

# DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

## SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

### 1 Título de la Invención(200 caracteres o espacios máximos)

MÉTODO PARA EL PRONÓSTICO DE LA EFICACIA DE LA INMUNOTERAPIA ORAL PARA EL TRATAMIENTO DE LA ALERGIA A LAS PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA.

### 2 Datos del Solicitante

**Nombre:**

FUNDACIÓN PARA  
LA INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA DEL  
HOSPITAL  
UNIVERSITARIO  
RAMÓN Y CAJAL

**Dirección  
Electrónica:**

patents@olartemoure.com

**Dirección:**

Ctra. de Colmenar Viejo  
Km. 9,100 E-28034  
Madrid

**Domicilio/País de  
constitución:**

ESPAÑA - MADRID -  
COLMENAR VIEJO

**Identificación:**

☐ CEDULA DE  
CIUDADANIA

☐ CEDULA DE  
EXTRANJERIA

☒ EMPRESA  
EXTRANJERA

☐ NIT

☐ PASAPORTE

**Número:** 1047922-

### 3 Solicitantes

**Apellidos - Nombres o Razón Social**

**Tipo**

**Identificación**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                    |                                                  |                                                                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 1.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL | NN                                               | 1047922                                                          |
| 2.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS          | NN                                               | 1047923                                                          |
| 4                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Datos del Inventor                                                                 |                                                  |                                                                  |
| Nombre:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                    | MÂª Belén DE LA HOZ CABALLER                     | Dirección Electrónica: patents@olartemoure.com                   |
| Dirección:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                    | Ctra.de Colmenar Viejo, Km. 9,100 E-28034 Madrid | Domicilio/País de constitución: ESPAÑA - MADRID - COLMENAR VIEJO |
| <div>Identificación:</div> <div><div><input type="checkbox"/> CEDULA DE CIUDADANIA</div><div><input type="checkbox"/> CEDULA DE EXTRANJERIA</div><div><input type="checkbox"/> EMPRESA EXTRANJERA</div><div><input type="checkbox"/> PASAPORTE</div></div> <div><input type="checkbox"/> NIT</div> <div><input checked="" type="checkbox"/> No Aplica</div> <div>Número: -</div> |                                                                                    |                                                  |                                                                  |
| 5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Inventor(es)                                                                       |                                                  |                                                                  |
| Apellidos - Nombres                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                    | Domicilio                                        |                                                                  |
| 1.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | DE LA HOZ CABALLER MÂª Belén                                                       | ESPAÑA                                           |                                                                  |
| 2.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | MARTÍNEZ BOTAS Javier                                                              | ESPAÑA                                           |                                                                  |
| 3.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | CERECEDO CARBALLO Inmaculada                                                       | ESPAÑA                                           |                                                                  |
| 4.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | FERNÁNDEZ RIVAS Montserrat                                                         | ESPAÑA                                           |                                                                  |
| 5.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | RODRÍGUEZ ÁLVAREZ Mónica                                                           | ESPAÑA                                           |                                                                  |
| 6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Datos Inventor(es)                                                                 |                                                  |                                                                  |
| País de Residencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                    | Departamento/Estado                              | Ciudad                                                           |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                    |                                                  | Dirección                                                        |

|    |        |        |                |                                                   |
|----|--------|--------|----------------|---------------------------------------------------|
| 1. | ESPAÑA | MADRID | COLMENAR VIEJO | Ctra.de Colmenar Viejo, Km. 9,100 E-28034 Madrid  |
| 2. | ESPAÑA | MADRID | COLMENAR VIEJO | Ctra. de Colmenar Viejo, Km. 9,100 E-28034 Madrid |
| 3. | ESPAÑA | MADRID | COLMENAR VIEJO | Ctra. de Colmenar Viejo, Km. 9,100 E-28034 Madrid |
| 4. | ESPAÑA | MADRID | MADRID         | C/ Prof. Martín Lagos, s/n E-28040 Madrid         |
| 5. | ESPAÑA | MADRID | MADRID         | C/ Prof. Martín Lagos, s/n E-28040 Madrid         |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                  |                         |                                        |                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 7                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>Datos del Representante Legal / Apoderado</b> |                         |                                        |                                                                    |
| <b>Nombre:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                  | CARLOS R. OLARTE GARCIA | <b>Dirección Electrónica:</b>          | patents@olartemoure.com                                            |
| <b>Dirección:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                  | patents@olartemoure.com | <b>Domicilio/País de constitución:</b> | COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.                               |
| <b>Identificación:</b><br><br><input checked="" type="checkbox"/> CEDULA DE CIUDADANIA <input type="checkbox"/> CEDULA DE EXTRANJERIA<br><input type="checkbox"/> EMPRESA EXTRANJERA <input type="checkbox"/> NIT<br><input type="checkbox"/> PASAPORTE<br><br><b>Número:</b> 79782747- |                                                  |                         |                                        |                                                                    |
| <b>Presentación de Poder</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                  |                         |                                        |                                                                    |
| Año de Radicación                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                  |                         |                                        |                                                                    |
| Número de Radicación                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                  |                         |                                        |                                                                    |
| 8                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>Datos Solicitud: PCT / WO</b>                 |                         |                                        |                                                                    |
| <b>Número Solicitud:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                  | PCT/ES2014/070634       | <b>Fecha Solicitud:</b>                | 01/08/2014                                                         |
| <b>Número Publicacion:</b>                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                  | WO2015/015043           | <b>Fecha Publicacion:</b>              | 05/02/2015                                                         |
| 9                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>Declaraciones de prioridad</b>                |                         |                                        | <input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                      |                              |                                         |                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|
| 1.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>(33) País de origen</b><br>ESPAÑA | <b>Codigo del país</b><br>ES | <b>(31) No. Solicitud</b><br>P201331200 | <b>(32) Fecha</b> _<br>01/08/2013 |
| <b>10</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>Reivindicaciones</b>              |                              |                                         |                                   |
| <b>Número reivindicaciones:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                      | 17                           | <b>Pago Reivindicaciones:</b>           | No                                |
| <b>11</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>Reducción de tasas.</b>           |                              |                                         |                                   |
| <i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i><br><input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO<br><b>Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                      |                              |                                         |                                   |
| <input type="checkbox"/> Micro, pequeñas y medianas empresas<br><input type="checkbox"/> Universidades públicas o privadas<br><input type="checkbox"/> Entidades sin ánimo de lucro<br><b>Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                      |                              |                                         |                                   |
| <b>12</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>Documentos Anexos</b>             |                              |                                         |                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> Reivindicaciones<br><input checked="" type="checkbox"/> Descripción<br><input checked="" type="checkbox"/> Dibujos y/o Figuras<br><input checked="" type="checkbox"/> Resumen<br><input type="checkbox"/> Certificado Depósito Material Biológico<br><input type="checkbox"/> Uso de Conocimiento tradicional<br><input checked="" type="checkbox"/> Listado de secuencias<br><input type="checkbox"/> Artes finales 12 x 12 cm<br><input type="checkbox"/> Poderes, si fuere el caso<br><input checked="" type="checkbox"/> Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad<br><input type="checkbox"/> Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad<br><input checked="" type="checkbox"/> Otros Anexos |                                      |                              |                                         |                                   |

## **MÉTODO PARA EL PRONÓSTICO DE LA EFICACIA DE LA INMUNOTERAPIA ORAL PARA EL TRATAMIENTO DE LA ALERGIA A LAS PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA**

### **Campo de la invención**

- 5 La presente invención se encuadra en el campo general de la alergología y en particular se refiere a un método para el pronóstico de la eficacia del tratamiento de desensibilización a la leche de vaca.

### **Estado de la técnica**

- 10 La alergia por Hipersensibilidad inmediata frente a alimentos no tiene en la actualidad un tratamiento establecido eficaz, la única alternativa para los pacientes es la evitación del mismo hasta alcanzar la tolerancia espontánea al mismo, situación que se alcanza en un alto número de pacientes pero no en todos.

- Se habla de alergia a las proteínas de leche de vaca (APLV) cuando un individuo, tras la ingesta de lácteos manifiesta una respuesta anormal (con síntomas que se pueden englobar dentro de las reacciones adversas a alimentos) y en ese proceso hay un mecanismo inmunológico comprobado.

- Las proteínas responsables de la alergenidad de la leche de vaca son las caseínas (alfa- caseína, beta-caseína y kappa- caseína) y las seroproteínas beta lactoglobulina, alfa lactoalbumina, seroalbumina bovina e inmunoglobulinas bovinas así como otras proteínas en menor proporción: lactoferrina, transferrina, lipasa que son las proteínas del suero y representan un 2% del total de la leche de vaca entera.

Las caseínas son las principales responsables de la alergia a la leche de vaca.

- 25 Actualmente se tiene evidencia que en la alergia a los alimentos existen diferentes fenotipos clínicos de gravedad de las reacciones. Si bien varios factores se han implicado en estas diferencias, el componente geográfico tiene un papel muy importante. Un claro ejemplo es la alergia a frutas, donde los individuos alérgicos a un alimento debido a que reconocen diferentes alérgenos (proteína completa/péptido) tienen diferente gravedad clínica. Así, los individuos alérgicos a melocotón del norte de Europa tienen solo síntomas leves tras su ingestión, mientras los pacientes del sur de

Europa presentan reacciones sistémicas graves. Por lo tanto es de máximo interés conocer el patrón de reconocimiento de los alérgenos de un determinado alimento, tanto de las proteínas completas como idealmente de los epítomos de las mismas, que presenta una población determinada.

- 5 Actualmente existen diferentes métodos para diagnosticar la alergia a la leche de vaca, pero lo normal es que una vez ocurrida la primera crisis alérgica, se haga una detección de IgE específica a las distintas proteínas de la leche de vaca.

La Inmunoterapia Oral (ITO) con alimentos es un procedimiento terapéutico novedoso cuyo objetivo es conseguir en los pacientes alérgicos a un determinado alimento la  
10 tolerancia al mismo mediante la administración continuada a partir de dosis mínimas del mismo hasta alcanzar la tolerancia de una cantidad habitual del alimento.

La leche de vaca es un alimento ubicuo de muy difícil evitación y que produce reacciones graves. En los últimos diez años diversos grupos de investigación han desarrollado protocolos para la administración oral de la leche de vaca para conseguir  
15 alcanzar la tolerancia a la misma. En el estado del conocimiento actual el tratamiento alcanza buenos niveles de eficacia en cuanto que logra inducir tolerancia a la leche de vaca. No obstante, presenta su mayor problema en cuanto a la seguridad del tratamiento ya que los pacientes presentan un elevado número de reacciones alérgicas durante la realización del procedimiento. Si bien en la mayoría de las ocasiones dichas  
20 reacciones alérgicas son leves y fácilmente tratables, en algunas pocas ocasiones son graves e incluso requieren la administración de adrenalina. Por lo tanto, las reacciones durante el procedimiento son una de las mayores dificultades a la hora de incorporar el procedimiento en la práctica habitual de la enfermedad, y por lo tanto extender a un número importante de pacientes su utilización.

- 25 Existe pues la necesidad de proporcionar un método que pronostique la eficacia del tratamiento de desensibilización a la leche de vaca y por tanto la respuesta del paciente al mismo.

### **Breve descripción de la invención**

La presente invención proporciona la solución a los problemas planteados en el estado de la técnica ya que proporciona un método que permite pronosticar el número de reacciones que se producirán durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de pre-medicación durante la ITO en un sujeto humano.

Por lo tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método para el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de pre-medicación durante la ITO en un sujeto humano, que comprende los siguientes pasos:

- a. Aislar una muestra biológica del sujeto;
- b. Determinar la presencia o ausencia de anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) contra o con especificidad frente a los péptidos identificados con las siguientes secuencias:
  - a. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-4 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 18-32 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-32 inmunológicamente activas; y/o
  - b. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 5-8 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 33-45 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 33-45 inmunológicamente activas; y/o
  - c. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 9-13 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO:

46-63 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 46-63 inmunológicamente activas; y/o

- 5 d. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 14-15 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 64-69 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 64-69 inmunológicamente activas; y/o
- 10 e. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 16-17 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 70-75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 70-75 inmunológicamente activas;

donde el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento  
15 requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de pre-medicación durante la ITO se establece correlacionando el número de secuencias peptídicas reconocidas por anticuerpos IgE de las muestras de los sujetos antes de empezar el tratamiento de ITO (tiempo 0), con unos valores de referencia establecidos en base a esas mismas  
20 secuencias peptídicas que correlacionan el número de péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de las muestras de los pacientes con la respuesta posterior al tratamiento de ITO.

Una realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un método para el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente  
25 a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de pre-medicación durante la ITO en un sujeto humano, que comprende los siguientes pasos:

- a. Aislar una muestra biológica del sujeto;

b. Determinar la presencia o ausencia de anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) contra o con especificidad frente a los péptidos identificados con las siguientes secuencias:

- 5           a. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-4 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 18-32 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-32 inmunológicamente activas; y
- 10          b. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 5-8 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 33-45 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 33-45 inmunológicamente activas; y
- 15          c. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 9-13 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 46-63 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 46-63 inmunológicamente activas; y opcionalmente
- 20          d. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 14-15 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 64-69 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 64-69 inmunológicamente activas; y opcionalmente
- 25          e. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 16-17 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 70-75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 70-75 inmunológicamente activas;

30          donde el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las

proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de pre-meditación durante la ITO se establece correlacionando el número de secuencias peptídicas reconocidas por anticuerpos IgE de las muestras de los sujetos antes de empezar el tratamiento de ITO (tiempo 0), con unos valores de referencia establecidos en base a esas mismas secuencias peptídicas que correlacionan el número de péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de las muestras de los pacientes con la respuesta posterior al tratamiento de ITO.

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un método para el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de pre-meditación durante la ITO en un sujeto humano, que comprende los siguientes pasos:

- a. Aislar una muestra biológica del sujeto;
- b. Determinar la presencia o ausencia de anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) contra o con especificidad frente a los péptidos identificados con las siguientes secuencias:
  - a. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-4 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 18-32 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-32 inmunológicamente activas; y
  - b. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 5-8 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 33-45 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 33-45 inmunológicamente activas; y
  - c. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 9-13 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO:

46-63 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 46-63 inmunológicamente activas; y

d. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 14-15 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 64-69 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 64-69 inmunológicamente activas; y

e. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 16-17 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 70-75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 70-75 inmunológicamente activas;

donde el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de pre-medicación durante la ITO se establece correlacionando el número de secuencias peptídicas reconocidas por anticuerpos IgE de las muestras de los sujetos antes de empezar el tratamiento de ITO (tiempo 0), con unos valores de referencia establecidos en base a esas mismas secuencias peptídicas que correlacionan el número de péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de las muestras de los pacientes con la respuesta posterior al tratamiento de ITO.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el método es un método de pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) y la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE del paso b) en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias:

a. las secuencias SEQ ID NO: 19, 21, 25 y 27 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 19, 21, 25 y 27 inmunológicamente activas; y

- b. las secuencias SEQ ID NO: 36, 37 y 38 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 36, 37 y 38 inmunológicamente activas; y
- c. las secuencias SEQ ID NO: 51, 53, 58, 59 y 62 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 51, 53, 58, 59 y 62 inmunológicamente activas; y
- d. la secuencia SEQ ID NO: 69 y/o un derivado de la secuencia SEQ ID NO: 69 inmunológicamente activa; y
- e. las secuencias SEQ ID NO: 71 y 72 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 71 y 72 inmunológicamente activas;

donde el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca se establece correlacionando el número de secuencias peptídicas reconocidas por anticuerpos IgE de las muestras de los sujetos antes de empezar el tratamiento de ITO (tiempo 0), con unos valores de referencia establecidos en base a esas mismas secuencias peptídicas que correlacionan el número de péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de las muestras de los pacientes con la respuesta posterior al tratamiento de ITO. Preferiblemente, los valores de referencia se establecen en la figura 9.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el método es un método de pronóstico de la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO y la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE del paso b) en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias:

- a. las secuencias SEQ ID NO: 28 y 31 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 28 y 31 inmunológicamente activas; y
- b. las secuencias SEQ ID NO: 36-40 y 44 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 36-40 y 44 inmunológicamente activas; y
- c. las secuencias SEQ ID NO: 53, 55 y 56 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 53, 55 y 56 inmunológicamente activas; y

- d. las secuencias SEQ ID NO: 67 y 68 y/o un derivado de la secuencia SEQ ID NO: 67 y 68 inmunológicamente activas; y
- e. las secuencias SEQ ID NO: 70, 72 y 75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 70, 72 y 75 inmunológicamente activas;

5           donde la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca se establece correlacionando el número de secuencias peptídicas reconocidas por anticuerpos IgE de las muestras de los sujetos antes de empezar el tratamiento de ITO (tiempo 0), con unos valores de referencia establecidos en base a esas mismas  
10   secuencias peptídicas que correlacionan el número de péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de las muestras de los pacientes con la respuesta posterior al tratamiento de ITO. Preferiblemente, los valores de referencia se establecen en la figura 10.

En aún otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la determinación  
15   de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 18-75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-75 inmunológicamente activas, donde el pronóstico del número de reacciones durante la  
20   inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca se establece correlacionando el número de secuencias peptídicas reconocidas por anticuerpos IgE de las muestras de los sujetos antes de empezar el tratamiento de ITO (tiempo 0), con unos valores de referencia establecidos en base a esas mismas secuencias peptídicas que correlacionan el número de péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de las  
25   muestras de los pacientes con la respuesta posterior al tratamiento de ITO. Preferiblemente, los valores de referencia se establecen en la figura 8.

En aún otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con  
30   especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes

secuencias: SEQ ID NO: 18-75 y/o preferiblemente derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-75 inmunológicamente activas, donde:

- un reconocimiento menor del 15% de los péptidos es indicativo de buen pronóstico,
- 5       – un reconocimiento de entre 15% - 75% de los péptidos es indicativo de pronóstico moderado
- un reconocimiento superior al 75% de péptidos es indicativo de mal pronóstico.

10       En una realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, la muestra biológica incluye diferentes tipos de muestras de tejidos, así como de fluidos biológicos, tales como sangre, suero, plasma, fluido cerebroespinal, fluido peritoneal, heces u orina. Preferiblemente, la muestra se selecciona entre sangre, plasma, suero u orina.

15       En una realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, la presencia de los péptidos se determina mediante inmunoensayo.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, la presencia de los péptidos se determina mediante microarrays de péptidos.

20       Un segundo aspecto de la invención se refiere a un microarray peptídico adecuado para llevar a cabo el método del primer aspecto de la invención o cualquiera de sus realizaciones preferidas, que comprende las combinaciones de secuencias peptídicas definidas en dicho método o en dichas realizaciones.

25       Un tercer aspecto se refiere a una composición adecuada para llevar a cabo el método del primer aspecto de la invención o cualquiera de sus realizaciones preferidas, que comprende las combinaciones de péptidos definidas en dicho método o en dichas realizaciones.

Un cuarto aspecto se refiere a un kit adecuado para llevar a cabo el método del primer aspecto de la invención o cualquiera de sus realizaciones preferidas, que comprende las combinaciones de péptidos definidas en dicho método o en dichas realizaciones.

En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención dicho kit comprende:

- 5           a. Unas moléculas de reconocimiento (biomoléculas de captura), capaces de reconocer IgE, seleccionadas de la lista que consiste en las distintas combinaciones de secuencias peptídicas definidas en el método del primer aspecto de la invención o en cualquiera de sus realizaciones preferidas; y
- 10           b. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana o la biomolécula de captura opcionalmente unida a una molécula etiqueta.

En otra realización preferida del cuarto aspecto de la invención dicho kit comprende:

- 15           a. Unas moléculas de reconocimiento (biomoléculas de captura), capaces de reconocer IgE, seleccionadas de la lista que consiste en las distintas combinaciones de péptidos definidas en el método del primer aspecto de la invención o en cualquiera de sus realizaciones preferidas; y
- b. Un soporte donde inmovilizar las biomoléculas de reconocimiento de la etapa a); y
- 20           c. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana o la biomolécula de captura opcionalmente unida a una molécula etiqueta.

Un quinto aspecto de la invención se refiere al uso del kit del cuarto aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, o la composición del tercer aspecto de la invención o el microarray peptídico del segundo aspecto de la invención, para pronosticar el número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO y/o la necesidad de administrar pre-medicación durante la ITO.

En un sexto aspecto de la invención, la presente invención se refiere a un método para el pronóstico y seguimiento del tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca con inmunoterapia oral con leche de vaca que comprende determinar la presencia de anticuerpos IgE o IgG4 contra los péptidos identificados con las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-17 y/o fragmentos de los mismos en una muestra aislada de un sujeto.

En una realización particular del sexto aspecto de la invención, un reconocimiento menor del 15% de los péptidos (aquellos reconocidos por los anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) es indicativo de buen pronóstico.

En una realización particular del sexto aspecto de la invención, un reconocimiento comprendido entre un 15% - 75% de péptidos (aquellos reconocidos por los anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) es indicativo de pronóstico moderado.

En una realización particular del sexto aspecto de la invención, un reconocimiento superior al 75% de péptidos (aquellos reconocidos por los anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) es indicativo de mal pronóstico.

En una realización en particular del sexto aspecto de la invención, los fragmentos de los péptidos (aquellos reconocidos por los anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) se identifican con las secuencias SEQ ID NO: 18-75

En una realización en particular del sexto aspecto de la invención, la muestra a analizar es seleccionada entre sangre, suero u orina.

En una realización en particular del sexto aspecto de la invención, la presencia de los péptidos y/o fragmentos de los mismos se determina mediante inmunoensayo.

En una realización en particular del sexto aspecto de la invención, la presencia de los péptidos y/o fragmentos de los mismos se determina mediante microarrays de péptidos.

Un séptimo aspecto de la invención se refiere a un microarray para el pronóstico y seguimiento del tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca con inmunoterapia oral con leche de vaca según el método del sexto aspecto de la presente

invención que comprende los péptidos de las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-17 y/o fragmentos de los mismos.

Un octavo aspecto de la invención se refiere a un kit para el pronóstico y seguimiento del tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca con inmunoterapia oral con leche de vaca según el método del sexto aspecto de la presente invención, que comprende los péptidos de las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-17 y/o fragmentos de los mismos.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del kit del octavo aspecto de la invención para el pronóstico y seguimiento del tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca con inmunoterapia oral con leche de vaca.

### **Breve descripción de las figuras**

En la figura 1 se representa la evolución temporal del número de péptidos reconocidos por los pacientes por IgE (0, tiempo antes de empezar el tratamiento de ITO; D, tiempo en el que se alcanza la tolerancia/desensibilización; 6, 12 y 24 meses de seguimientos tras la desensibilización). Los pacientes de alto riesgo reconocen un mayor número de péptidos por IgE ya antes de empezar el tratamiento de ITO, lo cual permite distinguir los pacientes de alto riesgo de los de moderado y bajo riesgo. El número de péptidos IgE que reconocen los distintos grupos de pacientes disminuye con tiempo de seguimiento lo cual es informativo sobre la duración mínima que tiene que tener la ITO con leche de vaca.

a: IgE-alfa-S1-caseína; b: IgE-alfa-S2-caseína, c: IgE-b-caseína, d: IgE-b-lactoglobulina, e: IgE-k- caseína.

