente en solución acuosa o adsorbida en alúmina. En el caso del empleo de alúmina, el alérgeno se adsorbe a la misma antes del proteoliposoma o preferentemente posterior a éste. La alúmina se emplea de 10 a 25 veces la cantidad de proteoliposoma, manteniéndose la proporción entre éste y el alérgeno.

5 La adsorción a la alúmina se realiza mediante agitación lenta entre 60 a 600 rpm y pH de 6 a 8.

La efectividad de la adsorción de cada alérgeno a la Alúmina puede determinarse empleando métodos ELISA específicos a los mismos, como por ejemplo los ELISA para Der s 1 (Sewer et al. Int Arch Allergy Immunol 2000;123:242–248) o para 10 Grupo 2 del género *Dermatophagoides* (Heymann PW, Chapman MD et al J Allergy Clin Immunol 1989;83:1055 –1067.)

La unión del proteoliposoma y el alérgeno también puede realizarse de forma 15 covalente a través de la unión de un espaciador al proteoliposoma por los grupos aminos libres presentes en éste y a continuación la unión del grupo maleimido a los grupos sulfhidrilo libres presentes en el alérgeno. Tales grupos existen en los alérgenos mayores de los ácaros del polvo (grupo 1 y 2), pero pueden ser también inducidos en otros alérgenos mediante la reducción de los puentes disulfuro o 20 incluidos mediante la derivatización de las proteínas por métodos conocidos. Los conjugados obtenidos se purifican posteriormente mediante diálisis o ultrafiltración y por último mediante cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S-300 ó Superdex 200) para eliminar los reactivos de conjugación, así como los alérgenos no unidos al proteoliposoma. Las moléculas alérgénicas deben constituir entre el 1 25 y el 10% de la masa total del conjugado con el objetivo de lograr la respuesta

inmunogénica adecuada. El conjugado se administra por vía inyectable en un excipiente acuoso apropiado o también adsorbido en gel de Hidróxido de Aluminio u otro adyuvante de depósito.

5 La presente invención también comprende la conjugación por el método antes descrito, de residuos lipofílicos a los alérgenos, tales como ácidos grasos bipolares de 16 a 20 carbonos, para facilitar su incorporación no covalente al proteoliposoma.

10 Alternativamente, la composición vacunal incluye otros antígenos que no afecten al patrón celular inducido y sí potencien la respuesta deseada contra el alérgeno, lo cual permite la obtención de una vacuna polivalente. Los polisacáridos pueden ser uno de estos antígenos y particularmente el polisacárido C de *N. meningitidis*. Estos se adicionan de forma no covalente en concentraciones de 0.5 - 4 veces con
15 respecto al proteoliposoma.

La presente invención también comprende el empleo de alérgenos de naturaleza polisacáridica, tales como los determinantes polisacáridicos con reactividad cruzada ("Cross-reactive Carbohydrate Determinants", CCD, siglas en inglés)
20 (Aalberse, RC. Crossreactivity of IgE antibodies to allergens. Allergy 56 (6), 2001, pp478-490), encontrados en algunos pólenes y alimentos vegetales. En ese caso los mismos se añaden a la formulación al igual que el polisacárido C de *N. meningitidis*.

De forma inesperada, la administración de esta composición por vía parenteral en solo dos dosis, produce no solo una respuesta de tipo Th1 específica a los antígenos del proteoliposoma como ya se conocía con anterioridad, sino también una respuesta similar de tipo Th1 dirigida contra los alérgenos incluidos en la formulación. Sorprendentemente también esta respuesta Th1 se impone, a pesar del empleo en la formulación de Hidróxido de Aluminio preservándose, sin embargo, el efecto de depósito del mismo. Esta respuesta se caracteriza por un patrón de citoquinas compuesto preferentemente por IFN- γ , con ausencia de respuesta de IL-5, también por una inducción de anticuerpos de la subclase IgG2a y una reducción de los anticuerpos IgE e IgG1 en ratones, específicos al alérgeno. La administración de dicha composición no afecta una respuesta preexistente contra los antígenos bacterianos, inducida por una inmunización anterior.

La solución propuesta tiene las siguientes ventajas:

El efecto inmunológico logrado por este preparado permite contrarrestar la respuesta alérgica tanto de tipo anafiláctico (reducción de IgE e IgG1) como la inflamatoria tardía y crónica (reducción de IL-5), lo cual la hace efectiva también en el tratamiento del asma. El efecto terapéutico se debe a la presentación de los alérgenos al sistema inmune en un contexto no alérgico y se alcanza en un número reducido de inyecciones y en un menor tiempo con respecto a la inmunoterapia tradicional con extractos alérgicos. Tal efecto se emplea ventajosamente no solo en el tratamiento de los pacientes alérgicos, sino también permite prevenir el agravamiento de la enfermedad en individuos con un estado

alérgico incipiente o prevenir el desarrollo de nuevas alergias a alérgenos diferentes.

5 El efecto inmunológico de los proteoliposomas como adyuvante inmunomodulador es eficaz y seguro en edades tempranas durante la lactancia, lo cual posibilita la administración de la formulación vacunal en esa edad con fines profilácticos, antes de la aparición y desarrollo de la enfermedad, en niños con antecedentes familiares alérgicos y por lo tanto con alta probabilidad de serlo también.

10 La adsorción de los componentes activos de la formulación en un adyuvante de depósito, particularmente en gel de hidróxido de Aluminio, permite la reducción de la alergenidad del preparado (o sea la capacidad de unión de IgE) en más de 10 veces con relación a una dosis similar de alérgeno en estado acuoso, lo cual implica una reducción considerable de los riesgos de reacciones anafilácticas
15 severas durante su administración. También la adsorción al gel de hidróxido de Aluminio contribuye a prolongar la estabilidad del preparado durante su conservación, al disminuir la cinética de las reacciones químicas que puedan eventualmente causar degradación de los componentes activos.

20 El empleo de alérgenos purificados y particularmente de los alérgenos purificados de ácaros del género *Dermatophagoides*, incluyendo alérgenos de los grupos 1 y 2, permite estandarizar la composición de los productos, determinando y ajustando de forma precisa su contenido en la formulación y su incorporación al proteoliposoma o al gel de hidróxido de aluminio. También en el caso del acople
25 covalente, es posible separar fácilmente los productos no deseados (tales como

los polímeros alérgeno-alérgeno) de los productos activos (conjugados proteoliposoma-alérgeno) gracias a la gran diferencia de masa existente entre ambos componentes, lo cual se realiza empleando métodos de cromatografía de exclusión molecular, disponibles comercialmente. La tecnología es aplicable a alérgenos de diferente naturaleza, siendo posible emplear varios alérgenos en una misma formulación.

La ausencia de toxicidad de la formulación a pesar de contener pequeñas cantidades de LPS, los cuales retienen su efecto inmunogénico, es otra de las ventajas de la solución propuesta que lo hacen apropiado para su administración segura a humanos y en particular a niños en edad temprana.

Los proteoliposomas también convierten a antígenos T-independientes, tales como carbohidratos, en antígenos T-dependientes. Esta propiedad se aplica también de forma ventajosa a los alérgenos de naturaleza polisacáridica, tales como los CCD.

La presente invención será descrita a través de los siguientes ejemplos específicos.

20

Ejemplo 1. Obtención y purificación de alérgenos de ácaros.

Estos preparados se obtienen a partir del cultivo completo de los ácaros, el cual contiene ácaros muertos, exuvias, heces, así como ingredientes no alérgnicos de bajo peso molecular provenientes del medio de cultivo. Los alérgenos son extraídos en solución de bicarbonato de amonio o bicarbonato de sodio o solución

25

salina o solución salina tamponada con fosfato, a un pH cercano al fisiológico. El extracto crudo es clarificado mediante centrifugación y filtración y los componentes de bajo peso molecular son removidos mediante cromatografía de tamizaje molecular (Sephadex G-25) o diafiltración (límite de corte 5-10 kD) o ambos. Este preparado es entonces concentrado mediante ultrafiltración y liofilizado para garantizar su estabilidad. Para lograr un producto con un mayor grado de pureza, el extracto liofilizado es resuspendido en solución acuosa y sometido a precipitación salina en solución de sulfato de amonio 50 – 100%. El precipitado es fraccionado mediante cromatografía de tamizaje molecular empleando Superdex 75, colectándose el pico intermedio que corresponde a los pesos moleculares 10-60 kDa. Esta fracción contiene fundamentalmente los Alergenos mayores del Grupo 1 (25 kDa) y Grupo 2 (15 kDa). Por último, la fracción colectada es liofilizada de nuevo para ser reconstituida en una concentración apropiada para su conjugación o mezcla con el proteoliposoma

Ejemplo 2. Obtención del proteoliposoma.