En la figura 2 se representa la evolución temporal del número de péptidos reconocidos por los pacientes por IgG4 (0, tiempo antes de empezar el tratamiento de ITO; D, tiempo en el que se alcanza la tolerancia/desensibilización; 6, 12 y 24 meses de seguimientos tras la desensibilización). El número de péptidos que reconocen los distintos grupos de pacientes aumenta durante tiempo de seguimiento lo cual es indicativo del mantenimiento de la tolerancia y por tanto la eficacia del tratamiento con ITO con leche de vaca.

a: IgG4- alfa-S1-caseína; b: IgG4-alfa-S2-caseína, c: IgG4-b-caseína, d: IgG4-b-lactoglobulina, e: IgG4-k- caseína.

Las figuras 3 a 7, muestran el análisis de agrupamiento jerárquico (Análisis de cluster), el análisis estadístico de las distintas regiones reconocidas por los diferentes grupos de pacientes (Análisis estadístico –Gr 1 pacientes de bajo riesgo, Gr 2 pacientes de riesgo moderado y Gr 3 pacientes de riesgo alto-) y la selección de péptidos importantes (key peptide biomarker) (flechas) para la clasificación de los pacientes. Mediante el análisis de clúster hemos visto que el patrón de reconocimiento inmunológico por anticuerpos IgE antes de empezar el tratamiento (tiempo 0) de los pacientes con alto riesgo es muy parecido y se agrupan en la zona derecha de la gráfica (p5, p9, p11, p19 y p25). Mediante el análisis estadístico hemos localizado aquellas zonas o epítomos con diferencia significativas en el patrón de reconocimiento de los pacientes de alto riesgo respecto a los de bajo riesgo y riesgo moderado. Mediante el análisis bioinformático de machine learning hemos localizado los mejores péptidos para la estimación de la evolución del tratamiento de ITO. Con todo ello hemos seleccionado 58 péptidos (ver secuencias en figura 8) de las proteínas alfa-s1-caseína, alfa-s2-caseína, beta-caseína, kapa-caseína y beta-lactoglobulina que son importantes para la estimación de la evolución del tratamiento de ITO,

Figura 3: alfa-S1-caseína (IgE) sin ponderar,

Figura 4: alfa-S2-caseína (IgE) sin ponderar,

Figura 5: b-caseína (IgE) sin ponderar,

Figura 6: k- caseína (IgE) sin ponderar,

Figura 7: b-lactoglobulina (IgE) sin ponderar.

La figura 8 muestra la correlación lineal entre el número de péptidos reconocidos de los 58 péptidos mostrados en la tabla I y el número de reacciones alérgicas durante el tratamiento de ITO ( $r^2$  0,803) y el tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización ( $r^2$  0,601) de los diferentes pacientes.

La figura 9 muestra la correlación entre el número de péptidos reconocidos de esa lista por IgE antes de empezar el tratamiento de ITO y el número de reacciones alérgicas durante el tratamiento de los diferentes pacientes

La figura 10 muestra la correlación entre el número de péptidos reconocidos de la (tabla 3) lista por IgE antes de empezar el tratamiento de ITO y el tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización de los diferentes pacientes.

### **Descripción detallada de la invención**

#### **Definiciones**

En el contexto de la presente invención por “buen pronóstico” se refiere a la baja probabilidad de tener reacciones adversas durante la desensibilización (<7 reacciones) y requerir poco tiempo en alcanzar la tolerancia a la leche de vaca (< 8 semanas) y no requerir pre-medicación (ni antihistamínicos, ni corticoides).

En el contexto de la presente invención por “pronóstico moderado” se refiere a un número alto de reacciones alérgicas durante la desensibilización (>7 reacciones) o requerir mucho tiempo en alcanzar la tolerancia a la leche de vaca (> 8 semanas) o requerir antihistamínicos como pre-medicación.

En el contexto de la presente invención por “mal pronóstico” se refiere a un número alto de reacciones alérgicas durante la desensibilización (>7 reacciones) y requerir mucho tiempo en alcanzar la tolerancia a la leche de vaca (> 8 semanas) y requerir antihistamínicos y corticoides como pre-medicación.

En el contexto de la presente invención, tolerancia/desensibilización se define como la ingesta de 200 ml de leche de vaca sin tener reacciones adversas.

En el contexto de la presente invención, pre-medicación se refiere a la administración de antihistamínicos y/o corticoides antes de cada una de las fases de la ITO.

En el contexto de la presente invención, “anticuerpos IgE contra o con especificidad frente a” se refiere a anticuerpos IgE que reconocen cualquiera de las secuencias de los 58 epitopos/péptidos mostrados en la tabla 1, preferiblemente con un umbral de intensidad igual o superior a 3 (z-score>3) leídos en un escáner de fluorescencia

ScanArray Express (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) con un laser de 543nm para detectar las señal del IgE-Alexa 546.

En el contexto de la presente invención, por derivados de las secuencias de la invención inmunológicamente activas se entienden aquellos fragmentos de cualquiera  
5 de las SEQ ID No 19-75 que puedan constituir epítomos o determinantes antigénicos a los que se unen inmunoglobulinas tipo E (IgE), preferiblemente con un umbral de intensidad igual o superior a 3 ( $z\text{-score} > 3$ ) leídos en un escáner de fluorescencia ScanArray Express (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) con un laser de 543nm para detectar las señal del IgE-Alexa 546, de los pacientes alérgicos a leche de vaca y que  
10 se puede determinar mediante un inmunoensayo.

En el contexto de la presente invención, por inmunoglobulinas tipo E (IgE) se entiende el isotipo de inmunoglobulinas tipo E, también conocidos como anticuerpos plasmáticos del tipo E. Por IgG4 se entiende el isotipo de inmunoglobulinas tipo G4, también conocidos como anticuerpos plasmáticos del tipo G4.

#### 15 **Descripción detallada de la invención**

Mediante microarrays de péptidos se analizó el patrón de reconocimiento inmunológico (reconocimiento IgE e IgG4) a proteínas de la leche de vaca (alfa-s1-caseína, alfa-s2-caseína, beta-caseína, kapa-caseína y beta-lactoglobulina) en pacientes alérgicos a lo largo del tratamiento de ITO. Los tiempos analizados fueron:

- 20 – Antes del tratamiento (0)
- Una vez alcanzada la tolerancia mediante ITO (D)
- 6, 12 y 24 meses tras alcanzada la tolerancia (6, 12 y 24 respectivamente).

Se diseñó un protocolo de ITO para la administración de la leche de vaca en dos fases una fase de inicio consistente en cuatro días con dosis progresivas cada día y seis días  
25 más de administración de una única dosis dos veces por semana hasta alcanzar la dosis completa de 200 ml de leche de vaca. Esta pauta sufrió modificaciones en función de la tolerancia a la misma, aparición de patologías intercurrentes ajenas al estudio (fiebre, episodios catarrales, otros procesos infecciosos en particular digestivos,

etc.). Se registraron y cuantificaron todas las reacciones que surgieron durante la administración de la leche de vaca tanto en el hospital como fuera del ámbito sanitario.

Se seleccionaron pacientes con alergia persistente a proteínas de leche de vaca.

Los criterios de Inclusión para los pacientes fueron:

- 5 Niños mayores de 4 años, con el diagnóstico de APLV que no hubiesen alcanzado la tolerancia de forma espontánea.

Para confirmar la persistencia de APLV en el momento de inclusión de los pacientes en el estudio se llevaron a cabo pruebas cutáneas y determinación de IgE específica frente a la leche de vaca y fracciones (betalactoglobulina, alfa lactoalbumina y caseína)  
10 y se realizó una provocación doble ciego controlada con placebo frente a leche de vaca.

Se requirió la positividad de las pruebas cutáneas y presencia de IgE específica frente a leche de vaca o cualquiera de sus fracciones y una provocación positiva con la exposición a la leche de vaca que reprodujera síntomas inmediatos de alergia.

- 15 Se consideraba una prueba cutánea positiva aquella de igual o superior tamaño que la producida por la histamina y se consideró positiva una determinación de IgE específica superior a 0,35 kU/L determinada por CAP (Thermo Fisher Scientific).

Se excluyeron a los niños diagnosticados de APLV que no cumplieran los criterios previos definidos y aquellos que presentaran intolerancia a la lactosa o reacciones no  
20 mediadas por IgE.

Se incluyeron un total de 47 pacientes de ellos 12 fueron excluidos por presentar algún criterio de exclusión. Un total de 35 niños cumplieron los criterios de inclusión y a todos se les ofreció el tratamiento con ITO con leche de vaca. De los 35 un total de 24 aceptaron el tratamiento y los otros 7 niños rechazaron el tratamiento pero aceptaron  
25 mantenerse en el estudio como grupo control.

En cuanto a la eficacia del tratamiento se consideró eficacia alcanzar sin reacciones adversas la cantidad 200 ml de leche de vaca al día.

En cuanto a la seguridad de la pauta de ITO con leche de vaca, se consideraron el número de reacciones alérgicas presentadas por cada paciente durante el procedimiento, la necesidad de protección con medicación antialérgica (corticoide y antihistamínica) y la duración de la pauta.

- 5 Los 24 pacientes incluidos alcanzaron la dosis de 200 ml luego el procedimiento fue eficaz en todos los casos.

Se clasificaron a los pacientes según duración mayor o menor a 8 semanas (mediana de duración del procedimiento con todos los pacientes), número de reacciones mayor a 7 (mediana de reacciones del grupo) y la necesidad o no de medicación antialérgica (antihistamínicos y/o corticoides) para la administración de las dosis (Si, No) .

Según estos criterios los pacientes se clasificaron en tres grupos

- Bajo riesgo (menos de 8 semanas, menos de 7 reacciones y no necesidad de medicación). Este perfil lo presentaron 7 pacientes,
- 15 – Riesgo moderado (más de 8 semanas y/o más de 7 reacciones y/o pre-medicación con antihistaminicos). Este perfil lo presentaron 12 pacientes,
- Alto riesgo (más de 8 semanas y más de 7 reacciones y pre-medicación completa (antihistminicos y coroticoides). Este perfil lo presentaron 5 pacientes

Una vez efectuado el ensayo, los autores de la presente invención correlacionaron el número de péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de los sueros de los pacientes para las distintas proteínas antes de empezar el tratamiento de ITO (tiempo 0), con la respuesta posterior a dicho tratamiento. Los pacientes de bajo riesgo reconocieron pocos péptidos, los pacientes con mucho riesgo reconocieron muchos péptidos y los pacientes con riesgo moderado reconocieron un número intermedio de péptidos. A partir de este ensayo se encontraron 58 epitopos/péptidos de las cinco proteínas responsables de la APLV que son informativos para el pronóstico de la respuesta a la ITO frente a leche de vaca (tabla 1 y figuras 3 a 7). Además, la evolución temporal en el reconocimiento por IgE (y opcionalmente IgG4) de estos 58 epítomos/péptidos permite determinar el tiempo de duración de la ITO (aumento de reconocimiento IgG4 y disminución de IgE), y señalar el estado inmunológico del paciente de

tolerancia/desensibilización (tolera el alimento requiriendo exposición al alérgeno a diario y sin interrupción) o tolerancia permanente (tolera el alimento y la suspensión del mismo durante un periodo de tiempo no cambia el estado de tolerancia), y por tanto la eficacia global de la ITO con leche de vaca.

- 5 Mediante el análisis bioinformático, de entre los 58 epitopos/péptidos descritos anteriormente, se localizó un subgrupo de 27 epitopos/péptidos que presentan un elevado valor pronóstico del número de reacciones durante la ITO (tabla 3 y figura 9) y del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia (tabla 4 y figura10).

En la tabla 3 se muestran valores de referencia en base a 16 péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de los sueros de 24 pacientes para la estimación del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO).

En la tabla 4 se muestran valores de referencia en base a 16 péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de los sueros de 24 pacientes para la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO.

- 15 Para establecer la correlación entre el número de secuencias peptídicas reconocidas por anticuerpos IgE de los sueros de los sujetos antes de empezar el tratamiento de ITO (tiempo 0), con los valores de referencia establecidos en base a esas mismas secuencias peptídicas que correlacionan el número de péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de los sueros de los pacientes con la respuesta posterior al tratamiento de ITO, podrán emplearse algoritmos o fórmulas matemáticas, como por ejemplo rectas de regresión como las incluidas en las tablas 3 y 4.

Así a modo de ejemplo, para la estimación del número de reacciones durante la ITO y el del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización se podría utilizar los valores de referencia obtenidos de los 24 pacientes analizados previamente. Así, para la estimación del número de reacciones se podría modelar la relación entre el número de péptidos de la tabla 2 reconocidos por cada uno de los 24 pacientes de referencia y el número de reacciones que han sufrido cada uno de ellos durante la ITO mediante un modelo de regresión lineal o ajuste lineal (figura 9), estableciendo de esta forma una ecuación que permite en nuevos pacientes estimar el

número de reacciones que sufrirá durante la ITO en base al número de péptidos reconocidos antes de empezar el tratamiento.

Por otro lado y para la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO se podría modelar la relación entre el número de péptidos de la tabla 3 reconocidos por cada uno de los 24 pacientes de referencia y el tiempo requerido por cada uno de ellos para alcanzar la tolerancia mediante un modelo de regresión lineal o ajuste lineal (figura 10) y de esta forma establecer una ecuación que permite en nuevos pacientes estimar el tiempo requerido para alcanzar la tolerancia durante la ITO en base al número de péptidos reconocidos antes de empezar el tratamiento.

Así, tal y como se puede ver en las figuras 8-10, analizando el patrón de reconocimiento IgE de las secuencias inmunologicamente activas de los 58 epitopos/péptidos mostrados en la tabla 1, así como de subconjuntos de dichas secuencias como lo son los 16 péptidos mostrados en la tabla 3 o los 16 péptidos mostrados en la tabla 4, se han establecido una serie de valores de referencia (ver figuras 8-10) que permiten, en función del número de péptidos reconocidos por IgE en una muestra aislada de un paciente antes de empezar el tratamiento ITO, estimar el número de reacciones adversas y el tiempo requerido para alcanzar la desensibilización así como la necesidad o no de pre-medicación. Además, nos permite clasificar a los pacientes en función del número de péptidos reconocidos por IgE antes de empezar la ITO como de bajo riesgo, riesgo moderado o riesgo alto.

| ID | Proteína        | Posición | Secuencia     |
|----|-----------------|----------|---------------|
| 1  | alfa-s1-caseína | 6        | SEQ ID NO: 18 |
| 2  | alfa-s1-caseína | 9        | SEQ ID NO: 19 |
| 3  | alfa-s1-caseína | 11       | SEQ ID NO: 20 |
| 4  | alfa-s1-caseína | 25       | SEQ ID NO: 21 |
| 5  | alfa-s1-caseína | 28       | SEQ ID NO: 22 |
| 6  | alfa-s1-caseína | 31       | SEQ ID NO: 23 |

|    |                 |    |               |
|----|-----------------|----|---------------|
| 7  | alfa-s1-caseina | 34 | SEQ ID NO: 24 |
| 8  | alfa-s1-caseina | 37 | SEQ ID NO: 25 |
| 9  | alfa-s1-caseina | 43 | SEQ ID NO: 26 |
| 10 | alfa-s1-caseina | 45 | SEQ ID NO: 27 |
| 11 | alfa-s1-caseina | 46 | SEQ ID NO: 28 |
| 12 | alfa-s1-caseina | 49 | SEQ ID NO: 29 |
| 13 | alfa-s1-caseina | 52 | SEQ ID NO: 30 |
| 14 | alfa-s1-caseina | 59 | SEQ ID NO: 31 |
| 15 | alfa-s1-caseina | 60 | SEQ ID NO: 32 |
| 16 | alfa-s2-caseina | 7  | SEQ ID NO: 33 |
| 17 | alfa-s2-caseina | 9  | SEQ ID NO: 34 |
| 18 | alfa-s2-caseina | 11 | SEQ ID NO: 35 |
| 19 | alfa-s2-caseina | 14 | SEQ ID NO: 36 |
| 20 | alfa-s2-caseina | 21 | SEQ ID NO: 37 |
| 21 | alfa-s2-caseina | 22 | SEQ ID NO: 38 |
| 22 | alfa-s2-caseina | 23 | SEQ ID NO: 39 |
| 23 | alfa-s2-caseina | 24 | SEQ ID NO: 40 |
| 24 | alfa-s2-caseina | 28 | SEQ ID NO: 41 |
| 25 | alfa-s2-caseina | 32 | SEQ ID NO: 42 |
| 26 | alfa-s2-caseina | 35 | SEQ ID NO: 43 |
| 27 | alfa-s2-caseina | 50 | SEQ ID NO: 44 |
| 28 | alfa-s2-caseina | 52 | SEQ ID NO: 45 |
| 29 | beta-caseina    | 1  | SEQ ID NO: 46 |
| 30 | beta-caseina    | 15 | SEQ ID NO: 47 |
| 31 | beta-caseina    | 25 | SEQ ID NO: 48 |
| 32 | beta-caseina    | 28 | SEQ ID NO: 49 |
| 33 | beta-caseina    | 32 | SEQ ID NO: 50 |
| 34 | beta-caseina    | 34 | SEQ ID NO: 51 |
| 35 | beta-caseina    | 36 | SEQ ID NO: 52 |

|    |                     |    |               |
|----|---------------------|----|---------------|
| 36 | beta-caseina        | 43 | SEQ ID NO: 53 |
| 37 | beta-caseina        | 45 | SEQ ID NO: 54 |
| 38 | beta-caseina        | 47 | SEQ ID NO: 55 |
| 39 | beta-caseina        | 48 | SEQ ID NO: 56 |
| 40 | beta-caseina        | 51 | SEQ ID NO: 57 |
| 41 | beta-caseina        | 53 | SEQ ID NO: 58 |
| 42 | beta-caseina        | 54 | SEQ ID NO: 59 |
| 43 | beta-caseina        | 56 | SEQ ID NO: 60 |
| 44 | beta-caseina        | 59 | SEQ ID NO: 61 |
| 45 | beta-caseina        | 61 | SEQ ID NO: 62 |
| 46 | beta-caseina        | 64 | SEQ ID NO: 63 |
| 47 | kapa-caseina        | 3  | SEQ ID NO: 64 |
| 48 | kapa-caseina        | 5  | SEQ ID NO: 65 |
| 49 | kapa-caseina        | 7  | SEQ ID NO: 66 |
| 50 | kapa-caseina        | 8  | SEQ ID NO: 67 |
| 51 | kapa-caseina        | 17 | SEQ ID NO: 68 |
| 52 | kapa-caseina        | 18 | SEQ ID NO: 69 |
| 53 | beta-lactoglobilina | 6  | SEQ ID NO: 70 |
| 54 | beta-lactoglobilina | 42 | SEQ ID NO: 71 |
| 55 | beta-lactoglobilina | 43 | SEQ ID NO: 72 |
| 56 | beta-lactoglobilina | 44 | SEQ ID NO: 73 |
| 57 | beta-lactoglobilina | 46 | SEQ ID NO: 74 |
| 58 | beta-lactoglobilina | 47 | SEQ ID NO: 75 |

**Tabla 1**

La tabla 1 muestra los 58 epitopos/péptidos de las cinco proteínas responsables de la APLV.

La tabla 2 muestra las 17 secuencias (ver figuras 3-7) que engloban los 58 epitopos/péptidos de las cinco proteínas responsables de la APLV.

| I<br>D | Secuencia                                               |
|--------|---------------------------------------------------------|
| 1      | LNENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTE                     |
| 2      | PNSVEQKHIQKEDVPSEYRLGYLEQLRLKKYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIH |
| 3      | IHAQQKEPMIGVNLQELAYFYPELFRQFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQ         |
| 4      | DAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMP                                 |
| 5      | TYKQEKMAINPSKENLCSTFCKEVVRNANEEYSIGSSSE                 |
| 6      | SAEVATEEVKITVDDKHQKALNEINQFY                            |
| 7      | LNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVKRNAVPITPT               |
| 8      | TKKTKLTEEEKNRLNFLKKISQRYQK                              |
| 9      | RELEELNVPGEIVESLSSE                                     |
| 10     | DELQDKIHPPFAQTQSLVYPF                                   |
| 11     | NIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVKEA                           |
| 12     | GVSKVKEAMAPKHKEMPFPKYPVEPFTESQSL                        |
| 13     | LTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQKAVPYP |
| 4      | QRDMPIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPIIV                            |
| 14     | QPIRCEKDERFFSDKIAKYIPIQYVLSRYPSYGLN                     |
| 15     | ALINNQFLPYPPYAKPAAVRSPA                                 |
| 16     | AGTWYSLAMAASDISLLDAQ                                    |
| 17     | RTPEVDDEALEKFDKALKALPMHIRLSFNPTQLEE                     |

**Tabla 2**

A continuación los siguientes ejemplos sirven meramente para ilustrar la invención pero en ningún caso para limitar la misma.

Ejemplo 1:

5 Utilizando un robot de impresión de microarrays SpotArray 72 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) se imprimieron microarrays sobre cristales NSB27 NHS funcionalizados con N-hidroxil succinimidil (NanoSurface Biosciences-POSTECH, Seoul, Korea) conteniendo los 27 péptidos con ID: 2 ( $\alpha$ -s1-casein p9), 4 ( $\alpha$ -s1-casein p25), 8 ( $\alpha$ -s1-casein p37), 10 ( $\alpha$ -s1-casein p45), 11 ( $\alpha$ -s1-casein p46), 14 ( $\alpha$ -s1-casein p59), 19 (alfa-s2-caseína p14), 20 (alfa-s2-caseína p21), 21 (alfa-s2-caseína p22), 22 (alfa-s2-caseína p23), 23 (alfa-s2-caseína p24), 27 (alfa-s2-caseína p50), 34 (beta-caseína p34), 36 (beta-caseína p43), 38 (beta-caseína p47), 39 (beta-caseína p48), 41 (beta-caseína p53), 42 (beta-caseína p54), 45 (beta-caseína p61), 50 (kapa-caseína p8), 51 (kapa-caseína p17), 52 (kapa-caseína p18), 53 (beta-lactoglobulina p6), 54 (beta-lactoglobulina p42), 55 (beta-lactoglobulina p43), 56 (beta-lactoglobulina p44) y 58 (beta-lactoglobulina p47); ver tabla 3 y 4 y figura 9 y 10. Para su impresión los péptidos se disuelven en una solución 1:1 de tampón fosfato salino (PBS) y tampón de impresión (PPB) (protein printing buffer, Arrayit Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Una vez impresos los microarrays se bloquearon las uniones inespecíficas durante 1 hora a 20 temperatura ambiente con una solución 1:1 de solución de bloqueo BlockIt™ (Arrayit Corporation, Sunnyvale, CA, USA) y PBS conteniendo Tween 20 al 0.1% y Albumina Sérica Bovina al 2% (PBS-T-BSA).

Los sueros obtenidos de 3 pacientes se incubaron en la superficie de los microarrays durante 16h, a 4°C y en agitación continua. Se retiró la muestra de los microarrays y se lavó dos veces con una solución de PBS-T-BSA. A continuación se incubaron con 25 una solución de anticuerpos fluorescentes anti IgE human (G7-26, BD-PharMingen, San Diego, CA, USA) marcado con Alexa 546 y anti IgG4 humana (G14-4, BD-PharMingen, San Diego, CA, USA) marcado con Alexa 647, diluidos 1/1000 en PBS-T-

BSA. Se retiró la solución de anticuerpos y se lavó dos veces con una solución de PBS-T-BSA.