Para la obtención del proteoliposoma se realiza un cultivo de *N. meningitidis* B y la biomasa colectada mediante centrifugación se somete a un proceso de extracción con detergente, enzimas y ultrasonido. El debris celular es removido mediante centrifugación y el sobrenadante es sometido entonces a digestión con nucleasas para eliminar los ácidos nucleicos. El extracto es recuperado mediante ultracentrifugación, resuspendido en solución con detergente y purificado del resto de los componentes de bajo y mediano peso molecular mediante cromatografía de exclusión molecular. El proteoliposoma así obtenidos contienen menos del 10% de ácidos nucleicos y alrededor de 10% de LPS insertados en su estructura; pero

nunca libres. Opcionalmente, se añade polisacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C producido según Gold y Gotschlich (Gold et al., 1969-1970, WHO Bull. 45: 279-282 and Gotschlich et al., 1969, J. Exp. Med. 129: 1349-1365) de 0.5 a 4 veces el contenido de proteoliposoma. También opcionalmente se puede añadir alúmina al polisacárido-proteoliposoma, como un adyuvante adicional en una proporción de 10 a 25 veces la cantidad de Proteoliposoma. El pH final es $7,0 \pm 0,4$, la adsorción al gel de alúmina del proteoliposoma-polisacárido es mayor del 80% y un contenido de LPS menor del 6% es garantizado. El LPS presente está insertado en el proteoliposoma, por lo que se logra una adecuada presentación al sistema inmune y reduce la posibilidad de inducir reacciones indeseables. Se puede adicionar thiomersal como preservativo a una concentración entre 0.005-0.02%. El producto final es sometido a un conjunto de controles biológicos y físico-químicos.

Ejemplo 3. Determinación de la alergenicidad (unión de IgE humana) de la formulación adsorbida en hidróxido de Aluminio.

La actividad alergénica, expresada como la capacidad de unión de anticuerpos IgE humanos, se determinó mediante ELISA de inhibición de IgE el cual determina la habilidad de la muestra en solución de inhibir la unión de la IgE humana al alérgeno fijado a una fase sólida. La formulación muestra es alérgeno de *D. siboney* purificado según el Ej. 1, mezclado con los proteoliposomas según el Ej. 2 y adsorbidos en gel de hidróxido de Aluminio. La concentración de alérgeno mayor Der s 1, inicial es de 4 µg/mL y la actividad alergénica 400 UB/mL (UB: Unidades Biológicas según la definición de las Guías Nórdicas para el Registro de Productos

alergénicos, 2da Edición. 10 000 UB equivalen a 10 mg/mL de Histamina HCl en la prueba de punción cutánea)

El ELISA se realiza de acuerdo al siguiente procedimiento. Se recubren
5 microplacas de poliestireno con el Extracto Alergénico de Referencia. Se bloquean los sitios de unión inespecífica de la placa con PBS-BSA 1%. A continuación se realiza la inhibición de la IgE sérica del pool de sueros, mediante la incubación del suero con cantidades crecientes del alérgeno muestra y la Referencia, en paralelo. La IgE no-inhibida por los alérgenos en solución, se une al alérgeno fijado a la
10 placa. Después de efectuar el procedimiento de lavado de los anticuerpos unidos inespecíficamente, se realiza la detección de la IgE unida al alérgeno, mediante un conjugado anti-IgE-Peroxidasa. El revelado se realiza mediante la adición de un sustrato cromogénico. La intensidad del color producto de la reacción enzimática es cuantificada mediante un lector de placas ELISA. La interpretación de los
15 resultados del ensayo se realiza mediante el método estadístico de las rectas paralelas. Se construyen curvas de Inhibición para la Referencia y las muestras por separado. Se lleva a cabo una regresión lineal de los valores de Absorbancia vs Inhibición, comprobándose el paralelismo de cada muestra con la Referencia. Por último, se calcula la potencia relativa como el antilogaritmo de la distancia
20 horizontal entre las rectas paralelas.

En el análisis de la muestra dada se obtuvieron los siguientes resultados:

Actividad alérgica: 21.2 UB/mL (IC95% 13.6 – 32.4). Corresponde a un 5.3% de la actividad del alérgeno en estado acuoso inicial.

Ejemplo 4. Determinación del esquema y dosis menos inductoras de IgE total.

Para la determinación del esquema de inmunización (espaciamiento entre dosis) y la concentración de alérgeno, ratones Balb/c fueron tratados por vía intramuscular con dos inmunizaciones en las semanas: 0 y 2 (esquema corto) ó 0 y 4 (esquema largo) con Alérgeno (Al) + Alúmina (A) en concentraciones de 1 ó 5 µg/ratón de alérgeno. En el esquema corto los animales fueron sangrados en la semana 0, 2 y 5, y en el largo en la semanas 0, 4 y 7. El nivel de IgE total en las mezclas de sueros fue determinado por ELISA.

Como puede observarse en la Fig. 1 el esquema corto induce una respuesta de IgE total significativamente menor que el esquema largo. Por otro lado, la menor concentración, 1 µg de alérgeno, no indujo respuesta de IgE total en ninguno de los esquemas. Por ello, los siguientes experimentos fueron realizados con el esquema corto y con concentraciones de alrededor de 1 µg/ratón.

Para aún precisar más la dosis, ratones Balb/c fueron tratados por vía intramuscular con dos inmunizaciones en la semana 0 y 2 y fueron sangrados en la semana 0 y 4. El grupo I recibió proteoliposoma + polisacárido de *N. meningitidis* del serogrupo C + Al(OH)₃. Los grupos II, III y IV recibieron Al(OH)₃ + alérgeno con una concentración de alérgeno de 0,5; 1,25 ó 2,5 µg/ratón/dosis, respectivamente. El nivel de IgE total en los mezclas de sueros fueron determinados por ELISA. Como puede observarse en la Fig. 2, la IgE total no se elevó significativamente en ninguno de los grupos evaluados.

Ejemplo 5. Ausencia de efecto de la incorporación del alérgeno sobre la respuesta anti proteoliposoma y modulación de la respuesta de subclases de IgG anti-alérgeno.

Para la determinación de la ausencia de efecto del alérgeno sobre la respuesta hacia el adyuvante, ratones Balb/c fueron tratados por vía intramuscular con dos inmunizaciones en la semana 0 y 2. El grupo I recibió proteoliposoma + polisacárido de *N. meningitidis* del serogrupo C + Al (OH)₃ (Va). Los grupos II, III y IV recibieron 0,5; 1,25 y 2,5 µg de Alérgeno + Va por ratón. El sangramiento se realizó a los 0, 15 y 35 días después de la primera dosis de inmunización y se determinó la respuesta de IgG y subclases anti-proteoliposoma y anti-alérgeno en las mezclas de los sueros por ELISA.

En la Fig. 3 se muestra los elevados títulos de IgG anti-proteoliposoma detectados y sorprendentemente la no afectación de la incorporación del alérgeno en esta respuesta ni en las subclases de IgG anti-Proteoliposoma estimuladas (Fig. 4). Los altos títulos de IgG2a son la expresión de la preferencial respuesta Th1 inducida por este adyuvante. En la Fig. 5 aparecen las subclases de IgG estimuladas, donde se puede observar el incremento de respuesta IgG2a anti-Alérgeno en las concentraciones menores de alérgeno y preferencialmente en 1,25 y 0,5 µg. La inducción de respuesta de IgG2a frente al alérgeno refleja que el adyuvante fue capaz de modular la respuesta Th2 hacia una Th1.

Ejemplo 6. Producción de IFN γ y no IL-5 por células de bazo de ratones inmunizados y desafiados *in vitro* con proteoliposoma o alérgeno y su correlación con la IgG y las subclases de IgG anti-alérgeno inducidas por los adyuvantes: proteoliposoma + polisacárido C + Al(OH) $_3$ en comparación con el Al(OH) $_3$.

Para la determinación de la respuesta de citocinas Th1 (IFN- γ) y Th2 (IL-5) se inmunizaron ratones Balb/c con dos dosis en las semanas 0 y 2. El grupo I recibió proteoliposoma + polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C + Al(OH) $_3$ (Va). Los grupos II, III y IV recibieron 0,5; 1,25 y 2,5 μ g de Alérgeno + Va por ratón. El grupo V recibió una dosis inicial con Va y otra de 0,5 μ g de Alérgeno + Va. Los animales fueron sacrificados 7 días después de la última dosis, se procesó su bazo por técnicas rutinarias y las células fueron enfrentadas a proteoliposoma o alérgeno. A las 72 horas, los sobrenadantes fueron extraídos y procesados por ELISA para la determinación de IFN- γ e IL-5.