Para detectar la presencia en el suero de los pacientes de anticuerpos IgE e IgG4 frente a los distintos péptidos de las proteínas alergénicas de leche de vaca, los microarrays fueron leídos en un escáner de fluorescencia ScanArray Express (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) con dos láseres (laser de 543nm para detectar la señal del IgE-Alexa 546 y laser de 633nm para detectar la señal de IgG4-Alexa 647). Los resultados se cuantificaron y normalizaron para transformar la señal de fluorescencia en un parámetro numérico (unidades arbitrarias de fluorescencia o z-score). Se calculó el número de péptidos con una señal de fluorescencia superior a 3 (z-score>3). El primer paciente reconoció 2 péptidos, el segundo paciente 8 péptidos y el tercer paciente 15 péptidos.

El paciente con un reconocimiento de 2 péptidos tiene un buen pronóstico (baja probabilidad de tener reacciones adversas durante la desensibilización - estimación 3 reacciones alérgicas, ver tabla 3 y figura 9- y de tardar poco tiempo en alcanzar la tolerancia a la leche de vaca – estimación 7 semanas, ver tabla 4 y figura 10-).

El pacientes con un reconocimiento de 8 péptidos tiene un pronóstico intermedio (riesgo moderado de tener reacciones adversas durante la desensibilización – estimación 10 reacciones alérgicas, ver tabla 3 y figura 9- y de tardar un tiempo intermedio en alcanzar la tolerancia a la leche de vaca –estimación 11 semanas, ver tabla 4 y figura 10-).

Pacientes con un reconocimiento de 15 péptidos tiene un mal pronóstico (alta probabilidad de tener reacciones adversas durante la desensibilización – estimación 19 reacciones alérgicas, ver tabla 2 y figura 9- y de tardar mucho tiempo en alcanzar la tolerancia a la leche de vaca – estimación 16 semanas. Adicionalmente, estos pacientes requerirán pre-medicación y serán tratamiento con antihistamínicos y corticoides antes de cada una de las fases de la ITO (ver tabla 4 y figura 10).

| ID | Proteína               | Sequencia    |
|----|------------------------|--------------|
| 2  | $\alpha$ -s1-casein p9 | SEQ ID NO:19 |

|    |                                          |                          |
|----|------------------------------------------|--------------------------|
| 4  | <b><math>\alpha</math>-s1-casein p25</b> | <b>SEQ ID NO:<br/>21</b> |
| 8  | <b><math>\alpha</math>-s1-casein p37</b> | <b>SEQ ID NO:<br/>25</b> |
| 10 | <b><math>\alpha</math>-s1-casein p45</b> | <b>SEQ ID NO:<br/>27</b> |
| 19 | <b>alfa-s2-caseina p14</b>               | <b>SEQ ID NO:<br/>36</b> |
| 20 | <b>alfa-s2-caseina p21</b>               | <b>SEQ ID NO:<br/>37</b> |
| 21 | <b>alfa-s2-caseina p22</b>               | <b>SEQ ID NO:<br/>38</b> |
| 34 | <b>beta-caseina p34</b>                  | <b>SEQ ID NO:<br/>51</b> |
| 36 | <b>beta-caseina p43</b>                  | <b>SEQ ID NO:<br/>53</b> |
| 41 | <b>beta-caseina p53</b>                  | <b>SEQ ID NO:<br/>58</b> |
| 42 | <b>beta-caseina p54</b>                  | <b>SEQ ID NO:<br/>59</b> |
| 45 | <b>beta-caseina p61</b>                  | <b>SEQ ID NO:<br/>62</b> |
| 52 | <b>kapa-caseina p18</b>                  | <b>SEQ ID NO:<br/>69</b> |
| 54 | <b>beta-lactoglobilina<br/>p42</b>       | <b>SEQ ID NO:<br/>71</b> |
| 55 | <b>beta-lactoglobilina<br/>p43</b>       | <b>SEQ ID NO:<br/>72</b> |
| 56 | <b>beta-lactoglobilina<br/>p44</b>       | <b>SEQ ID NO:<br/>73</b> |

Tabla 3

Tabla 3: péptidos que mejor estiman el número de reacciones durante la ITO

Fórmula: Estimación de reacciones=1.1733 N° de péptidos + 1.0362

5 N° péptidos: 2, Estimación de reacciones: 3

N° péptidos: 8, Estimación de reacciones: 10

N° péptidos: 15, Estimación de reacciones: 19

| ID | Péptido                    | Secuencia     |
|----|----------------------------|---------------|
| 11 | $\alpha$ -s1-casein p46    | SEQ ID NO: 28 |
| 14 | $\alpha$ -s1-casein p59    | SEQ ID NO: 31 |
| 19 | alfa-s2-caseina p14        | SEQ ID NO: 36 |
| 20 | alfa-s2-caseina p21        | SEQ ID NO: 37 |
| 21 | alfa-s2-caseina p22        | SEQ ID NO: 38 |
| 22 | alfa-s2-caseina p23        | SEQ ID NO: 39 |
| 23 | alfa-s2-caseina p24        | SEQ ID NO: 40 |
| 27 | alfa-s2-caseina p50        | SEQ ID NO: 44 |
| 36 | beta-caseina p43           | SEQ ID NO: 53 |
| 38 | beta-caseina p47           | SEQ ID NO: 55 |
| 39 | beta-caseina p48           | SEQ ID NO: 56 |
| 50 | kapa-caseina p8            | SEQ ID NO: 67 |
| 51 | kapa-caseina p17           | SEQ ID NO: 68 |
| 53 | beta-lactoglobulina p6     | SEQ ID NO: 70 |
| 55 | beta-lactoglobulina<br>p43 | SEQ ID NO: 72 |
| 58 | beta-lactoglobulina<br>p47 | SEQ ID NO: 75 |

**Tabla 4**

Tabla 4: péptidos que mejor estiman el tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO.

Fórmula: Estimación de tiempo de tratamiento (semanas) =  $(0.7318 * N^{\circ} \text{ de péptidos}) + 5.1419$

- 5     $N^{\circ}$  péptidos: 2, Estimación de tiempo de tratamiento (semanas): 7
- $N^{\circ}$  péptidos: 8, Estimación de tiempo de tratamiento (semanas): 11
- $N^{\circ}$  péptidos: 15, Estimación de tiempo de tratamiento (semanas): 16

## **REIVINDICACIONES**

1. Método para el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de premedicación durante la ITO en un sujeto humano, que comprende los siguientes pasos:
  - a. Aislar una muestra biológica del sujeto;
  - b. Determinar la presencia o ausencia de anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) contra o con especificidad frente a los péptidos identificados con las siguientes secuencias:
    - a. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-4 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 18-32 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-32 inmunológicamente activas; y/o
    - b. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 5-8 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 33-45 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 33-45 inmunológicamente activas; y/o
    - c. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 9-13 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 46-63 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 46-63 inmunológicamente activas; y/o
    - d. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 14-15 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ

ID NO: 64-69 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 64-69 inmunológicamente activas; y/o

- e. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 16-17 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 70-75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 70-75 inmunológicamente activas;

donde el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de pre-medicación durante la ITO se establece correlacionando el número de secuencias peptídicas reconocidas por anticuerpos IgE de las muestras de los sujetos antes de empezar el tratamiento de ITO (tiempo 0), con unos valores de referencia establecidos en base a esas mismas secuencias peptídicas que correlacionan el número de péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de las muestras de los pacientes con la respuesta posterior al tratamiento de ITO.

2. Método según la reivindicación 1, donde la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE del paso b) en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias:

- a. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-4 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 18-32 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-32 inmunológicamente activas; y
- b. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 5-8 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO:

33-45 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 33-45 inmunológicamente activas; y

c. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 9-13 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 46-63 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 46-63 inmunológicamente activas; y opcionalmente

d. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 14-15 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 64-69 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 64-69 inmunológicamente activas; y opcionalmente

e. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 16-17 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 70-75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 70-75 inmunológicamente activas;

3. Método según la reivindicación 1, donde la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE del paso b) en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias:

a. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-4 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 18-32 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-32 inmunológicamente activas; y

b. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 5-8 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO:

33-45 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 33-45 inmunológicamente activas; y

c. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 9-13 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 46-63 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 46-63 inmunológicamente activas; y

d. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 14-15 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 64-69 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 64-69 inmunológicamente activas; y

e. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 16-17 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 70-75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 70-75 inmunológicamente activas;

4. Método según la reivindicación 1, donde dicho método es un método de pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) y la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE del paso b) en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias:

a. las secuencias SEQ ID NO: 19, 21, 25 y 27 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 19, 21, 25 y 27 inmunológicamente activas; y

b. las secuencias SEQ ID NO: 36, 37 y 38 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 36, 37 y 38 inmunológicamente activas; y

c. las secuencias SEQ ID NO: 51, 53, 58, 59 y 62 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 51, 53, 58, 59 y 62 inmunológicamente activas; y

- d. la secuencia SEQ ID NO: 69 y/o un derivado de la secuencia SEQ ID NO: 69 inmunológicamente activa; y
- e. las secuencias SEQ ID NO: 71 y 72 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 71 y 72 inmunológicamente activas;

5 5. Método según la reivindicación 1, donde el método es un método de pronóstico de la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO y la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE del paso b) en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con  
10 especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias:

- a. las secuencias SEQ ID NO: 28 y 31 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 28 y 31 inmunológicamente activas; y
- b. las secuencias SEQ ID NO: 36-40 y 44 y/o derivados de las  
15 secuencias SEQ ID NO: 36-40 y 44 inmunológicamente activas; y
- c. las secuencias SEQ ID NO: 53, 55 y 56 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 53, 55 y 56 inmunológicamente activas; y
- d. las secuencias SEQ ID NO: 67 y 68 y/o un derivado de la secuencia SEQ ID NO: 67 y 68 inmunológicamente activas; y
- 20 e. las secuencias SEQ ID NO: 70, 72 y 75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 70, 72 y 75 inmunológicamente activas.

6. Método según la reivindicación 1, donde la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con  
25 especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 18-75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-75 inmunológicamente activas.

7. Método según la reivindicación 1, donde la determinación de la presencia o  
30 ausencia de anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) se realiza

determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 18-75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-75 inmunológicamente activas, donde:

- 5           – un reconocimiento menor del 15% de los péptidos es indicativo de buen pronóstico,
- un reconocimiento de entre 15% - 75% de los péptidos es indicativo de pronóstico moderado, y
- 10          – un reconocimiento superior al 75% de péptidos es indicativo de mal pronóstico.

8. Método según la reivindicación 1, donde la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 18-75 y donde:

- 15           – un reconocimiento menor del 15% de los péptidos es indicativo de buen pronóstico,
- un reconocimiento de entre 15% - 75% de los péptidos es indicativo de pronóstico moderado, y
- 20          – un reconocimiento superior al 75% de péptidos es indicativo de mal pronóstico.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra biológica es seleccionada entre fluidos biológicos, tales como sangre, suero, plasma, fluido cerebroespinal, fluido peritoneal, heces u orina.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el reconocimiento de los péptidos se determina mediante inmunoensayo.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 donde el reconocimiento de los péptidos se determina mediante microarrays de péptidos.

12. Microarray peptídico adecuado para llevar a cabo el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 que comprende las combinaciones de péptidos definidas en cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 5 13. Composición adecuada para llevar a cabo el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende las combinaciones de péptidos definidas en cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
14. Kit adecuado para llevar a cabo el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende las combinaciones de péptidos definidas en cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 10 15. Un kit que comprende:
- a. Unas moléculas de reconocimiento (biomoléculas de captura), capaces de reconocer IgE, seleccionadas de la lista que consiste en las distintas combinaciones de péptidos definidas en cualquiera de las reivindicaciones 1-8; y
  - 15 b. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana o la biomolécula de captura opcionalmente unida a una molécula etiqueta.
16. Un kit que comprende:
- a. Unas moléculas de reconocimiento (biomoléculas de captura), capaces de reconocer la IgE, seleccionadas de la lista que consiste en las distintas combinaciones de péptidos definidas en cualquiera de las reivindicaciones 1-8;
  - 20 b. Un soporte donde inmovilizar las biomoléculas de reconocimiento de la etapa a); y
  - 25 c. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana o la biomolécula de captura opcionalmente unida a una molécula etiqueta.
17. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 14-16 para el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas
- 30 de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para

alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO y/o la necesidad de aplicar pre-medicación durante la ITO.

# PATENT COOPERATION TREATY

From the  
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

## PCT

### NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

To:

Fuster, Gustavo  
Hoffmann · Eitle SLU  
Paseo de la Habana 9-11  
ES-28036 Madrid  
ESPAGNE

Date of mailing  
(day/month/year)

11.01.2016

Applicant's or agent's file reference  
900 452 IPER

#### IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.  
PCT/ES2014/070634

International filing date (day/month/year)  
01.08.2014

Priority date (day/month/year)

Applicant

Fundación Para La Investigación Biomédica Del

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

#### 4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international  
preliminary examining authority:



European Patent Office  
D-80298 Munich  
Tel. +49 89 2399 - 0  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Stafl, Laurène

Tel. +49 89 2399-2698



# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |                                                                                   |  |                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-----------------------------------------------------------------------------------|--|--------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br>900 452 IPER                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  | <b>FOR FURTHER ACTION</b>                                                         |  | See Form PCT/IPEA/416          |
| International application No.<br>PCT/ES2014/070634                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  | International filing date (day/month/year)<br>01.08.2014                          |  | Priority date (day/month/year) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>INV. G01N33/68                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |                                                                                   |  |                                |
| Applicant<br>Fundación Para La Investigación Biomédica Del                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |  |                                                                                   |  |                                |
| <p>1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p>3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of <u>12</u> sheets, as follows:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions).</p> <p><input type="checkbox"/> sheets containing rectifications, where the decision was made by this Authority not to take them into account because they were not authorized by or notified to this Authority at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4bis, 70.2(e), 70.16 and 91.2).</p> <p><input type="checkbox"/> superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)).</p> <p>b. <input type="checkbox"/> (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in the form of an Annex C/ST.25 text file, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3ter of Annex C of the Administrative Instructions).</p> |  |                                                                                   |  |                                |
| <p>4. This report contains indications relating to the following items:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. I Basis of the report</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. II Priority</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. IV Lack of unity of invention</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VI Certain documents cited</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VII Certain defects in the international application</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. VIII Certain observations on the international application</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |                                                                                   |  |                                |
| Date of submission of the demand<br><br>01.06.2015                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  | Date of completion of this report<br><br>11.01.2016                               |  |                                |
| Name and mailing address of the international preliminary examining authority:<br><br> European Patent Office<br>D-80298 Munich<br>Tel. +49 89 2399 - 0<br>Fax: +49 89 2399 - 4465                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  | Authorized officer<br><br>Moreno de Vega, C<br><br>Telephone No. +49 89 2399-7486 |  |                                |



**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT  
ON PATENTABILITY**

International application No.  
PCT/ES2014/070634

---

**Box No. I Basis of the report**

---

1. With regard to the **language**, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
  - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
    - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
    - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
    - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b))
2. With regard to the **elements\*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

**Description, Pages**

1-28 as published

**Sequence listings, SEQ ID NO**

1-75 as published

**Claims, Numbers**

1-12 as amended (together with any statement) under Art. 19 PCT

**Drawings, Sheets**

1/20-20/20 as published

☐ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
  - ☐ the claims, Nos.
  - ☐ the drawings, sheets/figs
  - ☐ the sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
- ☐ the description, pages
  - ☐ the claims, Nos.
  - ☐ the drawings, sheets/figs
  - ☐ the sequence listing (*specify*):

# INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.  
PCT/ES2014/070634

5. ☐ This report has been established:
- ☐ taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-bis) and 70.2(e)).
  - ☐ without taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.4bis and 70.2(e)).
6. ☒ With regard to top-up searches (Rules 66.1ter and 70.2(f)):
- ☐ A top-up search was carried out by this Authority on (all discovered documents are listed in the Supplemental Box Relating to Top-up Search).
  - ☐ Additional relevant documents have been discovered during the top-up search.
  - ☒ No top-up search was carried out by this Authority because it would serve no useful purpose.
7. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

\* If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded".

---

## Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

---

### 1. Statement

|                               |             |                |
|-------------------------------|-------------|----------------|
| Novelty (N)                   | Yes: Claims | <u>1-8, 12</u> |
|                               | No: Claims  | <u>9-11</u>    |
| Inventive step (IS)           | Yes: Claims | <u>1-8, 12</u> |
|                               | No: Claims  | <u>9-11</u>    |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | <u>1-12</u>    |
|                               | No: Claims  |                |

### 2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

---

## Box No. VIII Certain observations on the international application

---

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**Re Item V**

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

Reference is made to the following documents:

D1      WANG J ET AL.: "Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy.",  
JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY,  
vol. 125, no. 3, 1 March 2010 (2010-03-01), pages 695-702.E6,  
AMSTERDAM, NL

D2      CERECEDO INMACULADA: "Aplicación de la tecnología microarray al manejo diagnóstico de la alergia a proteínas de leche de vaca",  
TESIS DOCTORAL, May 2009 (2009-05),

1      The amendments filed with the letter dated 01.06.2015 do not introduce subject-matter which extends beyond the content of the application as filed, and thus meet the requirements of Article 34(2)(b) PCT.

2      The present application does not meet the criteria of Article 33(2) PCT, because the subject-matter of claims 9-11 is not new.

Document D2 (see especially pages 82-86) discloses a set of reagents comprising: peptides as defined in claims 9 to 11, detection molecules and a support.

3      D1 is regarded as being the prior art closest to the subject-matter of claims 1-8 and 12, and discloses a study whose aim is to determine whether IgE and IgG4 epitope diversity and affinity of IgG antibodies were correlated with the different clinical phenotypes for milk allergy, including patients with milk allergy, milk tolerant patients, and the intermediate group of patients with milk allergy who can tolerate extensively heated forms of milk, and to identify informative epitopes that might be useful in predicting the clinical outcome of milk allergy.

The subject-matter of claims 1-8 and 12 differs from D1 in that D1 fails to specifically correlate IgE milk allergen epitope recognition with the outcome of a therapeutic intervention, i.e. oral immunotherapy or OIT, and in that the presence of IgE antibodies to the peptides identified in said claims is determined, and is therefore new.

- 4 The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as the provision of a method for prognosticating the response after OIT treatment in all subjects diagnosed with a persistent form of allergy to proteins in cow's milk.

The solution proposed in claims 1-8 and 12 of the present application is considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) for the following reason: the known prior art does not suggest that the specific subset of peptides disclosed in the present invention is useful to prognosticate the efficacy and patient response to OIT against cow's milk in patients unable to tolerate milk.

5 **Re Item VIII**

**Certain observations on the international application**

Present claims 1-12 refer to several peptide sequences and derivatives thereof which are further defined only as being immunologically active. Said definition does not allow to ascertain the scope of the claims, contrary to the requirements of Article 6 PCT.



HOFFMANN EITLE

HOFFMANN EITLE S.L.U. | Paseo de la Habana 9-11 | 28036 Madrid

European Patent Office

80298 Munich

HOFFMANN EITLE S.L.U.

Agencia de la Propiedad Industrial

Paseo de la Habana 9-11

28036 Madrid

España | Spain

T +34. 91. 298 61 78

F +34. 91. 563 97 10

madrid@hoffmanneitle.com

www.hoffmanneitle.es

Munich, June 01, 2015

**Our Ref.: 900452**  
**International Application PCT/ES2014/070634**

We herein demand for International Preliminary Examination (Art. 31 PCT) of the application of reference before the European Patent office as the International Preliminary Examining Authority (IPEA). For this purpose, we herein furnish, with the demand, a translation of the international application into a language which is both a language accepted by the European Patent Office as IPEA, and a language of publication.

It is requested that that the new set of claims attached herein of PCT/ES2014/070634 are declared admissible under the regulations of the PCT treaty.

**1. Claim amendments (Art. 41(2) PCT)**

The subject-matter of the new amended set of claims 1-12 finds explicit support as follows in the specification as originally filed:

Claims 1 and 2 find, respectively, support in claims 1 and 2 as originally filed.

MÜNCHEN  
LONDON  
DÜSSELDORF  
HAMBURG  
MILANO  
MADRID

Hoffmann Eitle S.L.U. professionals include:

European Patent Attorneys

Agentes de la Propiedad Industrial |

Spanish Patent Attorneys

Abogados | Spanish Attorneys at law

German Patent Attorneys

European Trademark Attorneys

1.

Claims 3 to 5 find support in claims 5, 6 and 8 as originally filed, respectively.

Claims 6 to 8 find support in claims 11 to 13 as originally filed, respectively

Claims 9 to 12 find support in claims 15 to 18 as originally filed, respectively.

Therefore, the new set of amended claims does not contain subject-matter which extends beyond the content of the application as filed and thus complies with Art. 41(2) PCT.

## **2. Lack of novelty under art. 33 (2) PCT**

According to the Written Opinion of the International Searching Authority, former claims 12-17 lacked novelty in view of document D2.

It is respectfully submitted that new claim 8 (former claim 12) has now been restricted to the specific use of the peptide microarray for the prognosis of oral immunotherapy (OIT), namely for determining i) the number of reactions during oral immunotherapy (OIT), ii) an estimate of the treatment time required to achieve tolerance or desensitization during OIT and iii) the need to apply pre-medication during OIT. Such use is clearly not derived from the content of document D2.

It is noted that former claim 13 has now been deleted from the new set of amended claims.

As regards claims 9 to 11 (former claims 14 to 16), these claims have now been narrowed to a kit comprising capture biomolecules capable of recognizing IgEs **selected from the list consisting of** any one of SEQ ID NO: 18-75 or consisting of the specific subsets of peptides as defined in any of claims 3 or 4. It is thus noted that said biomolecules are selected from a closed list of 58 peptides. It is noted that even though document D2 describes a peptide microarray with more than 280 peptides it fails to specifically select the subset consisting of the specific 58 peptides of the present invention. Moreover, as already stated, document D2 fails to refer to the prognosis of oral immunotherapy (OIT), nor for determining i) the number of reactions during oral immunotherapy (OIT), or for ii) an estimate of the treatment time required to achieve tolerance or desensitization during OIT or for iii) the need to apply pre-medication during OIT. Such use is thus clearly not directly and unambiguously derived from the content of document D2 and a kit suitable for such purpose is not therein described.

Consequently, we respectfully request the Examiner to reconsider the objection of lack of novelty raised in the Written Opinion of the International Searching Authority.

### **3. Lack of inventive step under art. 33 (2) PCT**

According to the Written Opinion of the International Searching Authority, former claims 4-11 lacked inventive step in view of document D1 in combination with any one of documents D2 or D4.

In this sense, according to the Examiner, D1, which constitutes the closest prior art document, discloses that the IgE recognition patterns can be used as biomarkers to predict the development of tolerance to the proteins of cow's milk during oral immunotherapy. The Examiner then continues the analysis by explaining the content of documents D2 and D4 which, according to the Examiner, disclose the correlation between the different IgE recognition patterns and the different clinical status present in patients suffering from an allergy to the proteins of cow's milk. In this sense, according to the Examiner and based on the above information, a patient who's IgEs recognized a greater number of epitopes suffers from a more persistent form of allergy than those patients that recognized a fewer number of these epitopes. Based on this analysis, the Examiner alleges that by observing the IgE recognition patterns, not only can a differentiation be made between patients suffering from a persistent form of allergy from those who are tolerant to the proteins of cow's milk, but also the natural history of the allergy to cow's milk in a patient can also be predicted (namely whether a patient suffering from allergy to proteins of cow's milk will or not naturally tolerate milk).

Based on the above, the Examiner assumes that those patients suffering from a persistent form of allergy (those that recognized a greater number of epitopes) will need more time to tolerate milk and will suffer a greater number of adverse reactions during oral immunotherapy. The Examiner thus concludes the lack of inventive step of the claims as originally filed based on the above reasoning.

We firmly disagree with the Examiner.

First of all, it is kindly noted that, in this case, the Examiner completely fails to follow the problem-solution approach for the inventive step analysis. This is evident from the fact that no explanation is provided by the Examiner in connection to the differences between D1 and the claims of the application of reference, and no technical effect or objective technical

problem is formulated by the Examiner. In our understanding, the fact that the Examiner fails to follow such approach makes his reasoning abstract and difficult to follow as illustrated in the precedent paragraphs.

In any case, if we follow the Examiner's approach and we use D1 as the most promising starting point, the following is noted. Document D1 discloses a study whose aim is determining whether IgE and IgG4 milk allergen epitope recognition and IgE antibody affinity correlates with different phenotypes of milk allergy (see page 700, left column of the discussion). In addition, this document discloses that IgE from heated milk-tolerant subjects recognized fewer milk allergen peptides from those who were unable to tolerate HM (heated milk). Furthermore, this document discloses that binding to an increased number of IgE peptides correlated with the severity of allergic reactions during oral food challenge.

In our understanding, document D1 teaches a differentiation method between patients suffering from a persistent form of allergy from those who are tolerant to the proteins of cow's milk, and a method for predicting the persistence of cow's milk allergy based on the number of IgE that recognized milk allergen peptides in a subject, namely it teaches a method which could be used to predict the natural history of the allergy to cow's milk (namely whether a patient suffering from allergy to proteins of cow's milk will or not naturally tolerate milk with time).

However, in contrast, the claims of the present invention are not directed to such differentiation method between patients suffering from a persistent form of the allergy from those who are tolerant to the proteins of cow's milk; or to a method for prognosticating or predicting whether a patient suffering from allergy to proteins of cow's milk will or not naturally tolerate milk based on the number of IgEs that recognized milk allergen peptides in said subject; but, to a method for prognosticating the outcome of a therapeutic intervention (oral immunotherapy (OIT)) to induce tolerance in subjects **diagnosed with a persistent form of the allergy**.

In fact, the present invention results from a study protocol which only included children over 4 years of age wherein all of them were diagnosed with a persistent (unable to tolerate) form of allergy to proteins in cow's milk.

The thus difference between new amended claim 1 and D1 is that document D1 fails to specifically correlate IgE milk allergen epitope recognition with the outcome of a therapeutic intervention (oral immunotherapy (OIT)), in terms of i) the number of reactions during oral immunotherapy (OIT), ii) an estimate of the treatment time required to achieve tolerance or desensitization during OIT and iii) the need or not to apply pre-medication during OIT, in subjects diagnosed with a persistent form of the allergy.

The technical effect thus associated to this difference is the provision of a specific subset of immunological active peptides (58 peptides) which correlates IgE milk allergen epitope recognition with the response after OIT treatment in ALL patients diagnosed with a persistent (unable to tolerate) form of allergy to proteins in cow's milk.

The objective technical problem is thus the provision of a method for prognosticating the response after OIT treatment in ALL subjects diagnosed with a persistent (unable to tolerate) form of allergy to proteins in cow's milk.

First of all, the skilled person when confronted with this problem would surely realized that document D1 discloses that binding to increased number of IgE peptides correlated with the severity of allergic reactions during oral food challenge. Therefore, a priori, the skilled person would consider, based on the teachings of D1, that all patients diagnosed with a persistent form of the allergy would always recognized a large number of epitopes and will suffer a greater number of adverse reactions during oral food challenge and also perhaps during oral immunotherapy than those that recognize a lesser number of epitopes since these latter mentioned patients would not suffer from a persistent form of the allergy and would thus tolerate milk more easily. In understanding, this line of argument is more or less in line with the Examiner's allegations.

However, surprisingly, the fact of the matter, and the key of the present invention, is that it is not true that all patients suffering from a persistent form of allergy necessarily have to recognized a large number of the linear epitopes disclose in any of documents D1, D2 or D4. In fact, as disclose in figures 3a, 4a, 5a, 6a and 7a of the application of reference, there are a large number of patients diagnosed with a persistent (unable to tolerate) form of allergy to proteins in cow's milk who only recognize a very small number of milk allergen peptides, if any (in fact 2/3 of the total number of patients studied, recognized a very small number of milk allergens). In this sense and just as a mere example, please refer to patients 4, 10, 23, 2, 24 or 7 in figures 3a, 5a, 6a and 7a, as shown, these patients fail to recognize a

large number of milk allergen peptides. Therefore, according to the teachings of any of documents D1, D2 or D4 these patients should tolerate milk but, in contrast, they are in practice unable to tolerate milk even though they do not recognized a large number of milk allergen peptides. Consequently, the fact that all patients suffering from a persistent form of the allergy would always recognized a large number of milk allergen peptides cannot be taken as a general rule.

Now, based on this new findings, the question is thus whether even if knowing that persistent forms of the allergy do not necessarily correlate with the recognition of a large number of milk allergen peptides, implies the non-obviousness of the fact that a patient suffering from a persistent form of the allergy and that recognizes a large number of epitopes would always need more time to tolerate milk and will suffer a greater number of adverse reactions during oral immunotherapy than those patients also suffering from a persistent form of the allergy but that recognized a fewer number of epitopes, if any.

In our understanding, none of documents D1, D2, D3 or D4 suggest or indicates the fact that patients unable to tolerate milk could recognized a small number of milk allergen peptides, if any, in fact the contrary is taught in those documents. Moreover, none of these documents discloses that such patients would suffer a smaller number of adverse reactions during oral immunotherapy than those patients also suffering from a persistent form of the allergy but that recognized a larger number of epitopes. Furthermore, it is also clear than none of the cited documents suggest or implies the use of the specific subset of peptides (SEQ ID NO 18-75) disclose in the present invention, to prognosticate the time needed to tolerate milk and the number of adverse reactions during oral immunotherapy in those patients diagnosed with a persistent form of the allergy no matter the number of milk allergen peptides recognized by these subjects at the start of the therapeutic intervention.

Consequently, in our understanding, the present invention is thus the first to point out **the fact that** the specific subset of peptides (SEQ ID NO 18-75) disclose in the present invention, is useful to prognosticate the time needed to tolerate milk and the number of adverse reactions during oral immunotherapy in those patients diagnosed with a persistent form of the allergy, no matter the number of milk allergen peptides recognized by these subjects at the start of the therapeutic intervention.

Therefore, we respectfully request the Examiner to reconsider the objection of lack of inventive step raised in the Written Opinion of the International Searching Authority.

#### **4. Conclusions**

It is assumed that the new set of claims is admissible under the regulations of the PCT and the Examiner is kindly asked to issue a brief communication confirming this understanding. If anything remains which can be resolved over the phone the Examiner is kindly invited to call the applicant's representative.

Gustavo Fúster  
European Patent Attorney

**Enclosures:**

New amended claims (clean and tracked version)  
Translation of the application as filed.  
Sequence listing

**CLEAN COPY AMENDED SET OF CLAIMS**

1. A method for prognosis of oral immunotherapy (OIT) against proteins in cow's milk in a human subject unable to tolerate cow's milk, comprising determining the presence or absence of IgE antibodies in an isolated biological sample from the subject taken before starting OIT treatment (time 0), such as blood, serum, plasma, cerebrospinal fluid, peritoneal fluid, feces or urine, capable of recognizing peptides identified with any of the following sequences:

- a. At least one sequence selected from the group consisting of sequences SEQ ID NO: 18-32 and/or derivatives of sequences SEQ ID NO: 18-32 that are immunologically active; and/or
- b. At least one sequence selected from the group consisting of sequences SEQ ID NO: 33-45 and/or derivatives of sequences SEQ ID NO: 33-45 that are immunologically active; and/or
- c. At least one sequence selected from the group consisting of sequences SEQ ID NO: 46-63 and/or derivatives of sequences SEQ ID NO: 46-63 that are immunologically active; and/or
- d. At least one sequence selected from the group consisting of sequences SEQ ID NO: 64-69 and/or derivatives of sequences SEQ ID NO: 64-69 that are immunologically active; and/or
- e. At least one sequence selected from the group consisting of sequences SEQ ID NO: 70-75 and/or derivatives of sequences SEQ ID NO: 70-75 that are immunologically active;

wherein the prognosis of oral immunotherapy (OIT) against proteins in cow's milk is established by correlating the number of peptide sequences recognized by IgE antibodies in the sample from the subject before starting OIT treatment (time 0) with reference values established based on those same peptide sequences which correlate the number of peptides recognized by IgE antibodies in the samples from the patients with the response after OIT treatment.

2. The method according to claim 1, where the determination of the presence or absence of IgE antibodies in the biological sample is performed by determining the presence or absence of IgE antibodies capable of recognizing peptides identified with any of the following sequences:

- a. At least one sequence selected from the group consisting of sequences SEQ ID NO: 18-32 and/or derivatives of sequences SEQ ID NO: 18-32 that are immunologically

- active; and
- b. At least one sequence selected from the group consisting of sequences SEQ ID NO: 33-45 and/or derivatives of sequences SEQ ID NO: 33-45 that are immunologically active; and
  - c. At least one sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 46-63 and/or derivatives of sequences SEQ ID NO: 46-63 that are immunologically active; and optionally
  - d. At least one sequence selected from the group consisting of sequences SEQ ID NO: 64-69 and/or derivatives of sequences SEQ ID NO: 64-69 that are immunologically active; and optionally
  - e. At least one sequence selected from the group consisting of sequences SEQ ID NO: 70-75 and/or derivatives of sequences SEQ ID NO: 70-75 that are immunologically active,

3. The method according to claim 1, where said method is a method for prognosis of the number of reactions during oral immunotherapy (OIT) and the determination of the presence or absence of IgE antibodies in the biological sample is performed by determining the presence or absence of IgE antibodies capable of recognizing peptides identified with any of the following sequences:

- a. sequences SEQ ID NO: 19, 21, 25 and 27 and/or derivatives of sequences SEQ ID NO: 19, 21, 25 and 27 that are immunologically active; and
  - b. sequences SEQ ID NO: 36, 37 and 38 and/or derivatives of sequences SEQ ID NO: 36, 37 and 38 that are immunologically active; and
  - c. sequences SEQ ID NO: 51, 53, 58, 59 and 62 and/or derivatives of sequences SEQ ID NO: 51, 53, 58, 59 and 62 that are immunologically active; and
  - d. sequence SEQ ID NO: 69 and/or a derivative of the sequence SEQ ID NO: 69 that is immunologically active; and
  - e. sequences SEQ ID NO: 71 and 72 and/or derivatives of sequences SEQ ID NO: 71 and 72 that are immunologically active,
4. The method according to claim 1, where the method is a method for prognosis of an estimate of the treatment time required to achieve tolerance or desensitization during OIT and the determination of the presence or absence of IgE antibodies in the biological sample, is performed by determining the presence or absence of IgE

antibodies capable of recognizing peptides identified with any of the following sequences:

- a. sequences SEQ ID NO: 28 and 31 and/or derivatives of sequences SEQ ID NO: 28 and 31 that are immunologically active; and
  - b. sequences SEQ ID NO: 36-40 and 44 and/or derivatives of sequences SEQ ID NO: 36-40 and 44 that are immunologically active; and
  - c. sequences SEQ ID NO: 53, 55 and 56 and/or derivatives of sequences SEQ ID NO: 53, 55 and 56 that are immunologically active; and
  - d. sequences SEQ ID NO: 67 and 68 and/or a derivative of the sequence SEQ ID NO: 67 and 68 that are immunologically active; and
  - e. sequences SEQ ID NO: 70, 72 and 75 and/or derivatives of sequences SEQ ID NO: 70, 72 and 75 that are immunologically active.
5. The method according to claim 1, where the determination of the presence or absence of IgE antibodies in the biological sample is performed by determining the presence or absence of IgE antibodies capable of recognizing peptides identified with the following sequences: SEQ ID NO: 18-75 and/or derivatives of sequences SEQ ID NO: 18-75 that are immunologically active, wherein:
- a peptide recognition of less than 15% of said sequences is indicative of a good prognosis, wherein good prognosis refers to a low probability of having adverse reactions during desensitization (<7 reactions) and requiring a short time to achieve tolerance to cow's milk (< 8 weeks) and not requiring pre-medication; a peptide recognition of between 15%-75% of said sequences is indicative of a moderate prognosis, wherein moderate prognosis refers to a high number of allergic reactions during desensitization (>7 reactions) or requiring a long time to achieve tolerance to cow's milk (>8 weeks) or requiring antihistamines as pre-medication; and
  - a peptide recognition of more than 75% of said sequences is indicative of a poor prognosis, wherein poor prognosis refers to a high number of allergic reactions during desensitization (>7 reactions) and requiring a long time to achieve tolerance to cow's milk (>8 weeks) and requiring antihistamines and corticoids as pre-medication..
6. The method according to any of the preceding claims, where peptide recognition is determined by means of an immunoassay.

7. The method according to any of claims 1 to 5, where peptide recognition is determined by means of peptide microarrays.
8. Use of a peptide microarray suitable for carrying out the method of any of claims 1-5 comprising the combinations of peptides as defined in any of claims 1-5, for prognosis of oral immunotherapy (OIT) against proteins in cow's milk in a human subject.
9. A kit suitable for carrying out the method of any of claims 1-5, comprising peptides as capture biomolecules, wherein said peptides are selected from the list consisting of any one of SEQ ID NO: 18-75 and/or derivatives of said sequences that are immunologically active.
10. A kit comprising:
  - a. Capture biomolecules capable of recognizing IgE selected from the list consisting of any one of SEQ ID NO: 18-75 or consisting of the specific subsets of peptides as defined in any of claims 3 or 4 and/or derivatives of any of these sequences that are immunologically active.; and
  - b. A second recognition molecule (detection biomolecule) capable of recognizing the target analyte or the capture biomolecule optionally bound to a tag molecule.
11. A kit comprising:
  - a. Capture biomolecules capable of recognizing IgE selected from the list consisting of any one of SEQ ID NO: 18-75 or consisting of the specific subsets of peptides as defined in any of claims 3 or 4 and/or derivatives of any of these sequences that are immunologically active;;
  - b. A support where the capture biomolecules of step a) are immobilized; and
  - c. A second recognition molecule (detection biomolecule) capable of recognizing the target analyte or the capture biomolecule optionally bound to a tag molecule.
12. Use of the kit according to any of claims 8-11 for prognosis of the number of reactions during oral immunotherapy (OIT) against proteins in cow's milk and/or an estimate of

the treatment time required to achieve tolerance or desensitization during OIT and/or  
the need to apply pre-medication during OIT.

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veuillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

# TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

Remitente: LA ADMINISTRACIÓN ENCARGADA  
DE LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Destinatario:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás -  
UNICENTRO  
PASEO DE LA HABANA, n° 9-11  
28036 MADRID  
- ESPAÑA -**

## PCT

**OPINIÓN ESCRITA DE LA ADMINISTRACIÓN  
ENCARGADA DE LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

(Regla 43bis.1 del PCT)

|                                                                                                                                                                                               |  |                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|---------------------------------------------------------------------------------|
| Referencia del expediente del solicitante o del mandatario<br><b>900 452</b>                                                                                                                  |  | Fecha de expedición<br>(día/mes/año)<br><b>09 OCTUBRE 2014<br/>(09.10.2014)</b> |
| Solicitud internacional N°<br><b>PCT/ES2014/070634</b>                                                                                                                                        |  | Fecha de prioridad (día/mes/año)<br><b>01 AGOSTO 2013<br/>(01.08.2013)</b>      |
| Fecha de presentación internacional<br>(día/mes/año)<br><b>01 AGOSTO 2014 (01.08.2014)</b>                                                                                                    |  |                                                                                 |
| Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o a la vez clasificación nacional e CIP<br><b>G01N33/68 (2006.01)</b>                                                                           |  |                                                                                 |
| Solicitante<br><b>FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL<br/>UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL y FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN<br/>BIOMÉDICA DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS.</b> |  |                                                                                 |

1. La presente opinión contiene indicaciones relativas a los puntos siguientes:

- |                                     |               |                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Recuadro I    | Base de la opinión                                                                                                                                                       |
| <input type="checkbox"/>            | Recuadro II   | Prioridad                                                                                                                                                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Recuadro III  | No formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial                                                                            |
| <input type="checkbox"/>            | Recuadro IV   | Falta de unidad de invención                                                                                                                                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Recuadro V    | Declaración motivada según la Regla 43bis.1.a)i) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración |
| <input type="checkbox"/>            | Recuadro VI   | Ciertos documentos citados                                                                                                                                               |
| <input type="checkbox"/>            | Recuadro VII  | Defectos en la solicitud internacional                                                                                                                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Recuadro VIII | Observaciones relativas a la solicitud internacional                                                                                                                     |

### 2. CONTINUACIÓN DE LA TRAMITACIÓN

Si se hace una petición de examen preliminar internacional, esta opinión se considerará como una opinión escrita de la Administración encargada del examen preliminar internacional ("IPEA") salvo en aquellos casos en los que el solicitante elija una Administración distinta a ésta y, la IPEA elegida haya notificado a la Oficina Internacional según lo previsto en la Regla 66.1 bis(b) que las opiniones escritas de esta Administración encargada de la búsqueda internacional no serán consideradas como tales.

Si esta opinión es, como se indica más arriba, considerada como una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a que presente ante la IPEA una respuesta por escrito junto con modificaciones, en su caso, antes de la expiración del plazo de 3 meses a contar desde la fecha de envío del formulario PCT/ISA/220 o antes de la expiración del plazo de 22 meses a contar desde la fecha de prioridad, aplicándose el plazo que expire más tarde.

Para otras opciones, consultar el formulario PCT/ISA/220.

Nombre y dirección postal de la Administración  
encargada de la búsqueda internacional  
**OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)**  
Nº de fax: **91 349 53 04**

Fecha en que se ha concluido  
efectivamente esta opinión  
**1 octubre 2014 (01.10.2014)**

Funcionario autorizado  
**M. García Coca**  
Nº de teléfono: **91 349 34 11**

**Recuadro I. Base de la opinión**

1. Por lo que respecta al **idioma** esta opinión se ha establecido sobre la base de:

- ☒ la solicitud internacional en el idioma en el cual se depositó
- ☐ una traducción de la solicitud original al , que es el idioma de una traducción proporcionada a los fines de la búsqueda internacional (según las Reglas 12.3.a) y 23.1.b)).

2. Esta opinión se ha establecido teniendo en cuenta la **rectificación de un error evidente** autorizado por o notificado a esta Administración según la Regla 91 (Regla 43bis.1 a)).

3. En lo que se refiere a **las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido sobre la base de una lista de secuencias presentada o entregada:

a. Medios

- ☐ en papel
- ☒ en formato electrónico

b. Cuando

- ☐ en la solicitud internacional tal y como se presentó
- ☐ presentado junto con la solicitud internacional en formato electrónico
- ☐ presentado posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda

4. ☐ Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias y/o tabla relacionada con ella, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.

5. Comentarios adicionales:

**A la hora de realizar la búsqueda internacional la Administración encargada de la Búsqueda Internacional (ISA/ES) estaba en posesión del listado de secuencias en un formato aceptado por ésta y tal listado se ha utilizado para la realización de la búsqueda internacional.**

**Recuadro III. No formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial**

No se ha examinado la cuestión de saber si el objeto de la invención reivindicada parece ser nuevo, si implica una actividad inventiva (no ser evidente), o si es susceptible de aplicación industrial, por lo que respecta:

☐ al conjunto de la solicitud internacional,

☒ a las reivindicaciones **Nos. 1-11**

debido a que:

☒ la solicitud internacional o las reivindicaciones **Nos. 1-11** en cuestión se refieren al objeto siguiente, respecto del cual la Administración no está obligada a efectuar una búsqueda internacional (*precisar*):

**Las reivindicaciones 1-11 se refieren a una materia que esta Administración considera que está afectada por las disposiciones de la Regla 67.1 (iv) PCT, sobre métodos de tratamiento quirúrgico del cuerpo humano o animal. Consecuentemente, no se formulará ninguna opinión con respecto a la aplicación industrial de la materia de dichas reivindicaciones (Art. 34(4)(a)(i) PCT).**

☐ la descripción, las reivindicaciones o los dibujos (*indíquense cuáles a continuación*) o las reivindicaciones Nos. en cuestión, no son claros, de manera que no es posible formular una opinión significativa (*precisar*):

☒ las reivindicaciones, o las reivindicaciones **Nos. 1-3** en cuestión, no están fundadas adecuadamente en la descripción, por lo que es imposible formular una opinión significativa (*precisar*):

**Ver Recuadro suplementario.**

☒ no se ha emitido informe de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones **Nos. 1-3**

☐ no fué posible formular una opinión significativa sin la lista de secuencias; el solicitante no aportó en el plazo previsto:

☐ una lista de secuencias en papel de acuerdo a la norma prevista en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas y dicha lista no estuvo a disposición de la Administración encargada del examen preliminar internacional en forma y manera aceptable para ella.

☐ una lista de secuencias en formato electrónico de acuerdo con la norma prevista en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicha lista no estuvo a disposición de la Administración encargada del examen preliminar internacional en forma y manera aceptable para ella

☐ la tasa por presentación tardía de una lista de secuencias en respuesta a un requerimiento según las Reglas 13ter.1.a) o b)

☒ Ver Recuadro Suplementario para más detalles.

**Recuadro V. Declaración motivada según la Regla 43bis.1.a)i) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

1. Declaración

|                       |                        |    |
|-----------------------|------------------------|----|
| Novedad               | Reivindicaciones 4-11  | Sí |
|                       | Reivindicaciones 12-17 | NO |
| Actividad inventiva   | Reivindicaciones       | Sí |
|                       | Reivindicaciones 4-17  | NO |
| Aplicación industrial | Reivindicaciones 12-17 | Sí |
|                       | Reivindicaciones       | NO |

2. Citas y explicaciones

| Doc. | Número Publicación o Identificación                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Fecha Pub. |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| D01  | WANG J et al. "Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy" Journal of Allergy and Clinical Immunology, 20100301 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/03/2010 VOL: 125 No: 3 Pags: 695 - 702.e6 ISSN 0091-6749 Doi: doi:10.1016/j.jaci.2009.12.017. | 01/03/2010 |
| D02  | CERECEDO INMACULADA "Aplicación de la tecnología microarray al manejo diagnóstico de la alergia a proteínas de la leche de vaca" Tesis Doctoral (mayo 2009)                                                                                                                                                                         | 01/05/2009 |
| D03  | CERECEDO I et al. "Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay" Journal of Allergy and Clinical Immunology, 20080901 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/09/2008 VOL: 122 No: 3 Pags: 589 - 594 ISSN 0091-6749 Doi: doi:10.1016/j.jaci.2008.06.040.                        | 01/09/2008 |
| D04  | WO 2011032097 A1 (SINAI SCHOOL MEDICINE et al.)                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 17/03/2011 |

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 4-17, es un método para el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de premedicación durante la ITO en un sujeto humano, basado en la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE en una muestra biológica, contra o con especificidad frente a determinados péptidos de las 5 proteínas responsables de la alergia a las proteínas de la leche de vaca (reiv. 4-11). Es también objeto de la invención, un microarray, una composición, un kit y el uso de dicho kit para la realización del método (reiv. 12-17).

**1. NOVEDAD (Art. 33 (2) PCT)**

Las secuencias SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO: 75 están divulgadas en el documento D02 (Anexo 7).