El proteoliposoma indujo la producción de IFN- γ en todos los grupos, en correspondencia con el patrón Th1 inducido por este adyuvante. No obstante, con 0,5 μ g de alérgeno, sorprendentemente, la producción de IFN- γ se vio potenciada tanto en dos dosis como cuando se empleó una dosis previa de Va y una sola con Alérgeno (Fig. 6). Sorprendentemente, el alérgeno también indujo respuesta de IFN- γ en todas las concentraciones empleadas, aunque inesperadamente, ésta fue superior en la concentración de 0,5 μ g tanto con dos dosis como con una dosis y una previa de Va (Fig. 7). No se detectó respuesta de IL-5 frente al proteoliposoma ni al alérgeno. Estos resultados reflejan la modulación por el adyuvante del patrón Th2 inducido por los alérgenos hacia un patrón Th1.

Para determinar la IgG y las subclases de IgG anti-alergeno se evaluó un grupo en paralelo inmunizado en iguales condiciones a las referidas anteriormente; pero con tres grupos adicionales que contenían $\text{Al}(\text{OH})_3$ y el alérgeno en las mismas tres concentraciones (0,5; 1,25 y 2,5). El sangramiento se realizó a los 0, 15 y 35 días después de la inmunización. Las respuestas séricas fueron evaluadas por ELISA. La respuesta de IgG anti-alérgeno fue significativamente superior cuando se empleó Va como adyuvante que con $\text{Al}(\text{OH})_3$ y sorpresivamente las diferencias entre las respuestas de los dos adyuvantes también fue superior con las concentraciones menores de 0,5 y 1,25 μg . No obstante, la mayor respuesta de IgG anti-alérgeno fue con la mayor concentración con ambos adyuvantes (Fig. 8). La subclase de IgG anti-alérgeno predominante fue IgG1 en todas las combinaciones y adyuvantes. No obstante, se estimuló la IgG2a en todas las combinaciones con Va y fueron ligeramente positivas con $\text{Al}(\text{OH})_3$ sólo con las dos concentraciones mayores (2,5 y 1,25 μg). Por el contrario, sorpresivamente, también la mayor diferencia de las IgG2a anti-alérgeno, entre los dos adyuvantes fue encontrada con la menor concentración (0,5 μg), donde es negativa con el adyuvante $\text{Al}(\text{OH})_3$ y positiva con Va (Fig. 9).

Ejemplo 7. Determinación de la inducción de IgE anti-Alérgeno, su funcionabilidad y modulación en el preparado vacunal.

Para la determinación de la respuesta de IgE anti-alérgeno, se inmunizaron ratones Balb/c con dos dosis en las semanas 0 y 2. El grupo I recibió $\text{Al}(\text{OH})_3$. El grupo II recibió proteoliposoma + polisacárido C + $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Va). Los grupos III y IV recibieron 1 y 5 μg de alérgeno + $\text{Al}(\text{OH})_3$, respectivamente. Los grupos V y VI recibieron 0,5; 1,25 y 2,5 μg de alérgeno + Va. Los animales fueron sangrados a 0,

15 y 35 días de inmunizados. La respuesta de IgE se evaluó en ratas Wistar machos por el método de anafilaxia cutánea pasiva (PCA) cualitativa y semicuantitativa. Las respuestas fueron expresadas en tiempo y dilución de suero que resultó positiva y en densidades de las manchas.

5

Los sueros fueron evaluados antes To, después de 1ra, T15 y 14 días después de 2da dosis, T35. Como puede observarse las ultimas diluciones positivas del preparado vacunal (grupos V a VII) son inferiores al de los grupos en alúmina (grupos III y IV). De igual forma ocurre en las densidades ópticas. Esto aboga
10 hacia una reducción importante en la respuesta de IgE antialergeno inducida. No se observo respuesta en los controles negativos (I y II).

En los dos primeros grupos controles negativos, las respuestas fueron negativas. En el grupo III, se observó respuesta a los 35 días, con una intensidad de 10660 y
15 detectable hasta una dilución de 1:16. El grupo IV fue positivo desde la primera dosis (15 días) con una intensidad de 9345 y detectable hasta la dilución de 1:8. A los 35 días se observó una potente respuesta con 39843 de intensidad y detectable hasta la dilución de 1:32. Por el contrario, sorprendentemente con nuestro preparado vacunal Va, las respuestas de IgE anti-alergeno fueron muy
20 inferiores, sólo detectables al día 35, con intensidades bajas y detectables siempre a menores diluciones. Es de señalar que con la menor concentración, 0,5 µg de alergeno sólo se detectó una ligera respuesta en el suero puro (1:1), es decir, desaparecía la respuesta cuando el suero era diluido 1:2 (Fig. 10 y Tabla 1). En la
25 Tabla 1 se muestra la Intensidad de las manchas de las reacciones y última dilución del suero donde la anafilaxia cutánea pasiva fue positiva.

5

Estos resultados de menor inducción de IgE anti-alergeno con el adyuvante Va que con AL(OH)₃ y en las menores concentraciones de alergeno, están en correspondencia con los resultados de los Ejemplos anteriores donde se encuentra menor IgE total, inducción de IFN γ y subclase IgG2a con este adyuvante.

Tabla 1

Grupo	Inmunización	Positividad, días después de 2da dosis	Densidad (Ud arbitrarias)	Ultima dilución positiva
I	Al	-	0	-
II	P + PC + Al (Va)	-	0	-
III	1 μ g A + Al	35	10660	1:16
IV	5 μ g A + Al	15*	9345	1:8
		35	39843	1:32
V	0,5 μ g A + Va	35	1245	1:1
VI	1,25 μ g A + Va	35	4054	1:4
VII	2,5 μ g A + Va	35	4574	1:8

Leyenda: Al, Al(OH)₃; P, Proteoliposoma; PC, Polisacárido C de *N. meningitidis* serogrupo C; A, Alergeno y *días después de 1ra dosis.

10

Ejemplo No. 8. Unión covalente del alergeno al Proteoliposoma.

La unión covalente mediante conjugación química puede realizarse por alguno de los métodos conocidos, como por ejemplo los descritos en la patente US 4,695,694 y en las solicitudes de patente USSN 362,179; 555,558; 555,974; 555,966 y 555,339. Los métodos preferidos emplean reactivos homobifuncionales como Glutaraldehído o Anhídrido Succínico logrando la unión a través de los grupos aminos libres, tanto del alérgeno como del proteoliposoma (en particular los grupos aminos de las Lisinas). También se emplean reactivos heterobifuncionales, preferiblemente Ésteres de N-Hidroxisuccinimida-Maleimida (tales como MBS, MPS, SMPB, GMBS, EMCS). La reacción en este caso se realiza primero a través de la unión del espaciador al Proteoliposoma por los grupos aminos libres presentes en éste, y a continuación la unión del grupo Maleimido a los grupos Sulfidrilos libres presentes en el alérgeno. En el presente ejemplo se expone la conjugación del alérgeno purificado de *Dermatophagoides siboney* al proteoliposoma empleando el método de Glutaraldehído y la respuesta inmunológica obtenida en ratones con el preparado.

Conjugación: Las proteínas alérgicas purificadas según el Ejemplo 1 se mezclaron a una concentración de 20 µg/mL con 200 µg/mL de Proteoliposoma en solución Salina Tamponada con Fosfato pH 7.0 (PBS); se adicionó igual volumen de Glutaraldehído al 0.4%; se agitó durante 1 hora y se detuvo la reacción con 0.25 mol/L de Glicina (concentración final). Seguidamente, se ajustó el pH a 7.0 – 7.8. El Glutaraldehído no enlazado se eliminó mediante gel-filtración en una columna de Sephadex G25. Para lograr un mayor grado de purificación del conjugado Alérgeno-Proteoliposoma y eliminar el Alérgeno libre, se pasó el preparado por una columna cromatográfica con Sephacryl S-300 con la adición

previa de detergente Deoxicolato de Sodio hasta una concentración final de 1%, colectando el primer pico correspondiente al volumen de exclusión de la matriz. Posteriormente se eliminó el detergente por diálisis empleando PBS. El preparado obtenido fue concentrado 10 veces por Ultrafiltración (Amicon, USA) con una membrana de 10 000 KD como valor de corte. Se determinó el contenido de Der s 1 en el conjugado empleando un ELISA sándwich con anticuerpos monoclonales específicos a dicho alérgeno y se ajustó la concentración, mediante dilución con PBS hasta un valor apropiado para el proceso de adyuvación: 10 µg/mL. Por último el preparado se esterilizó mediante filtración por membrana de 0.2µm.