Las características de las reivindicaciones 12-17 ya son conocidas del documento D02, donde han sido divulgadas, por lo tanto, el objeto de la invención tal y como se recoge en dichas reivindicaciones, no es nuevo a la vista del estado de la técnica conocido en el sentido del art. 33(2) PCT y carece de actividad inventiva en el sentido del art. 33(3) PCT.

Continúa en página siguiente...

Continuación Recuadro V. Declaración motivada según la Regla 43bis.1.a)i) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración.

## 2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 33 (3) PCT).

El documento D01 divulga que los pacientes cuyas IgE reconocen un mayor número de epítomos de las proteínas responsables de la alergia a la leche de vaca, sufren un mayor número de reacciones alérgicas y más severas, que aquellos cuyas IgE reconocen un número menor de epítomos. Esto hace posible la utilización de los patrones de reconocimiento de las IgE como marcadores para diferenciar pacientes con una alergia persistente y pacientes que con una inmunoterapia oral serán tolerantes a la leche de vaca, es decir, los patrones de reconocimiento de las IgE pueden utilizarse como biomarcadores para predecir el desarrollo de la tolerancia a la leche durante la inmunoterapia oral.

El documento D02 divulga un estudio en el que se busca la identificación de aquellos pacientes que van a presentar una provocación positiva, en una población de pacientes alérgicos a proteínas de leche de vaca que presentan unos niveles de IgE específica que indican la realización de una provocación oral. En este estudio se identifican patrones de reconocimiento de las IgE mediante microarrays asociados a reactividad clínica.

El documento D03 divulga un estudio en el que se determina, mediante microarrays, la especificidad y la diversidad de la unión de los anticuerpos IgE e IgG4 a epítomos secuenciales de las proteínas  $\alpha$ 1caseína,  $\alpha$ 2caseína,  $\beta$ -caseína,  $\kappa$ -caseína y  $\beta$ -lactoglobulina. Analizando el distinto patrón de reconocimiento de las IgE de los epítomos identificados, se puede diferenciar entre pacientes más reactivos y pacientes más tolerantes a estas proteínas. Los pacientes cuyas IgE reconocen un mayor número de estos epítomos secuenciales son más reactivos a dichas proteínas y su alergia es más persistente.

El documento D04 divulga métodos para evaluar la alergia a la leche mediante la correlación de IgE/IgG4 con los epítomos de la leche y la afinidad de los anticuerpos IgE específicos de dichos epítomos con los diferentes fenotipos clínicos que presentan los pacientes con alergia a la leche.

En concreto, este documento divulga métodos para diagnosticar si un paciente que padece alergia a las proteínas de la leche de vaca alcanzará la tolerancia a las mismas, basados en la caracterización de anticuerpos IgE específicos de alérgenos de la leche (mediante el análisis del número o diversidad de epítomos reconocidos y de la afinidad de su unión a ellos).

El documento D01 se ha considerado como el documento más cercano del estado de la técnica.

En este documento se divulga que los patrones de reconocimiento de las IgE pueden utilizarse como biomarcadores para predecir el desarrollo de la tolerancia a la leche durante la inmunoterapia oral.

Continúa en página siguiente...

Continuación Recuadro V. Declaración motivada según la Regla 43bis.1.a)i) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración.

Los documentos D02 a D04, divulgan la correlación entre los distintos patrones de reconocimiento de las IgE y las distintas situaciones clínicas que presentan los pacientes que padecen alergia a la leche. De esta forma, pacientes cuyas IgE reconocen un mayor número de epítomos son más reactivos a dichas proteínas y su alergia es más persistente, mientras que los pacientes cuyas IgE reconocen un menor número de epítomos son más tolerantes a estas proteínas. De esto se deduce que observando los patrones de reconocimiento de las IgE, no sólo se puede diferenciar entre pacientes con una alergia más o menos persistente, sino que además se puede predecir que pacientes van a alcanzar la tolerancia a las proteínas de la leche y como se va a desarrollar dicha tolerancia. Así, pacientes con una alergia más persistente (las IgE reconocen un mayor número de estos epítomos) tardarán más en alcanzar la tolerancia y van a sufrir un mayor número de reacciones durante la inmunoterapia oral.

Por otra parte, las secuencias reivindicadas como epítomos de valor pronóstico tanto del número de reacciones durante la ITO, como del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia a la leche de vaca, comparten regiones comunes con otros epítomos ya conocidos del estado de la técnica, cuya relación con la alergia a las proteínas de la leche de vaca está ampliamente descrita, y que además, se sabe que son útiles como marcadores para predecir el desarrollo de la tolerancia a la leche de vaca durante la inmunoterapia oral (ver documentos D01-D04).

Por lo tanto, a la vista de los documentos del estado de la técnica, y en ausencia de un efecto técnico inesperado asociado a los epítomos reivindicados, se considera que el objeto de la invención es una mera alternativa a lo ya existente en el estado de la técnica, y que no implica actividad inventiva.

En consecuencia, el objeto de la invención según se recoge en las reivindicaciones 4-17, aunque es nueva según el sentido del art. 33 (2) PCT, se considera que carece de actividad inventiva según lo establecido en el art. 33 (3) PCT.

### **3. APLICACIÓN INDUSTRIAL (Art. 33(4) PCT).**

Finalmente, se considera que las reivindicaciones 12-17 cumplen con el requisito de aplicación industrial tal como se define en el Art. 33(4) del PCT.

Respecto a la aplicación industrial de las reivindicaciones 1-11, para la valoración de si estas reivindicaciones tienen aplicación industrial, no existe un criterio unificado en los Estados Contratantes del PCT. La patentabilidad puede depender también de la redacción de las reivindicaciones.

**Recuadro VIII. Observaciones relativas a la solicitud internacional**

**Se formulan las observaciones siguientes sobre la claridad de las reivindicaciones, de la descripción y de los dibujos o sobre si las reivindicaciones se fundan totalmente en la descripción:**

Las reivindicaciones 1-3 no están adecuadamente fundadas en la descripción, tal y como se requiere en el art.6 PCT (ver Recuadro suplementario).

Para la realización del presente Informe de Búsqueda Internacional, se ha realizado la búsqueda de las reivindicaciones 4-11 y parcialmente de las reivindicaciones 12-17.

Recuadro suplementario

En caso de que el espacio en los recuadros precedentes no sea suficiente.

## CONTINUACIÓN DE RECUADRO III:

### Reivindicaciones 1-11 (método de tratamiento quirúrgico):

La primera etapa del método reivindicado es “aislar una muestra biológica del sujeto”. Esta etapa implica una interacción invasiva con el cuerpo humano, por lo que esta oficina considera que el método reivindicado es un método quirúrgico ya que comprende una etapa que implica una intervención física sobre el cuerpo humano o animal que constituye por sí misma un método quirúrgico.

Habrán casos en que dicha etapa pueda eliminarse u omitirse siempre que dicha etapa no forme parte esencial del método reivindicado. Por ejemplo, cuando la etapa que constituye un método quirúrgico sea una etapa previa al método de la invención. Este puede ser el caso de que sea necesaria una etapa de extracción de muestras del paciente pero dicha etapa no forma parte del propio método de diagnóstico, que se realiza sobre la muestra.

### Reivindicaciones 1-3 (reivindicaciones no basadas en la descripción):

En la descripción (página 18 línea 23 - página 19 línea 4) se indica que a partir del ensayo hecho por los autores de la invención, “*se encontraron 58 epítomos/péptidos de las cinco proteínas responsables de la APLV que son informativos para el pronóstico de la respuesta a la ITO frente a leche de vaca (tabla 1 y figuras 3 a 7). Además, la evolución temporal en el reconocimiento por IgE (y opcionalmente IgG4) de estos 58 epítomos/péptidos permite determinar el tiempo de duración de la ITO (aumento de reconocimiento IgG4 y disminución de IgE), y señalar el estado inmunológico del paciente de tolerancia/desensibilización (tolera el alimento requiriendo exposición al alérgeno a diario y sin interrupción) o tolerancia permanente (tolera el alimento y la suspensión del mismo durante un periodo de tiempo no cambia el estado de tolerancia), y por tanto la eficacia global de la ITO con leche de vaca. Mediante el análisis bioinformático, de entre los 58 epítomos/péptidos descritos anteriormente, se localizó un subgrupo de 27 epítomos/péptidos que presentan un elevado valor pronóstico del número de reacciones durante la ITO (tabla 3 y figura 9) y del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia (tabla 4 y figura 10)”*.”

Además, en la página 20 líneas 11-21, se indica que “*analizando el patrón de reconocimiento IgE de las secuencias inmunologicamente activas de los 58 epítomos/péptidos mostrados en la tabla 1, así como de subconjuntos de dichas secuencias como lo son los 16 péptidos mostrados en la tabla 3 o los 16 péptidos mostrados en la tabla 4, se han establecido una serie de valores de referencia (ver figuras 8-10) que permiten, en función del número de péptidos reconocidos por IgE en una muestra aislada de un paciente antes de empezar el tratamiento ITO, estimar el número de reacciones adversas y el tiempo requerido para alcanzar la desensibilización así como la necesidad o no de pre-medicación. Además, nos permite clasificar a los pacientes en función del número de péptidos reconocidos por IgE antes de empezar la ITO como de bajo riesgo, riesgo moderado o riesgo alto”*.”

De lo indicado en la descripción se deduce que el método se basa en determinar la eficacia de la ITO con leche de vaca, mediante el análisis del patrón de reconocimiento IgE de TODOS los 58 epítomos/péptidos, o al menos de 27 de los mismos, agrupados en 2 grupos de 16 epítomos/péptidos.

**TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES**  
**PCT**

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

(Artículo 18 y Reglas 43 y 44 del PCT)

|                                                                                                                                                                                           |                                                                                               |                                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Referencia del expediente del solicitante o del mandatario<br><b>900 452</b>                                                                                                              | <b>PARA CONTINUAR<br/>LA TRAMITACIÓN</b>                                                      | ver Formulario PCT/ISA/220 y, en su caso, el punto 5 de esta hoja.                            |
| Solicitud internacional N°<br><br>PCT/ES2014/070634                                                                                                                                       | Fecha de presentación internacional ( <i>día/mes/año</i> )<br><br>01 AGOSTO 2014 (01.08.2014) | Fecha de prioridad (la más antigua) ( <i>día/mes/año</i> )<br><br>01 AGOSTO 2013 (01.08.2013) |
| Solicitante<br><b>FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL y<br/>FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS.</b> |                                                                                               |                                                                                               |

El presente informe de búsqueda internacional, elaborado por esta Administración encargada de la búsqueda internacional, se transmite al solicitante, conforme al Artículo 18. Se remite una copia del mismo a la Oficina Internacional.

Este informe de búsqueda internacional comprende un total de 7 hojas.

☒ Se adjunta una copia de cada uno de los documentos del estado de la técnica citados en el informe.

**1. Base del informe**

a. En lo que se refiere al **idioma**, la búsqueda internacional se ha realizado sobre la base de :

☒ la solicitud en el idioma en el que se presentó

☐ una traducción de la solicitud al \_\_\_\_\_, que es el idioma de la traducción proporcionada a los fines de la búsqueda internacional (Reglas 12.3.a) y 23.1.b))

b. ☐ Este informe de búsqueda internacional se ha realizado teniendo en cuenta la rectificación de un error evidente autorizado por o notificado a esta Administración según la Regla 91 (Regla 43.6bis.a)).

c. ☒ En lo que se refiere a **las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional, véase Recuadro I.

2. ☒ **Se estima que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda** (ver Recuadro II).

3. ☐ **Falta unidad de invención** (ver Recuadro III).

4. Con respecto al **título**,

☒ el texto se aprueba según fue remitido por el solicitante.

☐ el texto ha sido establecido por esta Administración con la siguiente redacción:

5. Con respecto al **resumen**,

☒ el texto se aprueba según fue remitido por el solicitante.

☐ el texto (reproducido en el Recuadro IV) ha sido establecido por esta Administración de conformidad con la Regla 38.2.

El solicitante puede presentar observaciones a esta Administración en el plazo de un mes a contar desde la fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional.

6. Con respecto a los **dibujos**,

a. la figura de los **dibujos** a publicar junto con el resumen es la Figura N°   

☐ propuesta por el solicitante.

☐ propuesta por esta Administración, por no haber propuesto el solicitante ninguna figura.

☐ propuesta por esta Administración, por caracterizar mejor, esta figura, la invención.

b. ☒ no debe publicarse ninguna figura.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2014/070634

## Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)

1 En lo que se refiere a **las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias presentada o entregada:

a. Medios

☐

en papel

☒

en formato electrónico

b. Cuando

☐

en la solicitud internacional tal y como se presentó

☐

junto con la solicitud internacional en formato electrónico

☐

posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda

2. ☐ Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.

3. Comentarios adicionales:

**A la hora de realizar la búsqueda internacional la Administración encargada de la Búsqueda Internacional (ISA/ES) estaba en posesión del listado de secuencias en un formato aceptado por ésta y tal listado se ha utilizado para la realización de la búsqueda internacional.**

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2014/070634

## Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones n°s: **1-11**  
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

**Las reivindicaciones N° 1-11 se refieren a una materia que esta Administración considera que están afectadas por las disposiciones de la Regla 67. 1 (iv) PCT, relativas a métodos de tratamiento quirúrgico o terapéutico del cuerpo humano o animal, así como medios de diagnóstico. A pesar de ello, se ha efectuado una búsqueda para las reivindicaciones 4-11 basada en el uso de los péptidos reivindicados (ver Recuadro suplementario 1).**

2. ☒ Las reivindicaciones n°s: **1-3**  
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

**Las reivindicaciones 1-3 no están adecuadamente fundadas en la descripción (Ver Recuadro suplementario 2).**

3. ☐ Las reivindicaciones n°s:  
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

## Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

### Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ES2014/070634

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD **G01N33/68** (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)  
**G01N**

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)  
**EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, EMBASE/ELSEVIER, MEDLINE/NLM, XPESP, EMBL-EBI y bases de datos de texto completo TXT**

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                                                                                                                               | Relevante para las reivindicaciones nº |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| X          | WANG J et al. "Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy" Journal of Allergy and Clinical Immunology, 20100301 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/03/2010 VOL: 125 No: 3 Pags: 695 - 702.e6 ISSN 0091-6749 Doi: doi:10.1016/j.jaci.2009.12.017; todo el documento. | 4-17                                   |
| X          | CERECEDO INMACULADA "Aplicación de la tecnología microarray al manejo diagnóstico de la alergia a proteínas de la leche de vaca" Tesis Doctoral (mayo 2009) [recuperado el 23-09-2014]; Recuperado de Internet: URL<"http://dspace.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/6422/Versi%c3%b3n%20final%20200905024.pdf?sequence=1"> todo el documento.      | 4-17                                   |

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

|                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Categorías especiales de documentos citados:                                                                                                                                               | "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.     |
| "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.                                                                                      | "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.                                                                                    |
| "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.                                                                   | "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. |
| "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). | "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.                                                                                                                                                                                                                 |
| "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                |

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
**01/10/2014**

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**09 de octubre de 2014 (09/10/2014)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
**OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS**  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
**M. García Coca**  
  
Nº de teléfono 91 3493411

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070634

| C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                        |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Categoría *                                          | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                                                                                                                              | Relevante para las reivindicaciones nº |
| X                                                    | CERECEDO I et al. "Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay" Journal of Allergy and Clinical Immunology, 20080901 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/09/2008 VOL: 122 No: 3 Pags: 589 - 594 ISSN 0091-6749 Doi: doi:10.1016/j.jaci.2008.06.040; todo el documento.                       | 4-17                                   |
| X                                                    | WO 2011032097 A1 (SINAI SCHOOL MEDICINE ET AL.) 17/03/2011, todo el documento.                                                                                                                                                                                                                                                                        | 4-17                                   |
| A                                                    | SAVILAHTI E M et al. "Early recovery from cow's milk allergy is associated with decreasing IgE and increasing IgG4 binding to cow's milk epitopes" Journal of Allergy and Clinical Immunology, 20100601 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/06/2010 VOL: 125 No: 6 Pags: 1315 - 1321.e9 ISSN 0091-6749 Doi: doi:10.1016/j.jaci.2010.03.025; todo el documento. | 4-17                                   |
| A                                                    | MATSUMOTO N et al. "Peptide array-based analysis of the specific IgE and IgG4 in cow's milk allergens and its use in allergy evaluation" Peptides, 20091001 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/10/2009 VOL: 30 No: 10 Pags: 1840 - 1847 ISSN 0196-9781 Doi: doi:10.1016/j.peptides.2009.07.005 Nachman Ronald J; todo el documento.                           | 4-17                                   |

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070634

| Documento de patente citado<br>en el informe de búsqueda | Fecha de<br>Publicación | Miembro(s) de la<br>familia de patentes | Fecha de<br>Publicación |
|----------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|
| WO2011032097 A1                                          | 17.03.2011              | US2011071043 A1                         | 24.03.2011              |
|                                                          |                         | US8802375 B2                            | 12.08.2014              |
|                                                          |                         | EP2478373 A1                            | 25.07.2012              |
| -----                                                    | -----                   | -----                                   | -----                   |

## Continuación del Recuadro II punto 1.

La primera etapa del método reivindicado es “aislar una muestra biológica del sujeto”. Esta etapa implica una interacción invasiva con el cuerpo humano, por lo que esta oficina considera que el método reivindicado es un método quirúrgico ya que comprende una etapa que implica una intervención física sobre el cuerpo humano o animal que constituye por sí misma un método quirúrgico.

Habrán casos en que dicha etapa pueda eliminarse u omitirse siempre que dicha etapa no forme parte esencial del método reivindicado. Por ejemplo, cuando la etapa que constituye un método quirúrgico sea una etapa previa al método de la invención. Este puede ser el caso de que sea necesaria una etapa de extracción de muestras del paciente pero dicha etapa no forma parte del propio método de diagnóstico, que se realiza sobre la muestra.

## Continuación del Recuadro II punto 2.

En la descripción (página 18 línea 23 - página 19 línea 4) se indica que a partir del ensayo hecho por los autores de la invención, “***se encontraron 58 epítomos/péptidos de las cinco proteínas responsables de la APLV que son informativos para el pronóstico de la respuesta a la ITO frente a leche de vaca (tabla 1 y figuras 3 a 7). Además, la evolución temporal en el reconocimiento por IgE (y opcionalmente IgG4) de estos 58 epítomos/péptidos permite determinar el tiempo de duración de la ITO (aumento de reconocimiento IgG4 y disminución de IgE), y señalar el estado inmunológico del paciente de tolerancia/desensibilización (tolera el alimento requiriendo exposición al alérgeno a diario y sin interrupción) o tolerancia permanente (tolera el alimento y la suspensión del mismo durante un periodo de tiempo no cambia el estado de tolerancia), y por tanto la eficacia global de la ITO con leche de vaca. Mediante el análisis bioinformático, de entre los 58 epítomos/péptidos descritos anteriormente, se localizó un subgrupo de 27 epítomos/péptidos que presentan un elevado valor pronóstico del número de reacciones durante la ITO (tabla 3 y figura 9) y del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia (tabla 4 y figura 10).***”.

Además, en la página 20 líneas 11-21, se indica que “***analizando el patrón de reconocimiento IgE de las secuencias inmunológicamente activas de los 58 epítomos/péptidos mostrados en la tabla 1, así como de subconjuntos de dichas secuencias como lo son los 16 péptidos mostrados en la tabla 3 o los 16 péptidos mostrados en la tabla 4, se han establecido una serie de valores de referencia (ver figuras 8-10) que permiten, en función del número de péptidos reconocidos por IgE en una muestra aislada de un paciente antes de empezar el tratamiento ITO, estimar el número de reacciones adversas y el tiempo requerido para alcanzar la desensibilización así como la necesidad o no de pre-medicación. Además, nos permite clasificar a los pacientes en función del número de péptidos reconocidos por IgE antes de empezar la ITO como de bajo riesgo, riesgo moderado o riesgo alto.***”.

De lo indicado en la descripción se deduce que el método se basa en determinar la eficacia de la ITO con leche de vaca, mediante el análisis del patrón de reconocimiento IgE de TODOS los 58 epítomos/péptidos, o al menos de 27 de los mismos, agrupados en 2 grupos de 16 epítomos/péptidos.

Para la realización del presente Informe de Búsqueda Internacional, se ha realizado la búsqueda de las reivindicaciones 4-11 y parcialmente de las reivindicaciones 12-17.

## **LISTA DE INVENTORES**

**PCT/ES2014/070634**

**M<sup>a</sup> Belén DE LA HOZ CABALLER**

Ctra.de Colmenar Viejo,  
Km. 9,100 E-28034 Madrid  
España

**Javier MARTÍNEZ BOTAS**

Ctra. de Colmenar Viejo,  
Km. 9,100 E-28034 Madrid  
España

**Inmaculada CERECEDO CARBALLO**

Ctra. de Colmenar Viejo,  
Km. 9,100 E-28034 Madrid  
España

**Montserrat FERNÁNDEZ RIVAS**

C/ Prof. Martín Lagos,  
s/n E-28040 Madrid  
España

**Mónica RODRÍGUEZ ÁLVAREZ**

C/ Prof. Martín Lagos,  
s/n E-28040 Madrid  
España

(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  
5 de febrero de 2015 (05.02.2015)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2015/015043 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
G01N 33/68 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2014/070634

(22) Fecha de presentación internacional:  
1 de agosto de 2014 (01.08.2014)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P201331200 1 de agosto de 2013 (01.08.2013) ES

(71) Solicitantes: FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL [ES/ES]; Ctra. de Colmenar Viejo Km. 9,100, E-28034 Madrid (ES). FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS [ES/ES]; C/ Profesor Martín Lagos, s/n, E-28040 Madrid (ES).

(72) Inventores: DE LA HOZ CABALLER, M<sup>a</sup> Belén; Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Ramón y Cajal, Ctra. de Colmenar Viejo, Km. 9,100, E-28034 Madrid (ES). MARTÍNEZ BOTAS, Javier; Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Ramón y Cajal, Ctra. de Colmenar Viejo, Km. 9,100, E-28034 Madrid (ES). CERECEDO CARBALLO, Inmaculada; Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Ramón y Cajal, Ctra. de Colmenar Viejo, Km. 9,100, E-28034 Madrid (ES). FERNÁNDEZ RIVAS, Montserrat; Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Clínico San Carlos, C/ Prof. Martín Lagos, s/n, E-28040

Madrid (ES). RODRÍGUEZ ÁLVAREZ, Mónica; Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Clínico San Carlos, C/ Prof. Martín Lagos, s/n, E-28040 Madrid (ES).

(74) Mandatario: FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo; Unicentro, P<sup>o</sup> de la Habana, 9-11, E-28036 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR PROGNOSIS OF THE EFFICACY OF ORAL IMMUNOTHERAPY FOR THE TREATMENT OF ALLERGY TO PROTEINS IN COW'S MILK

(54) Título : MÉTODO PARA EL PRONÓSTICO DE LA EFICACIA DE LA INMUNOTERAPIA ORAL PARA EL TRATAMIENTO DE LA ALERGIA A LAS PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA

(57) Abstract: The present invention provides a solution to the problems stated in the prior art, since it provides a method that makes it possible to form a prognosis concerning the number of reactions that will be produced during oral immunotherapy (OIT) against proteins in cow's milk and/or an estimate of the treatment time required to achieve tolerance or desensitization during OIT to proteins in cow's milk and/or the need for pre-medication during OIT in a human subject.

(57) Resumen: La presente invención proporciona la solución a los problemas planteados en el estado de la técnica ya que proporciona un método que permite pronosticar el número de reacciones que se producirán durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de pre-medicación durante la ITO en un sujeto humano.