Adyuvación: Se mezclaron cantidades iguales de Hidróxido de Aluminio a 1.2 mg/mL y la solución de Alérgeno estéril a 10 µg/mL de Der s 1, ambos en solución PBS a un pH de 7.0. Se agitó la mezcla ligeramente durante 30 min a 200 rpm. Se comprobó la adsorción de las proteínas al gel de Aluminio monitoreando la absorbancia a 280 nm del sobrenadante de la suspensión, resultando ser superior al 90 %.

Inmunización: Se inmunizaron 3 grupos de ratones Balb/C con 7 ratones en cada grupo, con dos dosis de cada preparado respectivamente: Alérgeno en solución de PBS ("Ds"), Conjugado de Alérgeno Proteoliposoma en PBS ("PLS-Ds") y Conjugado adsorbido en Hidróxido de Aluminio ("[PLS-Ds]Alum"). La dosis empleada fue de 5 µg/mL de alérgeno Der s 1, por vía intraperitoneal. Las inmunizaciones se realizaron en las semanas 0 y 4. A los ratones se les extrajo sangre al inicio del experimento y en las semanas 4 y 8.

Resultados: Se determinaron los anticuerpos séricos de las clases IgE (total) e IgG (específicos al alérgeno). También las subclases IgG1, IgG2a e IgG2b. Dichas determinaciones fueron realizadas mediante ELISA. Por último se determinó la respuesta IgE específica hacia el alérgeno, empleando el método de Anafilaxia Cutánea Pasiva (PCA) en ratas. En la Fig. 11 se observan los resultados obtenidos en cuanto a anticuerpos. Se aprecia que en general las variantes que contienen conjugados inducen una respuesta IgG significativamente mayor que el alérgeno solo, lo cual es también válido para todas las subclases IgG1, IgG2a e IgG2b. Sin embargo, la respuesta IgE total fue menor para la variante que contiene al conjugado no adyuvado en Hidróxido de Aluminio. También los resultados del PCA (IgE específica) demostraron que esa variante no indujo respuesta detectable (mayor que el Control Negativo), mientras que el alérgeno libre y el conjugado adyuvado en Aluminio sí inducían respuestas detectables a las diluciones 1:1 y 1:10, respectivamente.

Ejemplo 9. Formulación de varios alérgenos

La formulación de diferentes alérgenos en un mismo preparado vacunal puede ser llevado a cabo tanto de forma no covalente, mediante mezcla o adsorción en el gel de Hidróxido de Aluminio, como de forma covalente, según el Ejemplo 8. En ese caso cada alérgeno se conjuga por separado al proteoliposoma y se formulan en conjunto mediante mezcla o adsorción en Hidróxido de Aluminio. En el presente ejemplo se expone la preparación de una formulación no covalente de tres alérgenos de diferentes especies de ácaros, comunes en regiones tropicales: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermmatophagoides siboney* y *Blomia tropicalis*.

Los alergen^{os} de dichos ácar^{os} se preparan por separado según el Ejemplo 1. En el caso de *Blomia* se emplea el extracto al^{er}génico completo, liofilizado, sin fraccionar. El contenido de alergen^{os} principales Der p 1, Der s 1 y Blo t 5 se determina empleando ensayos ELISA con anticuerpos monoclonales específicos.

- 5 La actividad Al^{er}génica total se determina mediante ELISA de inhibición de IgE humana, según se describe en el Ejemplo 3. Los alergen^{os} liofilizados se resuspenden en PBS pH 7.0 a una concentración de 20 µg/mL de Der p 1 y Der s1 y a 10 µg/ml de Blo t 5 y se esterilizan mediante filtración por membrana de 0.2 µm. La actividad Al^{er}génica de los mismos es de 4000 UB/mL. Se añadió
- 10 Proteoliposoma a cada al^{er}geno por separado hasta una concentración final de 200 µg/mL y se homogeneizó durante 30 min con agitación lenta a 150 rpm. Por último se mezclaron cantidades iguales de Hidróxido de Aluminio a 2 mg/mL y las soluciones de Al^{er}genos con Proteoliposoma por separado, en solución PBS a un pH de 7.0. Se agitó la mezcla lentamente durante 60 min a 150 rpm. Se comprobó
- 15 la adsorción de las proteínas al gel de Aluminio monitoreando la absorbancia a 280 nm del sobrenadante de la suspensión. Por último se mezclaron los tres preparados de alergen^{os} individuales en una sola suspensión, con agitación lenta durante 10 minutos. La adsorción de los alergen^{os} y del proteoliposoma se demostró mediante análisis del sobrenadante de la suspensión con ELISA para
- 20 Der p 1, Der s 1 y Blo t 5 (INDOOR Biotech, UK) y el método de Lowry para la determinación de proteínas. La actividad Al^{er}génica residual (no adsorbida) se determinó según el Ejemplo 3. Se obtuvo más del 90 % de adsorción de los alergen^{os} en el gel y reducción de la actividad Al^{er}génica a menos del 20 %.

Se administraron dos dosis de 0.5 mL (3.33 μ g de Der s 1 y Der p 1 y 1.17 μ g de Blo t 5) del preparado a ratones Balb/c con un intervalo de tres semanas por vía intraperitoneal. Pasadas 7 semanas del inicio de la inmunización se determinaron los niveles de anticuerpos IgG inducidos, mediante ELISA. Se encontró la existencia de anticuerpos dirigidos contra los tres alérgenos en una proporción de alrededor de 2:2:1, respectivamente a *D. pteronyssinus*, *D. siboney* y *Blomia tropicalis*. Los niveles de anticuerpos IgG observados fueron como promedio 80 % superiores a los obtenidos mediante la inmunización con la mezcla de los tres alérgenos en solución PBS.

Breve Descripción de las Figuras:

Figura 1: La Figura 1 muestra que el esquema de corto (0-14 días) es menos inductor de IgE total que esquema largo (0-28 días). Sangramiento 0, 15 y 35 en esquema corto y 0, 28 y 35 días después de la inmunización en esquema largo. Va, Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al (OH)₃; A, alérgeno; Al, Al (OH)₃; 1 y 5, μ g de A/ratón. Como puede observarse la respuesta de IgE es significativamente superior ($p < 0.5$) en el grupo inmunizado con 5 μ g de esquema largo que el de esquema corto aunque necesita dos dosis. De hecho la respuesta secundaria en el grupo con igual concentración del esquema corto, tiende a disminuir.

Figura 2: Se observa que la concentración de alérgeno es menos inductora de IgE total. Sangramiento 0, 15 y 35 días después de la inmunización. Va, Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al (OH)₃; A, alérgeno; Al, Al (OH)₃; 0,5; 1,25 y 2,5, μ g de A/ratón. Como puede observarse

la inducción de IgE total por la concentración de 0.5 µg de alérgeno esta a nivel del control con solo adyuvante (Va). Las otras dos concentraciones incrementan los niveles de IgE total.

5 **Figura 3:** Muestra como la Inclusión del Alérgeno no afecta la respuesta de IgG anti-proteoliposoma (PLS). Sangramiento 0, 15 y 35 días después de la inmunización. Va, Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al (OH)₃; A, alérgeno; Al, Al (OH)₃; 0,5; 1,25 y 2,5, µg de A/ratón. El
10 preparado vacunal no afecta la respuesta de IgG anti-proteoliposoma, ni tras la primera ni segunda dosis en comparación con el adyuvante solo .

Figura 4: Se observa que las subclases de IgG anti-proteoliposoma (PLS) no son afectadas por inclusión de alérgeno. Sangramiento 0, 15 y 35 días después de la inmunización. Va, Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al (OH)₃; A, alérgeno; Al, Al (OH)₃; 0,5; 1,25 y 2,5, µg de A/ratón. El
15 preparado vacunal mantiene igual patrón de respuesta anti PLS a nivel de subclases que el adyuvante solo (Va)

Figura 5: Muestra IgG2a anti-alérgeno inducida por bajas concentraciones de alérgeno. Sangramiento 0, 15 y 35 días después de la inmunización. Va, Proteoliposoma (P) + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al (OH)₃; A, alérgeno; Al, Al (OH)₃; 0,5; 1,25 y 2,5, µg de A/ratón. Fig.A, con polisacárido y Fig.B sin polisacárido. Las dos concentraciones menores de alérgeno inducen respuesta de IgG2a antialérgeno.
20

Figura 6: Es referida a la determinación del IFN γ contra el proteoliposoma (PLS). Las células de bazo fueron tomadas 7 días después de dos dosis (0 y 2 semanas) de inmunización, respectivamente. Va, Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al (OH) $_3$; A, alérgeno; Al, Al (OH) $_3$; 0,5; 1,25 y 2,5, μ g de A/ratón; 1Va+Va-A0,5, dosis previa de Va. La inclusión de la menor concentración de alérgeno incrementa la respuesta de IFN γ contra el PLS con respecto al control (Va).

Figura 7: Muestra la producción de IFN γ contra el alérgeno y no afectación de una dosis previa del adyuvante. Las células de bazo fueron tomadas 7 días después de dos dosis de inmunización a los 0 y 2 semanas, respectivamente. Va, Proteoliposoma (P) + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al (OH) $_3$; A, alérgeno; Al, Al (OH) $_3$; 0,5; 1,25 y 2,5, μ g de A/ratón; 1Va+Va-A0,5, dosis previa de Va. Fig.A, con polisacárido y Fig.B sin polisacárido. La respuesta de IFN γ antialérgeno se indujo por todas las concentraciones, pero fue muy superior en la menor concentración. La aplicación previa del adyuvante no afectó esta respuesta.

Figura 8: Se observa como las menores dosis de Alérgenos inducen mayores diferencias de IgG anti-alérgeno al comparar preparado vacunal con el adyuvante Alúmina. Los sueros fueron tomados 14 días después de la segunda dosis. Estas fueron aplicadas a los 0 y 21 días. Va, Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al (OH) $_3$; A, alérgeno; Al, Al (OH) $_3$; 0,5; 1,25 y 2,5, μ g de A/ratón. Como puede observarse las menores dosis (0.5 y 1.125) inducen mayores incrementos en la respuesta de IgG antialérgeno que la mayor dosis.

Figura 9: Se refiere a la inducción de IgG2a antialergeno. Los sueros fueron tomados 14 días después de la segunda dosis. Estas fueron aplicadas a los 0 y 21 días. Va, Proteoliposoma + Polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C + Al (OH)₃; A, alergeno; Al, Al (OH)₃; 0,5; 1,25 y 2,5, µg de A/ratón. Como puede observarse todos los preparados vacunales inducen respuesta de IgG2a antialergeno. Esta no se induce por la concentración de 0.5 µg en alúmina y si con el adyuvante.

Figura 10: Muestra la reducción de la IgE anti-alergeno en el preparad vacunal (Grupo V a VII) en comparación con controles positivos (Grupos III y IV) evaluados por anafilaxia cutánea pasiva. A, Alergeno; Va, VA-MENGOC-BC® y Al, AL(OH)₃. Los sueros fueron evaluados antes To, después de 1ra, T15 y 14 días después de 2da dosis, T35. Las respuesta en los grupos vacunales (V-VII) son menores que en los grupos inmunizados con alergeno en alúmina (III y IV). No se observo respuesta en los controles negativos (I y II).

Leyenda: -, ausente; +, presente; A, Alergeno; Va, Proteoliposoma + polisacárido C de *N. meningitidis* + Alúmina (Al).

Figura 11: Respuesta de anticuerpos hacia las formulaciones de alergenios unidos covalentemente (conjugados) al Proteoliposoma. Los ratones fueron inmunizados con 2 dosis de 5 µg de Der s 1, en diferentes variantes: Ds (alergeno libre); Ds-PLS (conjugado con Proteoliposoma); [Ds-PLS]Alum (Conjugado adyuvado en Hidróxido de Aluminio. La respuesta fue evaluada en la semana 8 después de la primera inmunización. Las barras verticales indican la desviación estándar.

REIVINDICACIONES

- 1) Composición vacunal contra las alergias caracterizada porque comprende:
 - a) proteoliposomas derivados de bacterias Gram-negativas que inducen un patrón de respuesta celular Th1;
 - b) uno o más alérgenos en su estado natural o modificados;
 - c) un adyuvante apropiado.
- 2) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque el proteoliposoma proviene de una bacteria del género *Neisseria*.
- 3) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada porque el proteoliposoma proviene de la especie *N. meningitidis*.
- 4) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizada porque el proteoliposoma proviene de *N. meningitidis* serogrupo B.
- 5) Composición vacunal según las reivindicaciones de la 1 a la 4, caracterizada por que la misma contiene entre 20 y 75 µg de proteoliposoma por dosis.
- 6) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque el alérgeno es de naturaleza peptídica, glicopeptídica o polisacáridica y causa sensibilización alérgica en humanos o en animales.

- 7) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque los alergen^{os} provienen de ácaros domésticos.
- 5 8) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada porque los alergen^{os} provienen de ácaros del género *Dermatophagoides*.
- 9) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizada porque el alergen^o proviene de la especie *D. siboney*.
- 10 10) Composición vacunal de acuerdo con las reivindicaciones 8 y 9, caracterizado porque los alergen^{os} principales son los alergen^{os} del Grupo 1 (Der s 1, Der p 1, Der f 1) y del Grupo 2 (Der s 2, Der p 2, Der f 2).
- 15 11) Composición vacunal de acuerdo con las reivindicaciones de la 6 a la 10, caracterizada porque el alergen^o se encuentra a razón de 0.1 a 1 unidad por cada 10 unidades de proteoliposoma y entre 20 y 75 µg por dosis.
- 20 12) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque al alergen^o se le incorpora un residuo lipofílico unido covalentemente.
- 13) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizada porque el residuo lipofílico unido covalentemente es un ácido graso bipolar con 16 a 20 carbonos.

14) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque el adyuvante es seleccionado del grupo consistente en Hidróxido de Aluminio y Fosfato de Aluminio.

5 15) Composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizada porque el adyuvante es adicionado a razón de 10 a 25 veces por unidad de proteoliposoma y su contenido final es de 250 a 1000 µg por dosis.

10 16) Composición vacunal según la reivindicación 1, caracterizada porque contiene adicionalmente polisacáridos naturales o sintéticos.

17) Composición vacunal según la reivindicación 16, caracterizada porque el polisacárido proviene del género *Neisseria*.

15 18) Composición vacunal según la reivindicación 17, caracterizada porque el polisacárido proviene de la especie *N. meningitidis*.

19) Composición vacunal según la reivindicación 18, caracterizada porque el polisacárido proviene de *N. meningitidis* serogrupo C.

20

20) Composición vacunal de acuerdo con las reivindicaciones 16 a la 19, caracterizada porque el polisacárido es adicionado en una razón de 0.5 a 4 veces con respecto al proteoliposoma.

21) Método para la obtención de las composiciones vacunales de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 20, caracterizada por que los alergenos de ácaros del género *Dermatophagoides* son preparados y purificados siguiendo los siguientes pasos:

- 5 a) liofilización o concentración por ultrafiltración del extracto alergénico hasta una concentración de proteínas de 10 a 100 mg/mL;**
- b) precipitación en solución de sulfato de amonio 50 – 100% y colecta del precipitado;**
- c) fraccionamiento mediante cromatografía de tamizaje molecular empleando**
10 como matrices Sephacryl S-100, Sephacryl S-200, Sephacryl S-300 o Superdex 75 y colecta de la fracción que corresponde a los pesos moleculares 10-60 kDa;
- d) liofilización o concentración por ultrafiltración hasta una concentración de proteínas entre 10 y 100 µg/mL para el proceso de adyuvación.**
- 15 e) unión del alergeno al proteoliposoma en proporciones de 0.1 a 1 unidad por cada 10 unidades de peso del proteoliposoma;**
- f) agitación de 60 a 600 rpm entre 30 y 90 minutos**
- g) adición del adyuvante seleccionado del grupo compuesto por Hidróxido de Aluminio y Fosfato de Aluminio en proporciones de 2 a 6 veces el peso del**
20 proteoliposoma; y
- h) homogeneización de la mezcla con agitación de 60 a 600 rpm entre 30 y 90 minutos.**

22) Método según la reivindicación 21 caracterizado porque la unión del alergeno al proteoliposoma del paso (e) es de forma covalente o no covalente.

25

23) Método según las reivindicaciones 21 y 22, caracterizado porque adicionalmente comprende los pasos de:

- a) adición de un polisacárido en proporciones de 0.5 a 4 veces en relación al proteoliposoma; y**
- b) homogenización por agitación a 60-600 rpm de 30 a 90 minutos.**

5

24) Método de tratamiento profiláctico o terapéutico para las alergias, caracterizado porque se emplea la composición de las reivindicaciones de la 1 a la 20 en un esquema de aplicación de 2 hasta 4 dosis por vía parenteral o mucosal del alérgeno espaciando dichas dosis entre 2 y 6 semanas.