WO 2015/015043 A1

## **MÉTODO PARA EL PRONÓSTICO DE LA EFICACIA DE LA INMUNOTERAPIA ORAL PARA EL TRATAMIENTO DE LA ALERGIA A LAS PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA**

### **Campo de la invención**

- 5 La presente invención se encuadra en el campo general de la alergología y en particular se refiere a un método para el pronóstico de la eficacia del tratamiento de desensibilización a la leche de vaca.

### **Estado de la técnica**

- 10 La alergia por Hipersensibilidad inmediata frente a alimentos no tiene en la actualidad un tratamiento establecido eficaz, la única alternativa para los pacientes es la evitación del mismo hasta alcanzar la tolerancia espontánea al mismo, situación que se alcanza en un alto número de pacientes pero no en todos.

- Se habla de alergia a las proteínas de leche de vaca (APLV) cuando un individuo, tras la ingesta de lácteos manifiesta una respuesta anormal (con síntomas que se pueden englobar dentro de las reacciones adversas a alimentos) y en ese proceso hay un mecanismo inmunológico comprobado.

- Las proteínas responsables de la alergenicidad de la leche de vaca son las caseínas (alfa- caseína, beta-caseína y kappa- caseína) y las seroproteínas beta lactoglobulina, alfa lactoalbumina, seroalbumina bovina e inmunoglobulinas bovinas así como otras proteínas en menor proporción: lactoferrina, transferrina, lipasa que son las proteínas del suero y representan un 2% del total de la leche de vaca entera.

Las caseínas son las principales responsables de la alergia a la leche de vaca.

- Actualmente se tiene evidencia que en la alergia a los alimentos existen diferentes fenotipos clínicos de gravedad de las reacciones. Si bien varios factores se han implicado en estas diferencias, el componente geográfico tiene un papel muy importante. Un claro ejemplo es la alergia a frutas, donde los individuos alérgicos a un alimento debido a que reconocen diferentes alérgenos (proteína completa/péptido) tienen diferente gravedad clínica. Así, los individuos alérgicos a melocotón del norte de Europa tienen solo síntomas leves tras su ingestión, mientras los pacientes del sur de

Europa presentan reacciones sistémicas graves. Por lo tanto es de máximo interés conocer el patrón de reconocimiento de los alérgenos de un determinado alimento, tanto de las proteínas completas como idealmente de los epítomos de las mismas, que presenta una población determinada.

- 5 Actualmente existen diferentes métodos para diagnosticar la alergia a la leche de vaca, pero lo normal es que una vez ocurrida la primera crisis alérgica, se haga una detección de IgE específica a las distintas proteínas de la leche de vaca.

La Inmunoterapia Oral (ITO) con alimentos es un procedimiento terapéutico novedoso cuyo objetivo es conseguir en los pacientes alérgicos a un determinado alimento la  
10 tolerancia al mismo mediante la administración continuada a partir de dosis mínimas del mismo hasta alcanzar la tolerancia de una cantidad habitual del alimento.

La leche de vaca es un alimento ubicuo de muy difícil evitación y que produce reacciones graves. En los últimos diez años diversos grupos de investigación han desarrollado protocolos para la administración oral de la leche de vaca para conseguir  
15 alcanzar la tolerancia a la misma. En el estado del conocimiento actual el tratamiento alcanza buenos niveles de eficacia en cuanto que logra inducir tolerancia a la leche de vaca. No obstante, presenta su mayor problema en cuanto a la seguridad del tratamiento ya que los pacientes presentan un elevado número de reacciones alérgicas durante la realización del procedimiento. Si bien en la mayoría de las ocasiones dichas  
20 reacciones alérgicas son leves y fácilmente tratables, en algunas pocas ocasiones son graves e incluso requieren la administración de adrenalina. Por lo tanto, las reacciones durante el procedimiento son una de las mayores dificultades a la hora de incorporar el procedimiento en la práctica habitual de la enfermedad, y por lo tanto extender a un número importante de pacientes su utilización.

- 25 Existe pues la necesidad de proporcionar un método que pronostique la eficacia del tratamiento de desensibilización a la leche de vaca y por tanto la respuesta del paciente al mismo.

### **Breve descripción de la invención**

La presente invención proporciona la solución a los problemas planteados en el estado de la técnica ya que proporciona un método que permite pronosticar el número de reacciones que se producirán durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de pre-medicación durante la ITO en un sujeto humano.

Por lo tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método para el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de pre-medicación durante la ITO en un sujeto humano, que comprende los siguientes pasos:

- a. Aislar una muestra biológica del sujeto;
- b. Determinar la presencia o ausencia de anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) contra o con especificidad frente a los péptidos identificados con las siguientes secuencias:

- a. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-4 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 18-32 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-32 inmunológicamente activas; y/o

- b. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 5-8 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 33-45 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 33-45 inmunológicamente activas; y/o

- c. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 9-13 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO:

46-63 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 46-63 inmunológicamente activas; y/o

d. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 14-15 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 64-69 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 64-69 inmunológicamente activas; y/o

e. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 16-17 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 70-75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 70-75 inmunológicamente activas;

donde el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de pre-medicación durante la ITO se establece correlacionando el número de secuencias peptídicas reconocidas por anticuerpos IgE de las muestras de los sujetos antes de empezar el tratamiento de ITO (tiempo 0), con unos valores de referencia establecidos en base a esas mismas secuencias peptídicas que correlacionan el número de péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de las muestras de los pacientes con la respuesta posterior al tratamiento de ITO.

Una realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un método para el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de pre-medicación durante la ITO en un sujeto humano, que comprende los siguientes pasos:

a. Aislar una muestra biológica del sujeto;

b. Determinar la presencia o ausencia de anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) contra o con especificidad frente a los péptidos identificados con las siguientes secuencias:

a. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-4 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 18-32 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-32 inmunológicamente activas; y

b. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 5-8 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 33-45 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 33-45 inmunológicamente activas; y

c. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 9-13 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 46-63 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 46-63 inmunológicamente activas; y opcionalmente

d. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 14-15 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 64-69 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 64-69 inmunológicamente activas; y opcionalmente

e. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 16-17 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 70-75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 70-75 inmunológicamente activas;

donde el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las

proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de pre-medicación durante la ITO se establece correlacionando el número de secuencias peptídicas reconocidas por anticuerpos IgE de las muestras de los sujetos antes de empezar el tratamiento de ITO (tiempo 0), con unos valores de referencia establecidos en base a esas mismas secuencias peptídicas que correlacionan el número de péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de las muestras de los pacientes con la respuesta posterior al tratamiento de ITO.

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un método para el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de pre-medicación durante la ITO en un sujeto humano, que comprende los siguientes pasos:

a. Aislar una muestra biológica del sujeto;

b. Determinar la presencia o ausencia de anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) contra o con especificidad frente a los péptidos identificados con las siguientes secuencias:

a. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-4 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 18-32 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-32 inmunológicamente activas; y

b. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 5-8 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 33-45 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 33-45 inmunológicamente activas; y

c. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 9-13 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO:

46-63 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 46-63 inmunológicamente activas; y

d. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 14-15 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 64-69 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 64-69 inmunológicamente activas; y

e. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 16-17 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 70-75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 70-75 inmunológicamente activas;

donde el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de pre-medicación durante la ITO se establece correlacionando el número de secuencias peptídicas reconocidas por anticuerpos IgE de las muestras de los sujetos antes de empezar el tratamiento de ITO (tiempo 0), con unos valores de referencia establecidos en base a esas mismas secuencias peptídicas que correlacionan el número de péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de las muestras de los pacientes con la respuesta posterior al tratamiento de ITO.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el método es un método de pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) y la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE del paso b) en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias:

a. las secuencias SEQ ID NO: 19, 21, 25 y 27 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 19, 21, 25 y 27 inmunológicamente activas; y

- b. las secuencias SEQ ID NO: 36, 37 y 38 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 36, 37 y 38 inmunológicamente activas; y
- c. las secuencias SEQ ID NO: 51, 53, 58, 59 y 62 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 51, 53, 58, 59 y 62 inmunológicamente activas; y
- d. la secuencia SEQ ID NO: 69 y/o un derivado de la secuencia SEQ ID NO: 69 inmunológicamente activa; y
- e. las secuencias SEQ ID NO: 71 y 72 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 71 y 72 inmunológicamente activas;

donde el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca se establece correlacionando el número de secuencias peptídicas reconocidas por anticuerpos IgE de las muestras de los sujetos antes de empezar el tratamiento de ITO (tiempo 0), con unos valores de referencia establecidos en base a esas mismas secuencias peptídicas que correlacionan el número de péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de las muestras de los pacientes con la respuesta posterior al tratamiento de ITO. Preferiblemente, los valores de referencia se establecen en la figura 9.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el método es un método de pronóstico de la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO y la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE del paso b) en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias:

- a. las secuencias SEQ ID NO: 28 y 31 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 28 y 31 inmunológicamente activas; y
- b. las secuencias SEQ ID NO: 36-40 y 44 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 36-40 y 44 inmunológicamente activas; y
- c. las secuencias SEQ ID NO: 53, 55 y 56 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 53, 55 y 56 inmunológicamente activas; y

- d. las secuencias SEQ ID NO: 67 y 68 y/o un derivado de la secuencia SEQ ID NO: 67 y 68 inmunológicamente activas; y
- e. las secuencias SEQ ID NO: 70, 72 y 75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 70, 72 y 75 inmunológicamente activas;

5           donde la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca se establece correlacionando el número de secuencias peptídicas reconocidas por anticuerpos IgE de las muestras de los sujetos antes de empezar el tratamiento de ITO (tiempo 0), con unos valores de referencia establecidos en base a esas mismas  
10   secuencias peptídicas que correlacionan el número de péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de las muestras de los pacientes con la respuesta posterior al tratamiento de ITO. Preferiblemente, los valores de referencia se establecen en la figura 10.

En aún otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la determinación  
15   de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 18-75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-75 inmunológicamente activas, donde el pronóstico del número de reacciones durante la  
20   inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca se establece correlacionando el número de secuencias peptídicas reconocidas por anticuerpos IgE de las muestras de los sujetos antes de empezar el tratamiento de ITO (tiempo 0), con unos valores de referencia establecidos en base a esas mismas secuencias peptídicas que correlacionan el número de péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de las  
25   muestras de los pacientes con la respuesta posterior al tratamiento de ITO. Preferiblemente, los valores de referencia se establecen en la figura 8.

En aún otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con  
30   especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes

secuencias: SEQ ID NO: 18-75 y/o preferiblemente derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-75 inmunológicamente activas, donde:

- un reconocimiento menor del 15% de los péptidos es indicativo de buen pronóstico,
- 5       – un reconocimiento de entre 15% - 75% de los péptidos es indicativo de pronóstico moderado
- un reconocimiento superior al 75% de péptidos es indicativo de mal pronóstico.

10       En una realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, la muestra biológica incluye diferentes tipos de muestras de tejidos, así como de fluidos biológicos, tales como sangre, suero, plasma, fluido cerebroespinal, fluido peritoneal, heces u orina. Preferiblemente, la muestra se selecciona entre sangre, plasma, suero u orina.

15       En una realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, la presencia de los péptidos se determina mediante inmunoensayo.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, la presencia de los péptidos se determina mediante microarrays de péptidos.

20       Un segundo aspecto de la invención se refiere a un microarray peptídico adecuado para llevar a cabo el método del primer aspecto de la invención o cualquiera de sus realizaciones preferidas, que comprende las combinaciones de secuencias peptídicas definidas en dicho método o en dichas realizaciones.

25       Un tercer aspecto se refiere a una composición adecuada para llevar a cabo el método del primer aspecto de la invención o cualquiera de sus realizaciones preferidas, que comprende las combinaciones de péptidos definidas en dicho método o en dichas realizaciones.

Un cuarto aspecto se refiere a un kit adecuado para llevar a cabo el método del primer aspecto de la invención o cualquiera de sus realizaciones preferidas, que comprende las combinaciones de péptidos definidas en dicho método o en dichas realizaciones.

En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención dicho kit comprende:

- 5           a. Unas moléculas de reconocimiento (biomoléculas de captura), capaces de reconocer IgE, seleccionadas de la lista que consiste en las distintas combinaciones de secuencias peptídicas definidas en el método del primer aspecto de la invención o en cualquiera de sus realizaciones preferidas; y
- 10           b. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana o la biomolécula de captura opcionalmente unida a una molécula etiqueta.

En otra realización preferida del cuarto aspecto de la invención dicho kit comprende:

- 15           a. Unas moléculas de reconocimiento (biomoléculas de captura), capaces de reconocer IgE, seleccionadas de la lista que consiste en las distintas combinaciones de péptidos definidas en el método del primer aspecto de la invención o en cualquiera de sus realizaciones preferidas; y
- b. Un soporte donde inmovilizar las biomoléculas de reconocimiento de la etapa a); y
- 20           c. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana o la biomolécula de captura opcionalmente unida a una molécula etiqueta.

Un quinto aspecto de la invención se refiere al uso del kit del cuarto aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, o la composición del tercer aspecto de la invención o el microarray peptídico del segundo aspecto de la invención, 25 para pronosticar el número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO y/o la necesidad de administrar pre-medicación durante la ITO.

En un sexto aspecto de la invención, la presente invención se refiere a un método para el pronóstico y seguimiento del tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca con inmunoterapia oral con leche de vaca que comprende determinar la presencia de anticuerpos IgE o IgG4 contra los péptidos identificados con las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-17 y/o fragmentos de los mismos en una muestra aislada de un sujeto.

En una realización particular del sexto aspecto de la invención, un reconocimiento menor del 15% de los péptidos (aquellos reconocidos por los anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) es indicativo de buen pronóstico.

10 En una realización particular del sexto aspecto de la invención, un reconocimiento comprendido entre un 15% - 75% de péptidos (aquellos reconocidos por los anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) es indicativo de pronóstico moderado.

15 En una realización particular del sexto aspecto de la invención, un reconocimiento superior al 75% de péptidos (aquellos reconocidos por los anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) es indicativo de mal pronóstico.

En una realización en particular del sexto aspecto de la invención, los fragmentos de los péptidos (aquellos reconocidos por los anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) se identifican con las secuencias SEQ ID NO: 18-75

20 En una realización en particular del sexto aspecto de la invención, la muestra a analizar es seleccionada entre sangre, suero u orina.

En una realización en particular del sexto aspecto de la invención, la presencia de los péptidos y/o fragmentos de los mismos se determina mediante inmunoensayo.

25 En una realización en particular del sexto aspecto de la invención, la presencia de los péptidos y/o fragmentos de los mismos se determina mediante microarrays de péptidos.

Un séptimo aspecto de la invención se refiere a un microarray para el pronóstico y seguimiento del tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca con inmunoterapia oral con leche de vaca según el método del sexto aspecto de la presente

invención que comprende los péptidos de las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-17 y/o fragmentos de los mismos.

Un octavo aspecto de la invención se refiere a un kit para el pronóstico y seguimiento del tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca con inmunoterapia oral con leche de vaca según el método del sexto aspecto de la presente invención, que comprende los péptidos de las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-17 y/o fragmentos de los mismos.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del kit del octavo aspecto de la invención para el pronóstico y seguimiento del tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca con inmunoterapia oral con leche de vaca.

### **Breve descripción de las figuras**

En la figura 1 se representa la evolución temporal del número de péptidos reconocidos por los pacientes por IgE (0, tiempo antes de empezar el tratamiento de ITO; D, tiempo en el que se alcanza la tolerancia/desensibilización; 6, 12 y 24 meses de seguimientos tras la desensibilización). Los pacientes de alto riesgo reconocen un mayor número de péptidos por IgE ya antes de empezar el tratamiento de ITO, lo cual permite distinguir los pacientes de alto riesgo de los de moderado y bajo riesgo. El número de péptidos IgE que reconocen los distintos grupos de pacientes disminuye con tiempo de seguimiento lo cual es informativo sobre la duración mínima que tiene que tener la ITO con leche de vaca.

a: IgE-alfa-S1-caseína; b: IgE-alfa-S2-caseína, c: IgE-b-caseína, d: IgE-b-lactoglobulina, e: IgE-k- caseína.

En la figura 2 se representa la evolución temporal del número de péptidos reconocidos por los pacientes por IgG4 (0, tiempo antes de empezar el tratamiento de ITO; D, tiempo en el que se alcanza la tolerancia/desensibilización; 6, 12 y 24 meses de seguimientos tras la desensibilización). El número de péptidos que reconocen los distintos grupos de pacientes aumenta durante tiempo de seguimiento lo cual es indicativo del mantenimiento de la tolerancia y por tanto la eficacia del tratamiento con ITO con leche de vaca.

a: IgG4- alfa-S1-caseína; b: IgG4-alfa-S2-caseína, c: IgG4-b-caseína, d: IgG4-b-lactoglobulina, e: IgG4-k- caseína.

Las figuras 3 a 7, muestran el análisis de agrupamiento jerárquico (Análisis de cluster), el análisis estadístico de las distintas regiones reconocidas por los diferentes grupos de pacientes (Análisis estadístico –Gr 1 pacientes de bajo riesgo, Gr 2 pacientes de riesgo moderado y Gr 3 pacientes de riesgo alto-) y la selección de péptidos importantes (key peptide biomarker) (flechas) para la clasificación de los pacientes. Mediante el análisis de clúster hemos visto que el patrón de reconocimiento inmunológico por anticuerpos IgE antes de empezar el tratamiento (tiempo 0) de los pacientes con alto riesgo es muy parecido y se agrupan en la zona derecha de la gráfica (p5, p9, p11, p19 y p25). Mediante el análisis estadístico hemos localizado aquellas zonas o epítomos con diferencia significativas en el patrón de reconocimiento de los pacientes de alto riesgo respecto a los de bajo riesgo y riesgo moderado. Mediante el análisis bioinformático de machine learning hemos localizado los mejores péptidos para la estimación de la evolución del tratamiento de ITO. Con todo ello hemos seleccionado 58 péptidos (ver secuencias en figura 8) de las proteínas alfa-s1-caseína, alfa-s2-caseína, beta-caseína, kapa-caseína y beta-lactoglobulina que son importantes para la estimación de la evolución del tratamiento de ITO,

Figura 3: alfa-S1-caseína (IgE) sin ponderar,

Figura 4: alfa-S2-caseína (IgE) sin ponderar,

Figura 5: b-caseína (IgE) sin ponderar,

Figura 6: k- caseína (IgE) sin ponderar,

Figura 7: b-lactoglobulina (IgE) sin ponderar.

La figura 8 muestra la correlación lineal entre el número de péptidos reconocidos de los 58 péptidos mostrados en la tabla I y el número de reacciones alérgicas durante el tratamiento de ITO ( $r^2$  0,803) y el tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización ( $r^2$  0,601) de los diferentes pacientes.

La figura 9 muestra la correlación entre el número de péptidos reconocidos de esa lista por IgE antes de empezar el tratamiento de ITO y el número de reacciones alérgicas durante el tratamiento de los diferentes pacientes

La figura 10 muestra la correlación entre el número de péptidos reconocidos de la (tabla 3) lista por IgE antes de empezar el tratamiento de ITO y el tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización de los diferentes pacientes.

### **Descripción detallada de la invención**

#### **Definiciones**

En el contexto de la presente invención por “buen pronóstico” se refiere a la baja probabilidad de tener reacciones adversas durante la desensibilización (<7 reacciones) y requerir poco tiempo en alcanzar la tolerancia a la leche de vaca (< 8 semanas) y no requerir pre-medicación (ni antihistamínicos, ni corticoides).

En el contexto de la presente invención por “pronóstico moderado” se refiere a un número alto de reacciones alérgicas durante la desensibilización (>7 reacciones) o requerir mucho tiempo en alcanzar la tolerancia a la leche de vaca (> 8 semanas) o requerir antihistamínicos como pre-medicación.

En el contexto de la presente invención por “mal pronóstico” se refiere a un número alto de reacciones alérgicas durante la desensibilización (>7 reacciones) y requerir mucho tiempo en alcanzar la tolerancia a la leche de vaca (> 8 semanas) y requerir antihistamínicos y corticoides como pre-medicación.

En el contexto de la presente invención, tolerancia/desensibilización se define como la ingesta de 200 ml de leche de vaca sin tener reacciones adversas.

En el contexto de la presente invención, pre-medicación se refiere a la administración de antihistamínicos y/o corticoides antes de cada una de las fases de la ITO.

En el contexto de la presente invención, “anticuerpos IgE contra o con especificidad frente a” se refiere a anticuerpos IgE que reconocen cualquiera de las secuencias de los 58 epitopos/péptidos mostrados en la tabla 1, preferiblemente con un umbral de intensidad igual o superior a 3 (z-score>3) leídos en un escáner de fluorescencia

ScanArray Express (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) con un laser de 543nm para detectar las señal del IgE-Alexa 546.

En el contexto de la presente invención, por derivados de las secuencias de la invención inmunológicamente activas se entienden aquellos fragmentos de cualquiera  
5 de las SEQ ID No 19-75 que puedan constituir epítopos o determinantes antigénicos a los que se unen inmunoglobulinas tipo E (IgE), preferiblemente con un umbral de intensidad igual o superior a 3 ( $z\text{-score} > 3$ ) leídos en un escáner de fluorescencia ScanArray Express (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) con un laser de 543nm para detectar las señal del IgE-Alexa 546, de los pacientes alérgicos a leche de vaca y que  
10 se puede determinar mediante un inmunoensayo.

En el contexto de la presente invención, por inmunoglobulinas tipo E (IgE) se entiende el isotipo de inmunoglobulinas tipo E, también conocidos como anticuerpos plasmáticos del tipo E. Por IgG4 se entiende el isotipo de inmunoglobulinas tipo G4, también conocidos como anticuerpos plasmáticos del tipo G4.

### 15 **Descripción detallada de la invención**

Mediante microarrays de péptidos se analizó el patrón de reconocimiento inmunológico (reconocimiento IgE e IgG4) a proteínas de la leche de vaca (alfa-s1-caseína, alfa-s2-caseína, beta-caseína, kapa-caseína y beta-lactoglobulina) en pacientes alérgicos a lo largo del tratamiento de ITO. Los tiempos analizados fueron:

- 20 – Antes del tratamiento (0)
- Una vez alcanzada la tolerancia mediante ITO (D)
- 6, 12 y 24 meses tras alcanzada la tolerancia (6, 12 y 24 respectivamente).

Se diseñó un protocolo de ITO para la administración de la leche de vaca en dos fases una fase de inicio consistente en cuatro días con dosis progresivas cada día y seis días  
25 más de administración de una única dosis dos veces por semana hasta alcanzar la dosis completa de 200 ml de leche de vaca. Esta pauta sufrió modificaciones en función de la tolerancia a la misma, aparición de patologías intercurrentes ajenas al estudio (fiebre, episodios catarrales, otros procesos infecciosos en particular digestivos,

etc.). Se registraron y cuantificaron todas las reacciones que surgieron durante la administración de la leche de vaca tanto en el hospital como fuera del ámbito sanitario.

Se seleccionaron pacientes con alergia persistente a proteínas de leche de vaca.

Los criterios de Inclusión para los pacientes fueron:

- 5 Niños mayores de 4 años, con el diagnóstico de APLV que no hubiesen alcanzado la tolerancia de forma espontánea.

Para confirmar la persistencia de APLV en el momento de inclusión de los pacientes en el estudio se llevaron a cabo pruebas cutáneas y determinación de IgE específica frente a la leche de vaca y fracciones (betalactoglobulina, alfa lactoalbumina y caseína)

- 10 y se realizó una provocación doble ciego controlada con placebo frente a leche de vaca.