10

RESUMEN

5

La presente invención se relaciona con el campo de la Inmunología, la Inmunoalergia y en particular con el empleo de adyuvantes o portadores para modular la respuesta inmunológica hacia los alergen^{os}. El objetivo técnico que se persigue es obtener una preparación farmacéutica de uso terapéutico o profiláctico
10 utilizando proteoliposomas bacterianos, la cual al ser aplicada en individuos alérgicos transforma la respuesta alérgica Th2 e IgE dependiente, hacia una respuesta Th1 protectora; así como logre prevenir la aparición y el desarrollo de alergias en individuos aún no alérgicos. La composición vacunal consiste en proteoliposomas de bacterias Gram-negativas acoplados a alergen^{os} y
15 opcionalmente otros antígenos o adyuvantes. Se provee el método para su obtención y se incluye el esquema de 2 dosis para la inmunización con dicha composición vacunal.

20

17

Figura 1.

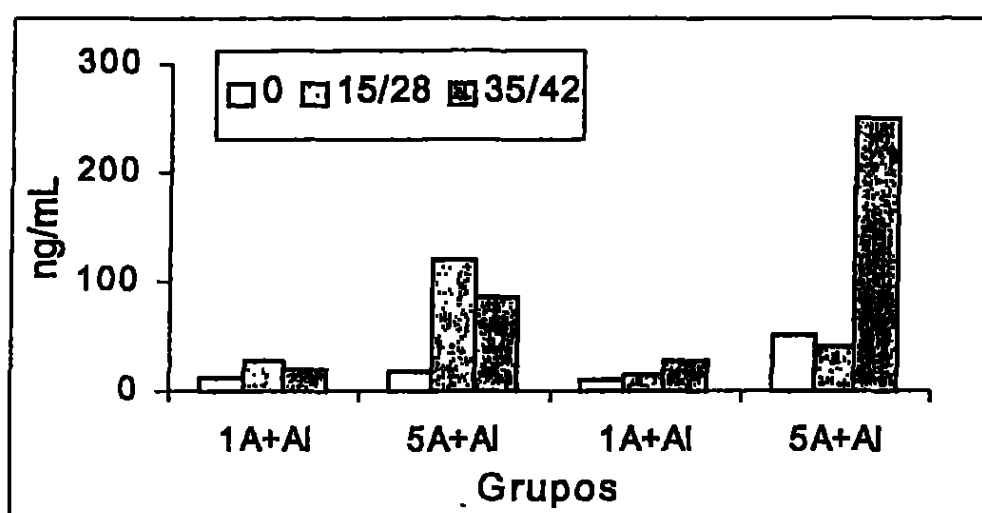


Figura 2.

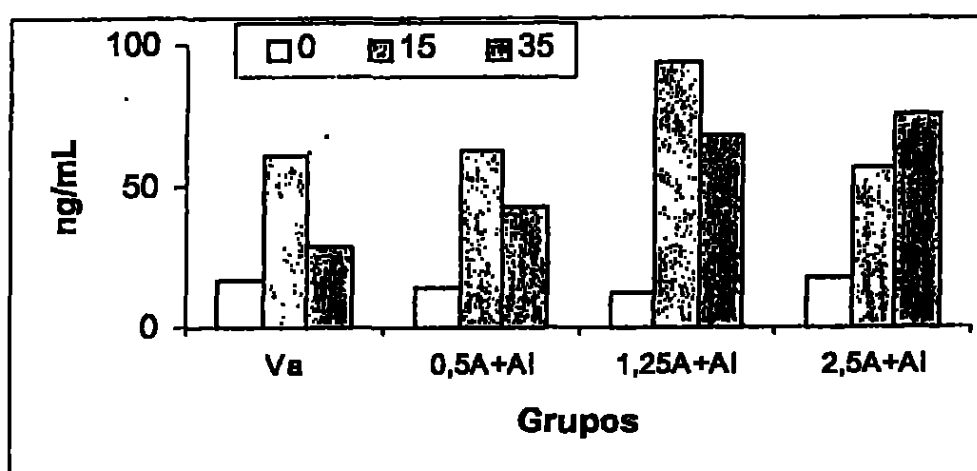


Figura 3.

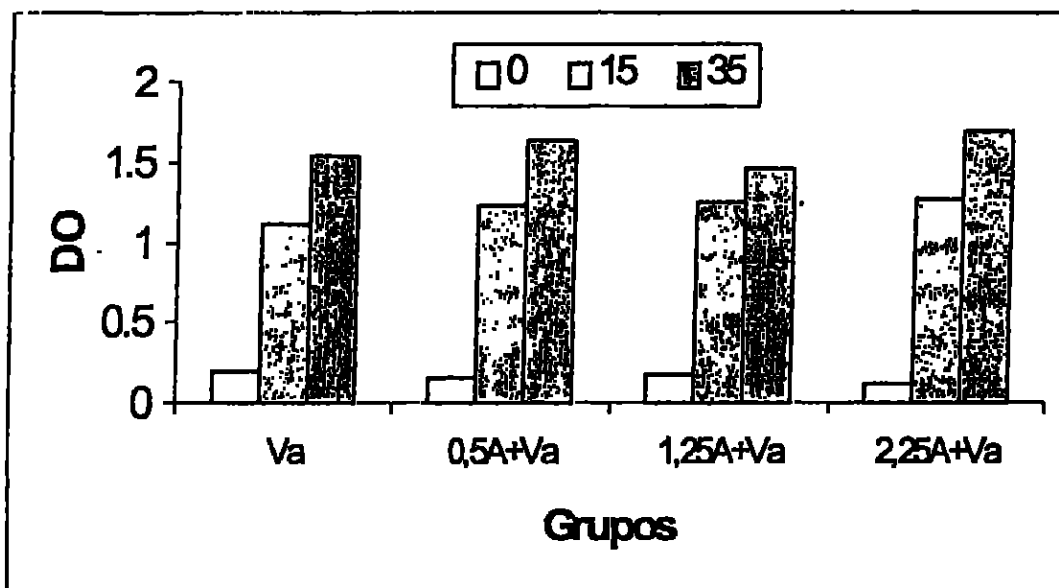
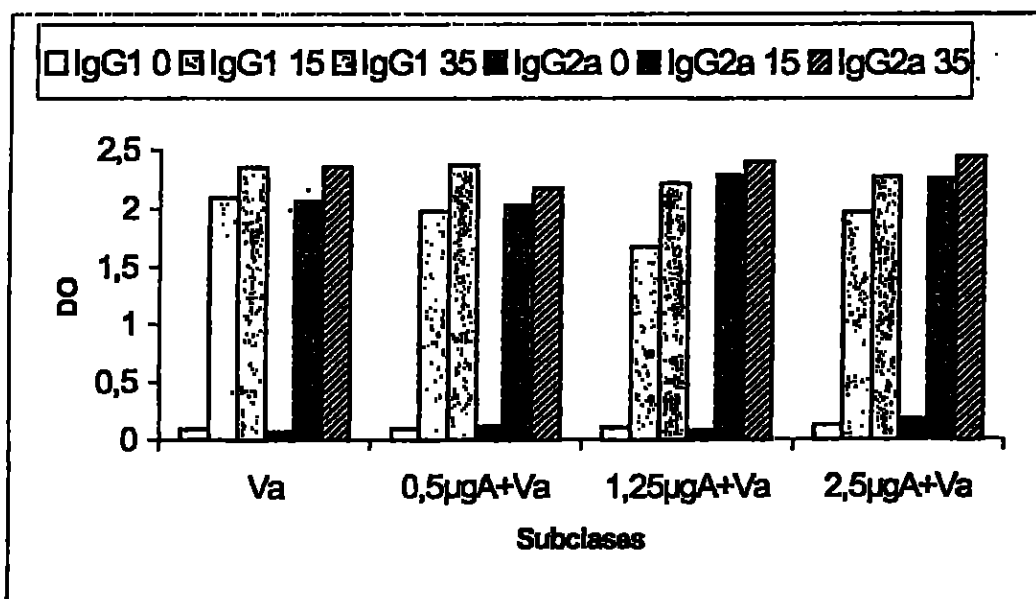


Figura 4.



37

Figura 5A.