Se requirió la positividad de las pruebas cutáneas y presencia de IgE específica frente a leche de vaca o cualquiera de sus fracciones y una provocación positiva con la exposición a la leche de vaca que reprodujera síntomas inmediatos de alergia.

- 15 Se consideraba una prueba cutánea positiva aquella de igual o superior tamaño que la producida por la histamina y se consideró positiva una determinación de IgE específica superior a 0,35 kU/L determinada por CAP (Thermo Fisher Scientific).

Se excluyeron a los niños diagnosticados de APLV que no cumplieran los criterios previos definidos y aquellos que presentaran intolerancia a la lactosa o reacciones no

- 20 mediadas por IgE.

Se incluyeron un total de 47 pacientes de ellos 12 fueron excluidos por presentar algún criterio de exclusión. Un total de 35 niños cumplieron los criterios de inclusión y a todos se les ofreció el tratamiento con ITO con leche de vaca. De los 35 un total de 24 aceptaron el tratamiento y los otros 7 niños rechazaron el tratamiento pero

- 25 mantenerse en el estudio como grupo control.

En cuanto a la eficacia del tratamiento se consideró eficacia alcanzar sin reacciones adversas la cantidad 200 ml de leche de vaca al día.

En cuanto a la seguridad de la pauta de ITO con leche de vaca, se consideraron el número de reacciones alérgicas presentadas por cada paciente durante el procedimiento, la necesidad de protección con medicación antialérgica (corticoide y antihistamínica) y la duración de la pauta.

- 5 Los 24 pacientes incluidos alcanzaron la dosis de 200 ml luego el procedimiento fue eficaz en todos los casos.

Se clasificaron a los pacientes según duración mayor o menor a 8 semanas (mediana de duración del procedimiento con todos los pacientes), número de reacciones mayor a 7 (mediana de reacciones del grupo) y la necesidad o no de medicación antialérgica  
10 (antihistamínicos y/o corticoides) para la administración de las dosis (Si, No) .

Según estos criterios los pacientes se clasificaron en tres grupos

- Bajo riesgo (menos de 8 semanas, menos de 7 reacciones y no necesidad de medicación). Este perfil lo presentaron 7 pacientes,
- Riesgo moderado (más de 8 semanas y/o más de 7 reacciones y/o pre-  
15 medicación con antihistaminicos). Este perfil lo presentaron 12 pacientes,
- Alto riesgo (más de 8 semanas y más de 7 reacciones y pre-medicación completa (antihistminicos y coroticoides). Este perfil lo presentaron 5 pacientes

Una vez efectuado el ensayo, los autores de la presente invención correlacionaron el número de péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de los sueros de los pacientes  
20 para las distintas proteínas antes de empezar el tratamiento de ITO (tiempo 0), con la respuesta posterior a dicho tratamiento. Los pacientes de bajo riesgo reconocieron pocos péptidos, los pacientes con mucho riesgo reconocieron muchos péptidos y los pacientes con riesgo moderado reconocieron un número intermedio de péptidos. A partir de este ensayo se encontraron 58 epitopos/péptidos de las cinco proteínas  
25 responsables de la APLV que son informativos para el pronóstico de la respuesta a la ITO frente a leche de vaca (tabla 1 y figuras 3 a 7). Además, la evolución temporal en el reconocimiento por IgE (y opcionalmente IgG4) de estos 58 epítapos/péptidos permite determinar el tiempo de duración de la ITO (aumento de reconocimiento IgG4 y disminución de IgE), y señalar el estado inmunológico del paciente de

tolerancia/desensibilización (tolera el alimento requiriendo exposición al alérgeno a diario y sin interrupción) o tolerancia permanente (tolera el alimento y la suspensión del mismo durante un periodo de tiempo no cambia el estado de tolerancia), y por tanto la eficacia global de la ITO con leche de vaca.

- 5 Mediante el análisis bioinformático, de entre los 58 epitopos/péptidos descritos anteriormente, se localizó un subgrupo de 27 epitopos/péptidos que presentan un elevado valor pronóstico del número de reacciones durante la ITO (tabla 3 y figura 9) y del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia (tabla 4 y figura 10).

En la tabla 3 se muestran valores de referencia en base a 16 péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de los sueros de 24 pacientes para la estimación del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO).

En la tabla 4 se muestran valores de referencia en base a 16 péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de los sueros de 24 pacientes para la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO.

- 15 Para establecer la correlación entre el número de secuencias peptídicas reconocidas por anticuerpos IgE de los sueros de los sujetos antes de empezar el tratamiento de ITO (tiempo 0), con los valores de referencia establecidos en base a esas mismas secuencias peptídicas que correlacionan el número de péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de los sueros de los pacientes con la respuesta posterior al tratamiento de ITO, podrán emplearse algoritmos o fórmulas matemáticas, como por ejemplo rectas de regresión como las incluidas en las tablas 3 y 4.

Así a modo de ejemplo, para la estimación del número de reacciones durante la ITO y el del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización se podría utilizar los valores de referencia obtenidos de los 24 pacientes analizados previamente. Así, para la estimación del número de reacciones se podría modelar la relación entre el número de péptidos de la tabla 2 reconocidos por cada uno de los 24 pacientes de referencia y el número de reacciones que han sufrido cada uno de ellos durante la ITO mediante un modelo de regresión lineal o ajuste lineal (figura 9), estableciendo de esta forma una ecuación que permite en nuevos pacientes estimar el

número de reacciones que sufrirá durante la ITO en base al número de péptidos reconocidos antes de empezar el tratamiento.

Por otro lado y para la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO se podría modelar la relación entre el número de péptidos de la tabla 3 reconocidos por cada uno de los 24 pacientes de referencia y el tiempo requerido por cada uno de ellos para alcanzar la tolerancia mediante un modelo de regresión lineal o ajuste lineal (figura 10) y de esta forma establecer una ecuación que permite en nuevos pacientes estimar el tiempo requerido para alcanzar la tolerancia durante la ITO en base al número de péptidos reconocidos antes de empezar el tratamiento.

Así, tal y como se puede ver en las figuras 8-10, analizando el patrón de reconocimiento IgE de las secuencias inmunológicamente activas de los 58 epitopos/péptidos mostrados en la tabla 1, así como de subconjuntos de dichas secuencias como lo son los 16 péptidos mostrados en la tabla 3 o los 16 péptidos mostrados en la tabla 4, se han establecido una serie de valores de referencia (ver figuras 8-10) que permiten, en función del número de péptidos reconocidos por IgE en una muestra aislada de un paciente antes de empezar el tratamiento ITO, estimar el número de reacciones adversas y el tiempo requerido para alcanzar la desensibilización así como la necesidad o no de pre-medicación. Además, nos permite clasificar a los pacientes en función del número de péptidos reconocidos por IgE antes de empezar la ITO como de bajo riesgo, riesgo moderado o riesgo alto.

| ID | Proteína        | Posición | Secuencia     |
|----|-----------------|----------|---------------|
| 1  | alfa-s1-caseína | 6        | SEQ ID NO: 18 |
| 2  | alfa-s1-caseína | 9        | SEQ ID NO: 19 |
| 3  | alfa-s1-caseína | 11       | SEQ ID NO: 20 |
| 4  | alfa-s1-caseína | 25       | SEQ ID NO: 21 |
| 5  | alfa-s1-caseína | 28       | SEQ ID NO: 22 |
| 6  | alfa-s1-caseína | 31       | SEQ ID NO: 23 |

|    |                 |    |               |
|----|-----------------|----|---------------|
| 7  | alfa-s1-caseina | 34 | SEQ ID NO: 24 |
| 8  | alfa-s1-caseina | 37 | SEQ ID NO: 25 |
| 9  | alfa-s1-caseina | 43 | SEQ ID NO: 26 |
| 10 | alfa-s1-caseina | 45 | SEQ ID NO: 27 |
| 11 | alfa-s1-caseina | 46 | SEQ ID NO: 28 |
| 12 | alfa-s1-caseina | 49 | SEQ ID NO: 29 |
| 13 | alfa-s1-caseina | 52 | SEQ ID NO: 30 |
| 14 | alfa-s1-caseina | 59 | SEQ ID NO: 31 |
| 15 | alfa-s1-caseina | 60 | SEQ ID NO: 32 |
| 16 | alfa-s2-caseina | 7  | SEQ ID NO: 33 |
| 17 | alfa-s2-caseina | 9  | SEQ ID NO: 34 |
| 18 | alfa-s2-caseina | 11 | SEQ ID NO: 35 |
| 19 | alfa-s2-caseina | 14 | SEQ ID NO: 36 |
| 20 | alfa-s2-caseina | 21 | SEQ ID NO: 37 |
| 21 | alfa-s2-caseina | 22 | SEQ ID NO: 38 |
| 22 | alfa-s2-caseina | 23 | SEQ ID NO: 39 |
| 23 | alfa-s2-caseina | 24 | SEQ ID NO: 40 |
| 24 | alfa-s2-caseina | 28 | SEQ ID NO: 41 |
| 25 | alfa-s2-caseina | 32 | SEQ ID NO: 42 |
| 26 | alfa-s2-caseina | 35 | SEQ ID NO: 43 |
| 27 | alfa-s2-caseina | 50 | SEQ ID NO: 44 |
| 28 | alfa-s2-caseina | 52 | SEQ ID NO: 45 |
| 29 | beta-caseina    | 1  | SEQ ID NO: 46 |
| 30 | beta-caseina    | 15 | SEQ ID NO: 47 |
| 31 | beta-caseina    | 25 | SEQ ID NO: 48 |
| 32 | beta-caseina    | 28 | SEQ ID NO: 49 |
| 33 | beta-caseina    | 32 | SEQ ID NO: 50 |
| 34 | beta-caseina    | 34 | SEQ ID NO: 51 |
| 35 | beta-caseina    | 36 | SEQ ID NO: 52 |

|    |                     |    |               |
|----|---------------------|----|---------------|
| 36 | beta-caseina        | 43 | SEQ ID NO: 53 |
| 37 | beta-caseina        | 45 | SEQ ID NO: 54 |
| 38 | beta-caseina        | 47 | SEQ ID NO: 55 |
| 39 | beta-caseina        | 48 | SEQ ID NO: 56 |
| 40 | beta-caseina        | 51 | SEQ ID NO: 57 |
| 41 | beta-caseina        | 53 | SEQ ID NO: 58 |
| 42 | beta-caseina        | 54 | SEQ ID NO: 59 |
| 43 | beta-caseina        | 56 | SEQ ID NO: 60 |
| 44 | beta-caseina        | 59 | SEQ ID NO: 61 |
| 45 | beta-caseina        | 61 | SEQ ID NO: 62 |
| 46 | beta-caseina        | 64 | SEQ ID NO: 63 |
| 47 | kapa-caseina        | 3  | SEQ ID NO: 64 |
| 48 | kapa-caseina        | 5  | SEQ ID NO: 65 |
| 49 | kapa-caseina        | 7  | SEQ ID NO: 66 |
| 50 | kapa-caseina        | 8  | SEQ ID NO: 67 |
| 51 | kapa-caseina        | 17 | SEQ ID NO: 68 |
| 52 | kapa-caseina        | 18 | SEQ ID NO: 69 |
| 53 | beta-lactoglobilina | 6  | SEQ ID NO: 70 |
| 54 | beta-lactoglobilina | 42 | SEQ ID NO: 71 |
| 55 | beta-lactoglobilina | 43 | SEQ ID NO: 72 |
| 56 | beta-lactoglobilina | 44 | SEQ ID NO: 73 |
| 57 | beta-lactoglobilina | 46 | SEQ ID NO: 74 |
| 58 | beta-lactoglobilina | 47 | SEQ ID NO: 75 |

**Tabla 1**

La tabla 1 muestra los 58 epitopos/péptidos de las cinco proteínas responsables de la APLV.

La tabla 2 muestra las 17 secuencias (ver figuras 3-7) que engloban los 58 epitopos/péptidos de las cinco proteínas responsables de la APLV.

| I<br>D | Secuencia                                                                               |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | LNENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTE                                                     |
| 2      | PNSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLRLKKYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIH                                 |
| 3      | IHAQQKEPMIGVNVQELAYFYPELFRQFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQ                                         |
| 4      | DAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMP                                                                 |
| 5      | TYKQEKNNMAINPSKENLCSTFCKEVVRNANEEEEYSIGSSSE                                             |
| 6      | SAEVATEEVKITVDDKHQKALNEINQFY                                                            |
| 7      | LNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVKRNAVPITPT                                               |
| 8      | TKKTKLTEEEKNRLNFLKKISQRYQK                                                              |
| 9      | RELEELNVPGEIVESLSSE                                                                     |
| 1<br>0 | DELQDKIHPFAQTQSLVYPF                                                                    |
| 1<br>1 | NIPPLTQTPVVPPFLQPEVMGVSKVKEA                                                            |
| 1<br>2 | GVSKVKEAMAPKHKEMPFKYPVEPFTESSQL                                                         |
| 1<br>3 | LTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQKAVPYP<br>QRDMPIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPIIV |
| 1<br>4 | QPIRCEKDERFFSDKIAKYIPIQYVLSRYPSYGLN                                                     |
| 1<br>5 | ALINNQFLPYPPYAKPAAVRSPA                                                                 |
| 1<br>6 | AGTWYSLAMAASDISLLDAQ                                                                    |
| 1      | RTPEVDDEALEKFDKALKALPMHIRLSFNPTQLEE                                                     |

**Tabla 2**

A continuación los siguientes ejemplos sirven meramente para ilustrar la invención pero en ningún caso para limitar la misma.

Ejemplo 1:

- 5 Utilizando un robot de impresión de microarrays SpotArray 72 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) se imprimieron microarrays sobre cristales NSB27 NHS funcionalizados con N-hidroxil succinimidil (NanoSurface Biosciences-POSTECH, Seoul, Korea) conteniendo los 27 péptidos con ID: 2 ( $\alpha$ -s1-casein p9), 4 ( $\alpha$ -s1-casein p25), 8 ( $\alpha$ -s1-casein p37), 10 ( $\alpha$ -s1-casein p45), 11 ( $\alpha$ -s1-casein p46), 14 ( $\alpha$ -s1-casein p59), 19 (alfa-s2-caseína p14), 20 (alfa-s2-caseína p21), 21 (alfa-s2-caseína p22), 22 (alfa-s2-caseína p23), 23 (alfa-s2-caseína p24), 27 (alfa-s2-caseína p50), 34 (beta-caseína p34), 36 (beta-caseína p43), 38 (beta-caseína p47), 39 (beta-caseína p48), 41 (beta-caseína p53), 42 (beta-caseína p54), 45 (beta-caseína p61), 50 (kapa-caseína p8), 51 (kapa-caseína p17), 52 (kapa-caseína p18), 53 (beta-lactoglobulina p6), 54 (beta-lactoglobulina p42), 55 (beta-lactoglobulina p43), 56 (beta-lactoglobulina p44) y 58 (beta-lactoglobulina p47); ver tabla 3 y 4 y figura 9 y 10. Para su impresión los péptidos se disuelven en una solución 1:1 de tampón fosfato salino (PBS) y tampón de impresión (PPB) (protein printing buffer, Arrayit Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Una vez impresos los microarrays se bloquearon las uniones inespecíficas durante 1 hora a
- 10 20 temperatura ambiente con una solución 1:1 de solución de bloqueo BlockIt™ (Arrayit Corporation, Sunnyvale, CA, USA) y PBS conteniendo Tween 20 al 0.1% y Albumina Sérica Bovina al 2% (PBS-T-BSA).

- Los sueros obtenidos de 3 pacientes se incubaron en la superficie de los microarrays durante 16h, a 4°C y en agitación continua. Se retiró la muestra de los microarrays y
- 25 se lavó dos veces con una solución de PBS-T-BSA. A continuación se incubaron con una solución de anticuerpos fluorescentes anti IgE human (G7-26, BD-PharMingen, San Diego, CA, USA) marcado con Alexa 546 y anti IgG4 humana (G14-4, BD-PharMingen, San Diego, CA, USA) marcado con Alexa 647, diluidos 1/1000 en PBS-T-

BSA. Se retiró la solución de anticuerpos y se lavó dos veces con una solución de PBS-T-BSA.

Para detectar la presencia en el suero de los pacientes de anticuerpos IgE e IgG4 frente a los distintos péptidos de las proteínas alergénicas de leche de vaca, los  
 5 microarrays fueron leídos en un escáner de fluorescencia ScanArray Express (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) con dos láseres (laser de 543nm para detectar la señal del IgE-Alexa 546 y laser de 633nm para detectar la señal de IgG4-Alexa 647). Los resultados se cuantificaron y normalizaron para transformar la señal de  
 fluorescencia en un parámetro numérico (unidades arbitrarias de fluorescencia o z-  
 10 score). Se calculó el número de péptidos con una señal de fluorescencia superior a 3 (z-score>3). El primer paciente reconoció 2 péptidos, el segundo paciente 8 péptidos y el tercer paciente 15 péptidos.

El paciente con un reconocimiento de 2 péptidos tiene un buen pronóstico (baja probabilidad de tener reacciones adversas durante la desensibilización - estimación 3  
 15 reacciones alérgicas, ver tabla 3 y figura 9- y de tardar poco tiempo en alcanzar la tolerancia a la leche de vaca – estimación 7 semanas, ver tabla 4 y figura 10-).

El pacientes con un reconocimiento de 8 péptidos tiene un pronóstico intermedio (riesgo moderado de tener reacciones adversas durante la desensibilización – estimación 10 reacciones alérgicas, ver tabla 3 y figura 9- y de tardar un tiempo  
 20 intermedio en alcanzar la tolerancia a la leche de vaca –estimación 11 semanas, ver tabla 4 y figura 10-).

Pacientes con un reconocimiento de 15 péptidos tiene un mal pronóstico (alta probabilidad de tener reacciones adversas durante la desensibilización – estimación 19 reacciones alérgicas, ver tabla 2 y figura 9- y de tardar mucho tiempo en alcanzar la  
 25 tolerancia a la leche de vaca – estimación 16 semanas. Adicionalmente, estos pacientes requerirán pre-medicación y serán tratamiento con antihistamínicos y corticoides antes de cada una de las fases de la ITO (ver tabla 4 y figura 10).

| ID | Proteína               | Sequencia    |
|----|------------------------|--------------|
| 2  | $\alpha$ -s1-casein p9 | SEQ ID NO:19 |

|    |                            |                  |
|----|----------------------------|------------------|
| 4  | $\alpha$ -s1-casein p25    | SEQ ID NO:<br>21 |
| 8  | $\alpha$ -s1-casein p37    | SEQ ID NO:<br>25 |
| 10 | $\alpha$ -s1-casein p45    | SEQ ID NO:<br>27 |
| 19 | alfa-s2-caseina p14        | SEQ ID NO:<br>36 |
| 20 | alfa-s2-caseina p21        | SEQ ID NO:<br>37 |
| 21 | alfa-s2-caseina p22        | SEQ ID NO:<br>38 |
| 34 | beta-caseina p34           | SEQ ID NO:<br>51 |
| 36 | beta-caseina p43           | SEQ ID NO:<br>53 |
| 41 | beta-caseina p53           | SEQ ID NO:<br>58 |
| 42 | beta-caseina p54           | SEQ ID NO:<br>59 |
| 45 | beta-caseina p61           | SEQ ID NO:<br>62 |
| 52 | kapa-caseina p18           | SEQ ID NO:<br>69 |
| 54 | beta-lactoglobilina<br>p42 | SEQ ID NO:<br>71 |
| 55 | beta-lactoglobilina<br>p43 | SEQ ID NO:<br>72 |
| 56 | beta-lactoglobilina<br>p44 | SEQ ID NO:<br>73 |

Tabla 3

Tabla 3: péptidos que mejor estiman el número de reacciones durante la ITO

Fórmula: Estimación de reacciones =  $1.1733 \text{ N}^\circ \text{ de péptidos} + 1.0362$

5 N° péptidos: 2, Estimación de reacciones: 3

N° péptidos: 8, Estimación de reacciones: 10

N° péptidos: 15, Estimación de reacciones: 19

| ID | Péptido                    | Secuencia     |
|----|----------------------------|---------------|
| 11 | $\alpha$ -s1-casein p46    | SEQ ID NO: 28 |
| 14 | $\alpha$ -s1-casein p59    | SEQ ID NO: 31 |
| 19 | alfa-s2-caseina p14        | SEQ ID NO: 36 |
| 20 | alfa-s2-caseina p21        | SEQ ID NO: 37 |
| 21 | alfa-s2-caseina p22        | SEQ ID NO: 38 |
| 22 | alfa-s2-caseina p23        | SEQ ID NO: 39 |
| 23 | alfa-s2-caseina p24        | SEQ ID NO: 40 |
| 27 | alfa-s2-caseina p50        | SEQ ID NO: 44 |
| 36 | beta-caseina p43           | SEQ ID NO: 53 |
| 38 | beta-caseina p47           | SEQ ID NO: 55 |
| 39 | beta-caseina p48           | SEQ ID NO: 56 |
| 50 | kapa-caseina p8            | SEQ ID NO: 67 |
| 51 | kapa-caseina p17           | SEQ ID NO: 68 |
| 53 | beta-lactoglobulina p6     | SEQ ID NO: 70 |
| 55 | beta-lactoglobulina<br>p43 | SEQ ID NO: 72 |
| 58 | beta-lactoglobulina<br>p47 | SEQ ID NO: 75 |

**Tabla 4**

Tabla 4: péptidos que mejor estiman el tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO.

Fórmula: Estimación de tiempo de tratamiento (semanas) =  $(0.7318 * \text{N}^\circ \text{ de péptidos}) + 5.1419$

- 5     $\text{N}^\circ$  péptidos: 2, Estimación de tiempo de tratamiento (semanas): 7
- $\text{N}^\circ$  péptidos: 8, Estimación de tiempo de tratamiento (semanas): 11
- $\text{N}^\circ$  péptidos: 15, Estimación de tiempo de tratamiento (semanas): 16

**REIVINDICACIONES**

1. Método para el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de pre-medicación durante la ITO en un sujeto humano, que comprende los siguientes pasos:
  - a. Aislar una muestra biológica del sujeto;
  - b. Determinar la presencia o ausencia de anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) contra o con especificidad frente a los péptidos identificados con las siguientes secuencias:
    - a. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-4 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 18-32 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-32 inmunológicamente activas; y/o
    - b. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 5-8 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 33-45 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 33-45 inmunológicamente activas; y/o
    - c. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 9-13 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 46-63 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 46-63 inmunológicamente activas; y/o
    - d. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 14-15 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ

ID NO: 64-69 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 64-69 inmunológicamente activas; y/o

- e. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 16-17 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 70-75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 70-75 inmunológicamente activas;

donde el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de vaca y/o la necesidad de pre-medicación durante la ITO se establece correlacionando el número de secuencias peptídicas reconocidas por anticuerpos IgE de las muestras de los sujetos antes de empezar el tratamiento de ITO (tiempo 0), con unos valores de referencia establecidos en base a esas mismas secuencias peptídicas que correlacionan el número de péptidos reconocidos por anticuerpos IgE de las muestras de los pacientes con la respuesta posterior al tratamiento de ITO.