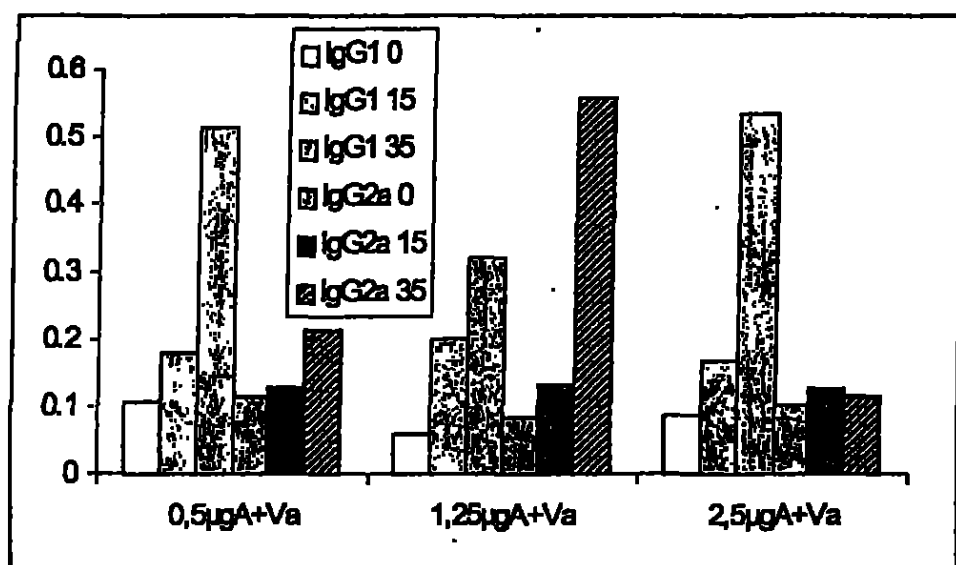
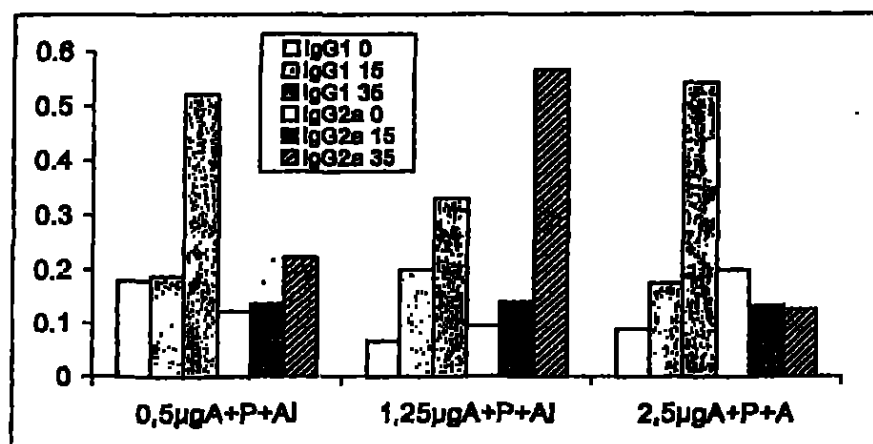


Figura 5B.



477

Figura 6.

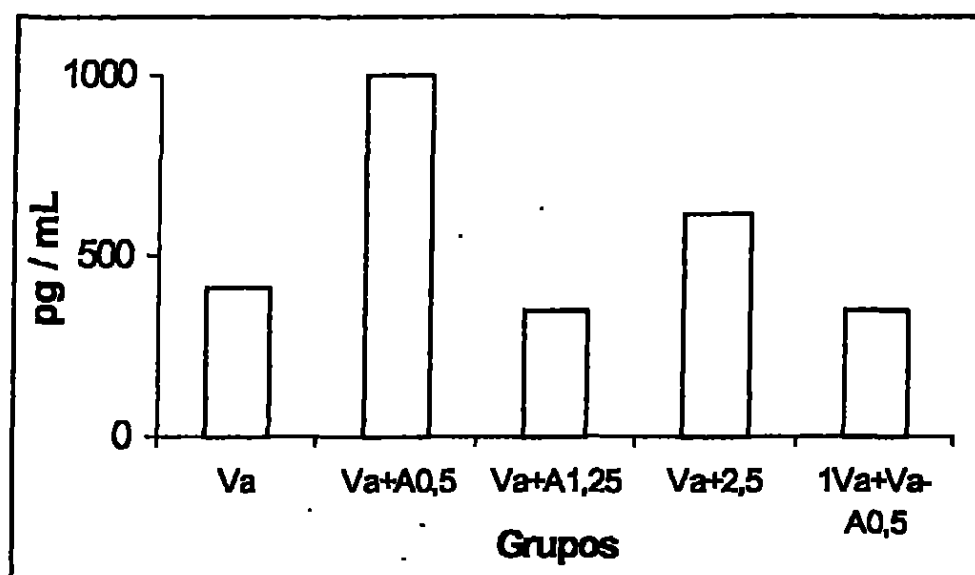


Figura 7A.

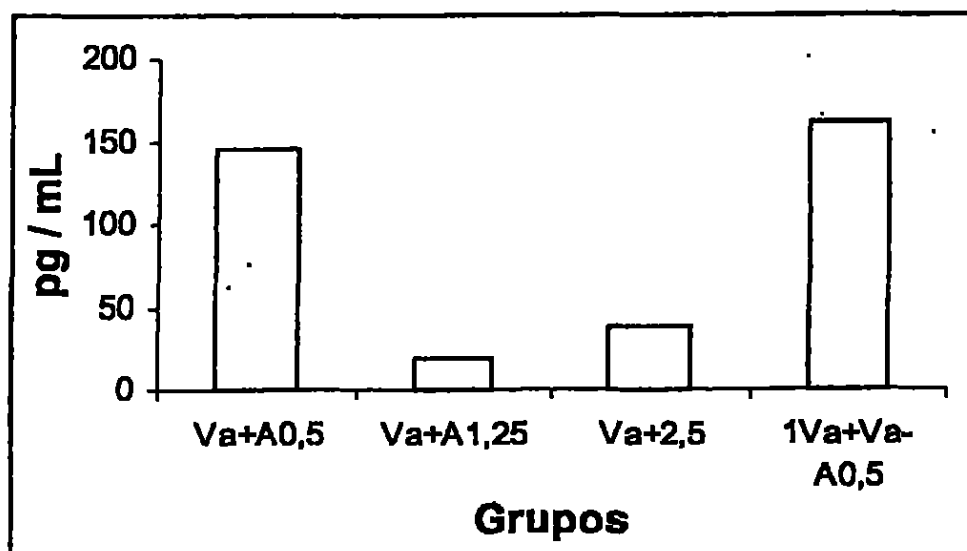


Figura 7B.

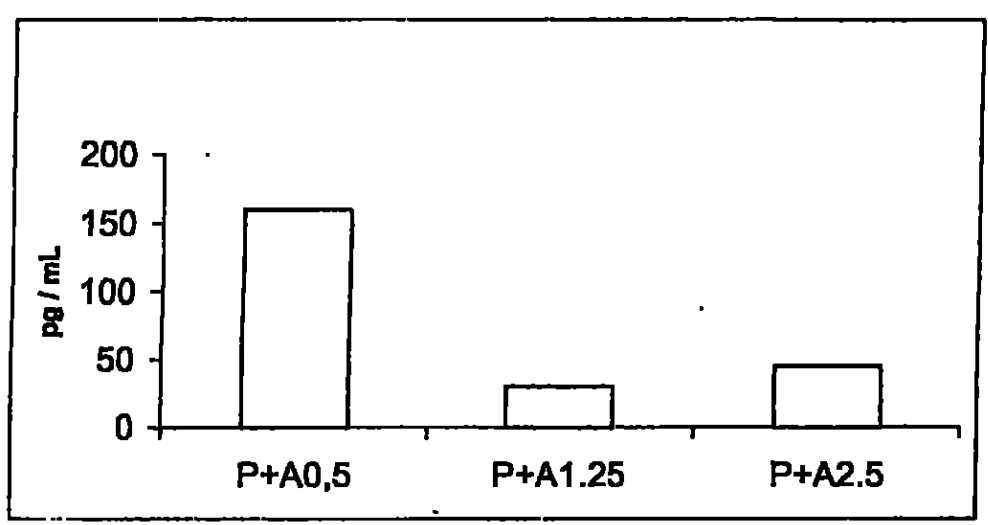
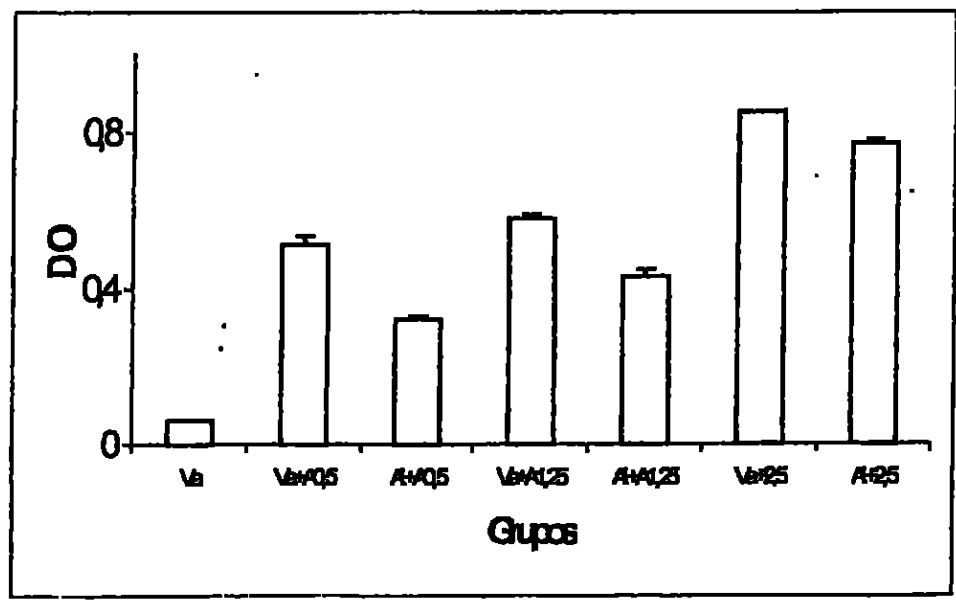


Figura 8.



67

Figura 9.

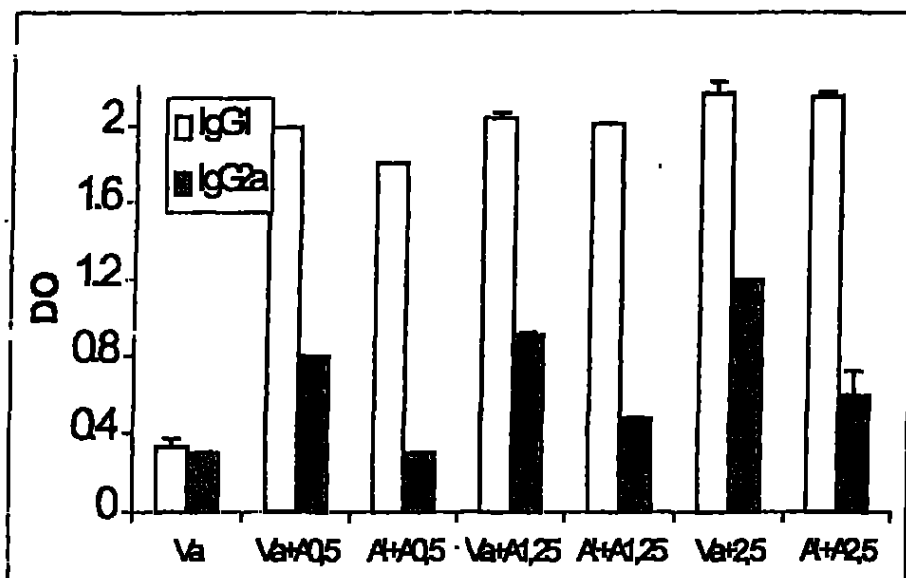
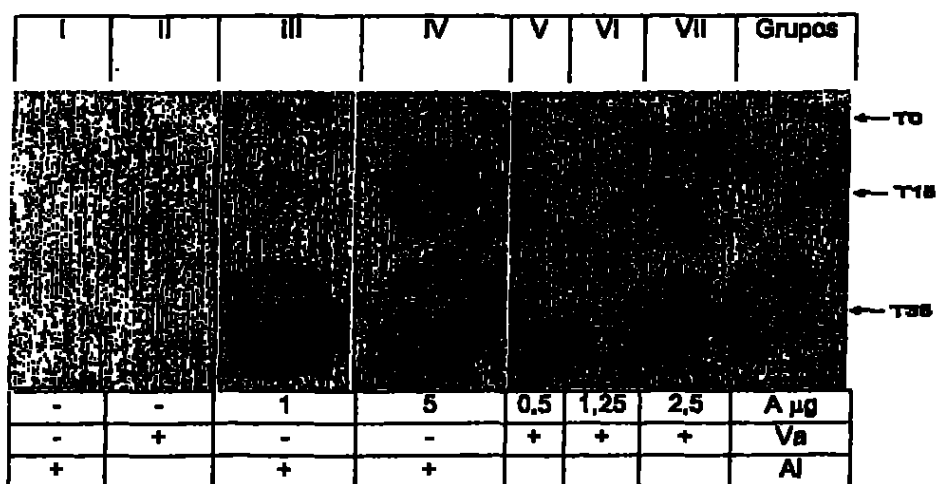
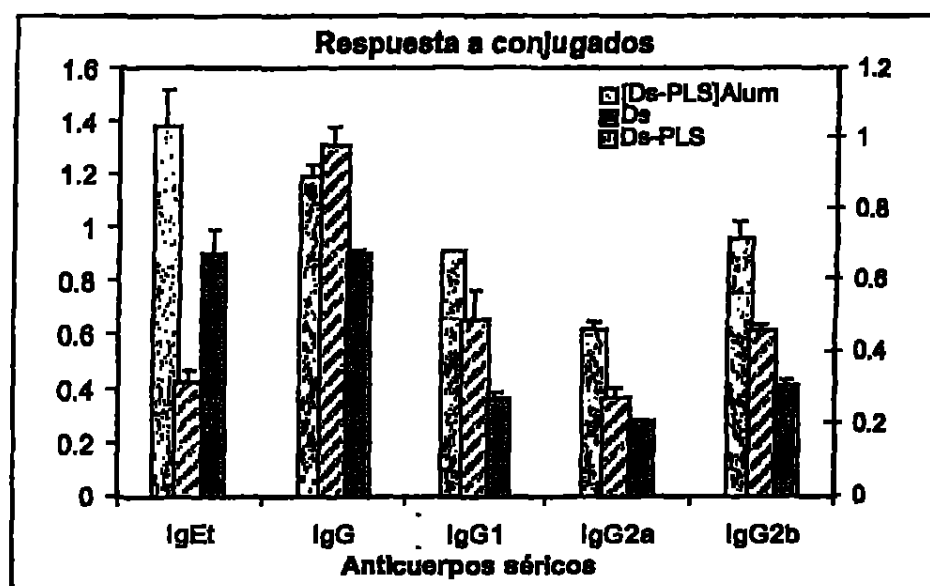


Figura 10.



77

Figura 11.



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicación 041113A8 00000000 Folios 90
 Fecha (AMD) 2004 11 0 14 12 32
 Trámite 011 DPT PATENT 379 FASE NACI 11 PRESENTAR
 Dependencia 20 0 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION		
MODELO DE UTILIDAD	()	(✓)
Indicación de que se solicita la concesión de una patente	()	(✓)
Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	(✓)
Descripción de la invención	()	(✓)
Dibujos de ser estos pertinentes X	()	(✓)
Comprobante de Pago de las tasas establecidas		
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable

Claudia M Nueva

Fecha

92

2020

Bogotá D C

Doctor(a)
MARGARITA CASTELLANOS

16882

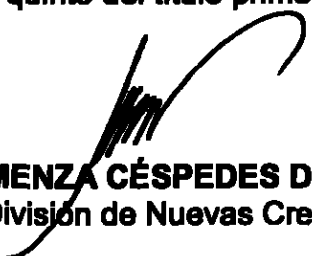
Apoderado(a)
**INSTITUTO FINLAY CENTRO DE INVESTIGACIÓN –PRODUCCIÓN-
VACUNAS Y SUEROS, Y CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS**

REFERENCIA:	Radicación N°	04-111388
	Solicitud internacional	PCT/CU03/00007
	Fecha inicio fase nacional	2004-12-08
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k) Decisión 486).
- La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando éste fuere una persona jurídica
- El solicitante debe aclarar si la solicitud corresponde al Capítulo I ó II del PCT, en caso que se trate de capítulo II y el examen preliminar contenga anexos, estos deben ser presentados junto con su traducción

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha,
26 NOV. 2004
202063

2020
Bogotá D C

11173

Doctor(a) A
MARGARITA CASTELLANOS

Apoderado(a)
**INSTITUTO FINLAY-CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRODUCCIÓN DE SUEROS
Y VACUNAS**

REFERENCIA:	Radicación N°	04-111388
	Solicitud internacional	PCT/ CU03/00007
	Fecha inicio fase nacional	2004-2004-12-08
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, mediante oficio No 10882 notificado por fijación en lista de fecha 26 de noviembre de 2004, requirió al doctor(a) **MARGARITA CASTELLANOS CAMPUZANO** para que complementara la solicitud de acuerdo con las normas citadas.

Sin embargo, el mencionado requerimiento no cumplió con los presupuestos establecidos en el artículo 39 de la Decisión 486, es decir no se indicó al solicitante el plazo en el cual se debía presentar la respuesta al mismo, por lo que es procedente revocar en su totalidad el oficio No 10882 de fecha 26 de noviembre de 2004 y en su lugar efectuar un nuevo requerimiento en los siguientes términos:

- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art 26-k) Decisión 486
- La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando éste fuere una persona jurídica
- En caso que el examen preliminar contenga anexos, estos deben ser adjuntados junto con su traducción.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL

Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha,

03 DIC. 2004

202063