2. Método según la reivindicación 1, donde la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE del paso b) en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias:

- a. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-4 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 18-32 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-32 inmunológicamente activas; y
- b. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 5-8 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO:

33-45 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 33-45 inmunológicamente activas; y

c. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 9-13 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 46-63 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 46-63 inmunológicamente activas; y opcionalmente

d. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 14-15 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 64-69 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 64-69 inmunológicamente activas; y opcionalmente

e. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 16-17 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 70-75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 70-75 inmunológicamente activas;

3. Método según la reivindicación 1, donde la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE del paso b) en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias:

a. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-4 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 18-32 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-32 inmunológicamente activas; y

b. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 5-8 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO:

33-45 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 33-45 inmunológicamente activas; y

c. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 9-13 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 46-63 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 46-63 inmunológicamente activas; y

d. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 14-15 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 64-69 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 64-69 inmunológicamente activas; y

e. Al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 16-17 y/o fragmentos de las mismas seleccionados de la lista que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 70-75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 70-75 inmunológicamente activas;

4. Método según la reivindicación 1, donde dicho método es un método de pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) y la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE del paso b) en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias:

a. las secuencias SEQ ID NO: 19, 21, 25 y 27 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 19, 21, 25 y 27 inmunológicamente activas; y

b. las secuencias SEQ ID NO: 36, 37 y 38 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 36, 37 y 38 inmunológicamente activas; y

c. las secuencias SEQ ID NO: 51, 53, 58, 59 y 62 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 51, 53, 58, 59 y 62 inmunológicamente activas; y

- d. la secuencia SEQ ID NO: 69 y/o un derivado de la secuencia SEQ ID NO: 69 inmunológicamente activa; y
- e. las secuencias SEQ ID NO: 71 y 72 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 71 y 72 inmunológicamente activas;

5 5. Método según la reivindicación 1, donde el método es un método de pronóstico de la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO y la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE del paso b) en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con  
10 especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias:

- a. las secuencias SEQ ID NO: 28 y 31 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 28 y 31 inmunológicamente activas; y
- 15 b. las secuencias SEQ ID NO: 36-40 y 44 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 36-40 y 44 inmunológicamente activas; y
- c. las secuencias SEQ ID NO: 53, 55 y 56 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 53, 55 y 56 inmunológicamente activas; y
- d. las secuencias SEQ ID NO: 67 y 68 y/o un derivado de la secuencia SEQ ID NO: 67 y 68 inmunológicamente activas; y
- 20 e. las secuencias SEQ ID NO: 70, 72 y 75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 70, 72 y 75 inmunológicamente activas.

6. Método según la reivindicación 1, donde la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con  
25 especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 18-75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-75 inmunológicamente activas.

7. Método según la reivindicación 1, donde la determinación de la presencia o  
30 ausencia de anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) se realiza

determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 18-75 y/o derivados de las secuencias SEQ ID NO: 18-75 inmunológicamente activas, donde:

- un reconocimiento menor del 15% de los péptidos es indicativo de buen pronóstico,
- un reconocimiento de entre 15% - 75% de los péptidos es indicativo de pronóstico moderado, y
- un reconocimiento superior al 75% de péptidos es indicativo de mal pronóstico.

8. Método según la reivindicación 1, donde la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos IgE en la muestra biológica del paso a) se realiza determinando la presencia o ausencia de anticuerpos IgE contra o con especificidad frente al menos los siguientes péptidos identificados con las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 18-75 y donde:

- un reconocimiento menor del 15% de los péptidos es indicativo de buen pronóstico,
- un reconocimiento de entre 15% - 75% de los péptidos es indicativo de pronóstico moderado, y
- un reconocimiento superior al 75% de péptidos es indicativo de mal pronóstico.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra biológica es seleccionada entre fluidos biológicos, tales como sangre, suero, plasma, fluido cerebroespinal, fluido peritoneal, heces u orina.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el reconocimiento de los péptidos se determina mediante inmunoensayo.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 donde el reconocimiento de los péptidos se determina mediante microarrays de péptidos.

12. Microarray peptídico adecuado para llevar a cabo el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 que comprende las combinaciones de péptidos definidas en cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
13. Composición adecuada para llevar a cabo el método de cualquiera de las  
5 reivindicaciones 1-8, que comprende las combinaciones de péptidos definidas en cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
14. Kit adecuado para llevar a cabo el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende las combinaciones de péptidos definidas en cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 10 15. Un kit que comprende:
- a. Unas moléculas de reconocimiento (biomoléculas de captura), capaces de reconocer IgE, seleccionadas de la lista que consiste en las distintas combinaciones de péptidos definidas en cualquiera de las reivindicaciones 1-8; y
  - 15 b. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana o la biomolécula de captura opcionalmente unida a una molécula etiqueta.
16. Un kit que comprende:
- a. Unas moléculas de reconocimiento (biomoléculas de captura), capaces  
20 de reconocer la IgE, seleccionadas de la lista que consiste en las distintas combinaciones de péptidos definidas en cualquiera de las reivindicaciones 1-8;
  - b. Un soporte donde inmovilizar las biomoléculas de reconocimiento de la etapa a); y
  - 25 c. Una segunda molécula de reconocimiento (biomolécula de detección), capaz de reconocer el analito diana o la biomolécula de captura opcionalmente unida a una molécula etiqueta.
17. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 14-16 para el pronóstico del número de reacciones durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas  
30 de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para

alcanzar la tolerancia o desensibilización durante la ITO y/o la necesidad de aplicar pre-medicación durante la ITO.

Figura 1

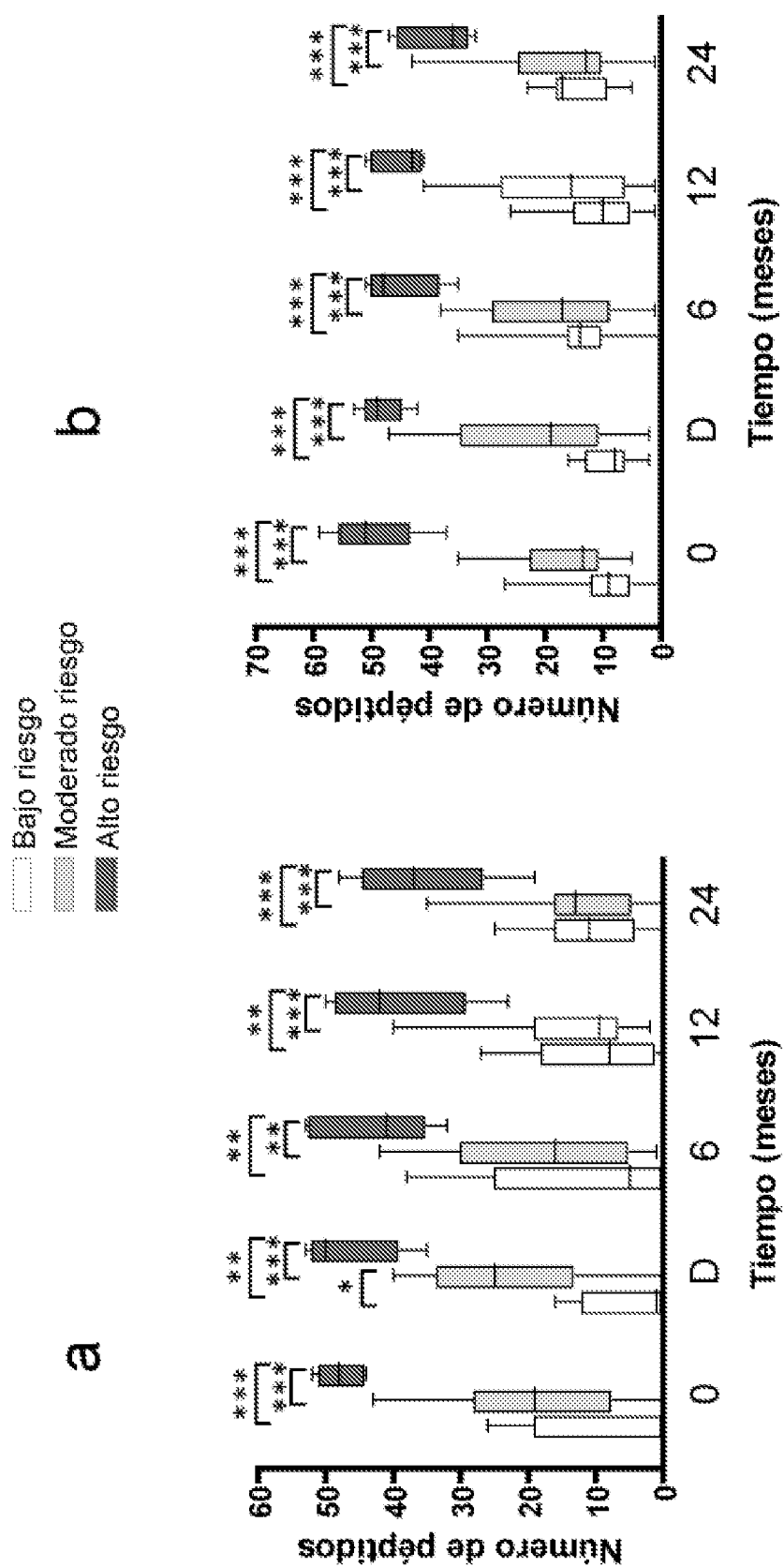


Figura 1 continuación

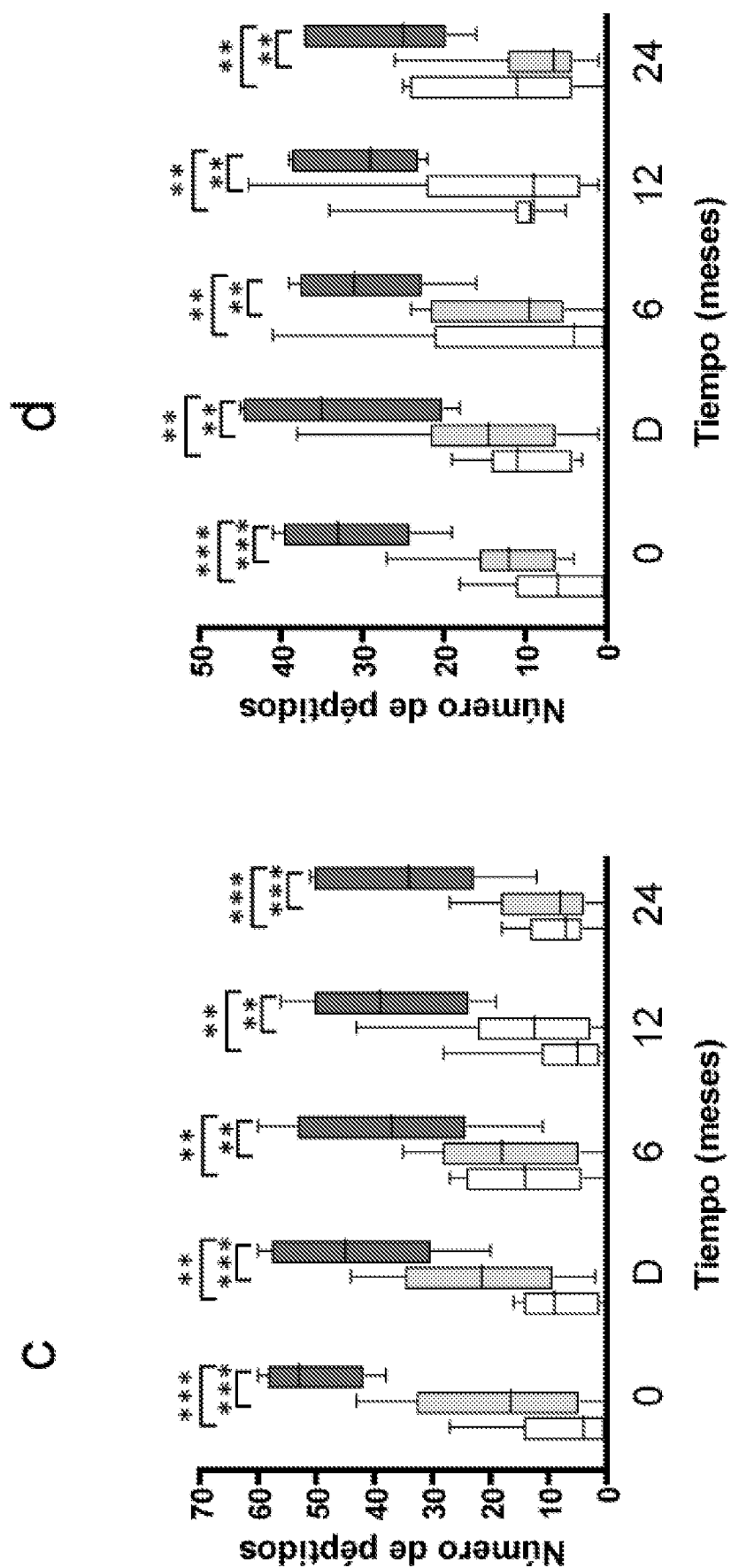


Figura 1 continuación

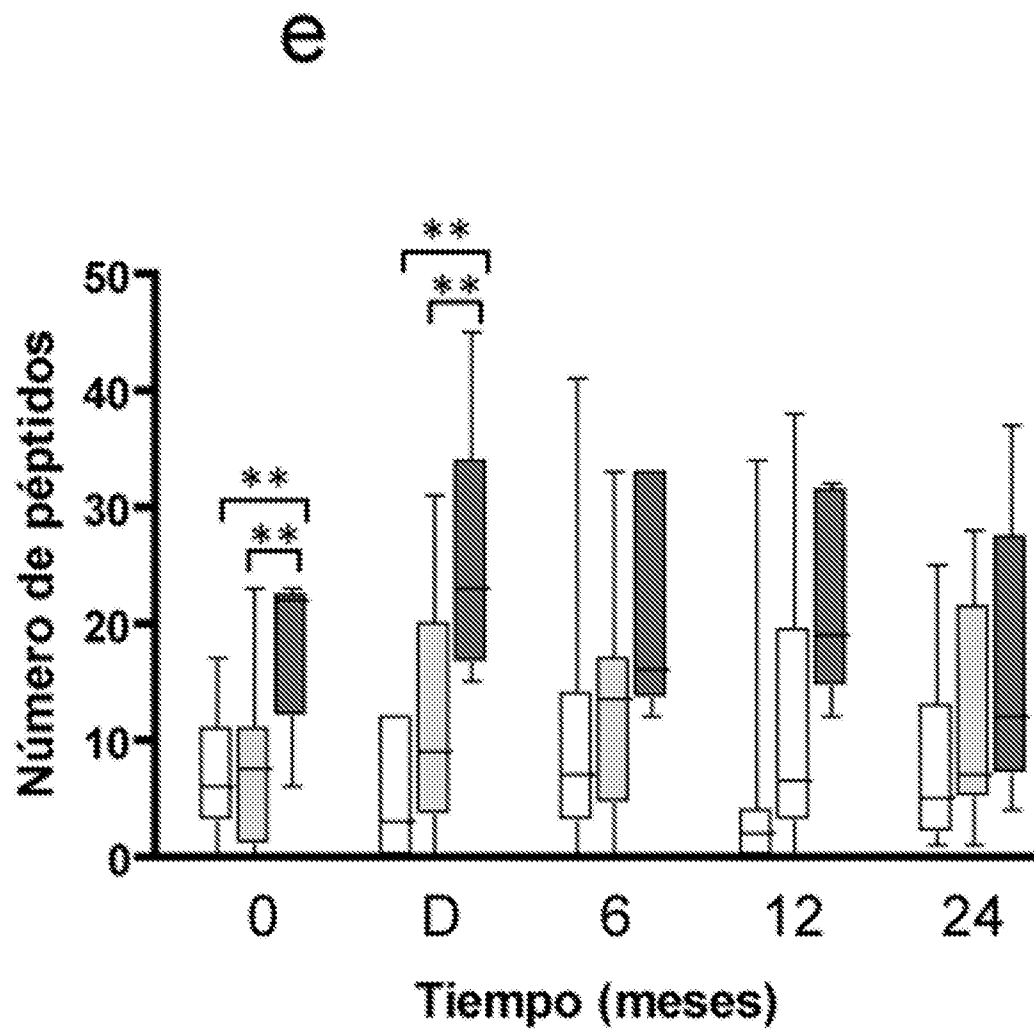


Figura 2

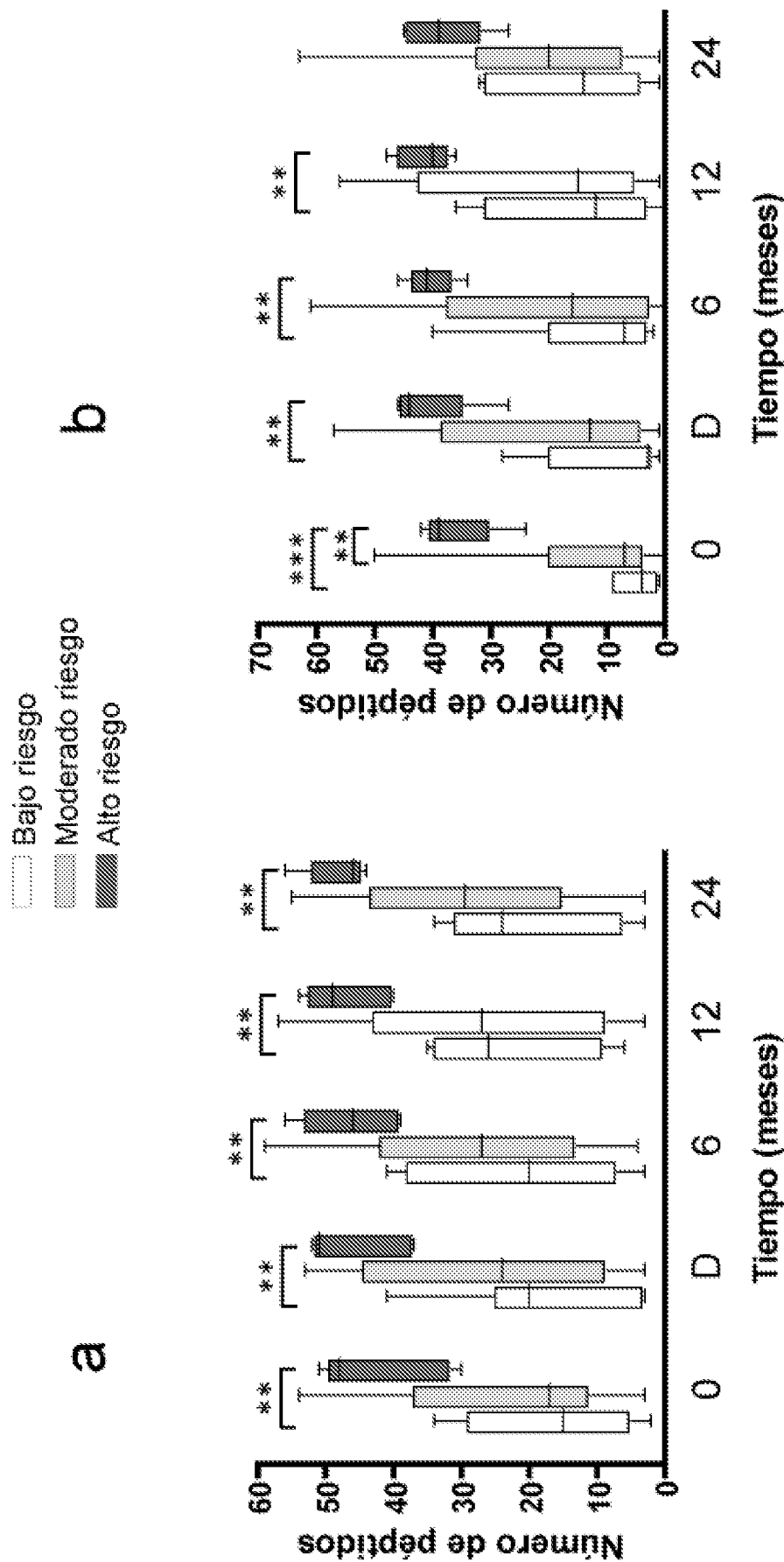
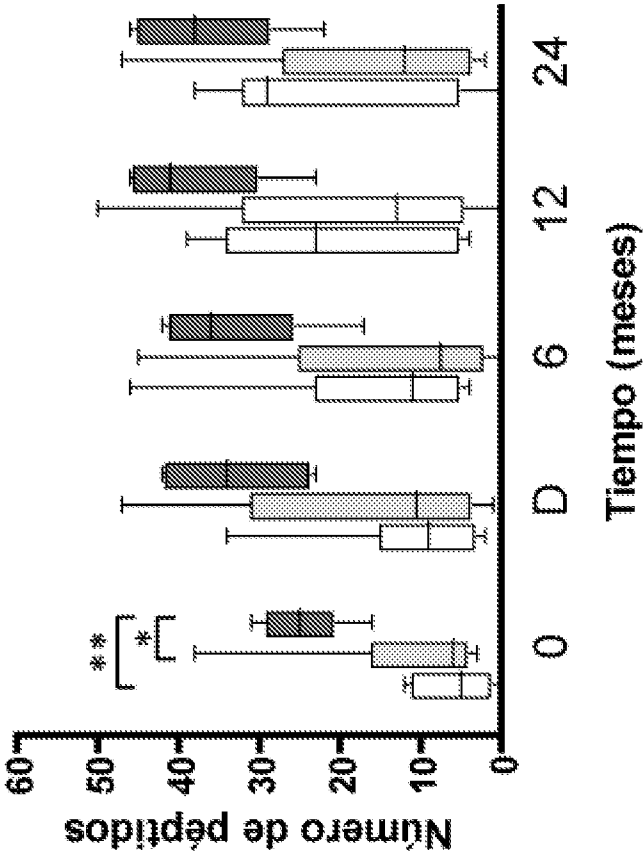


Figura 2 continuación

d



c

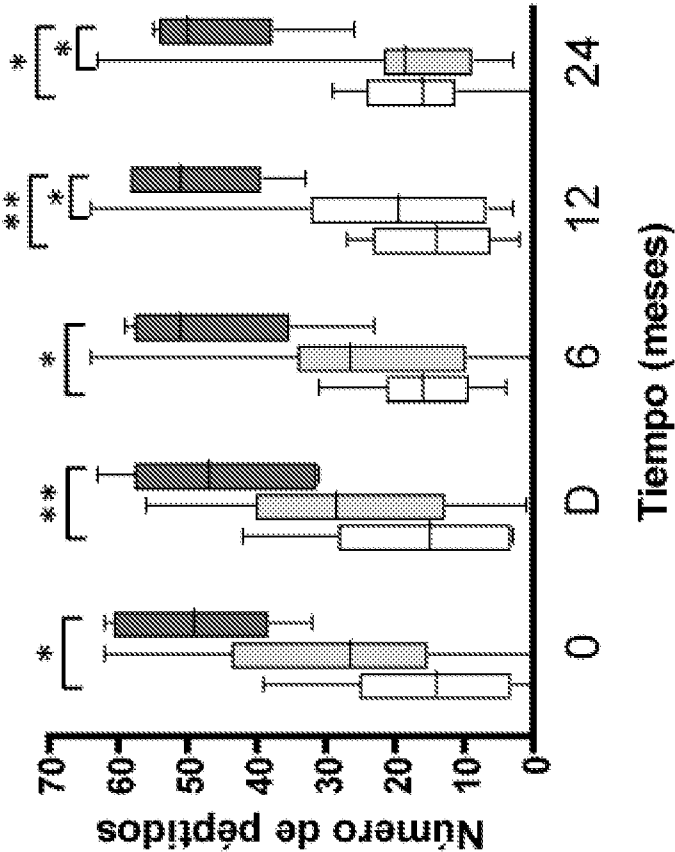


Figura 2 continuación

e

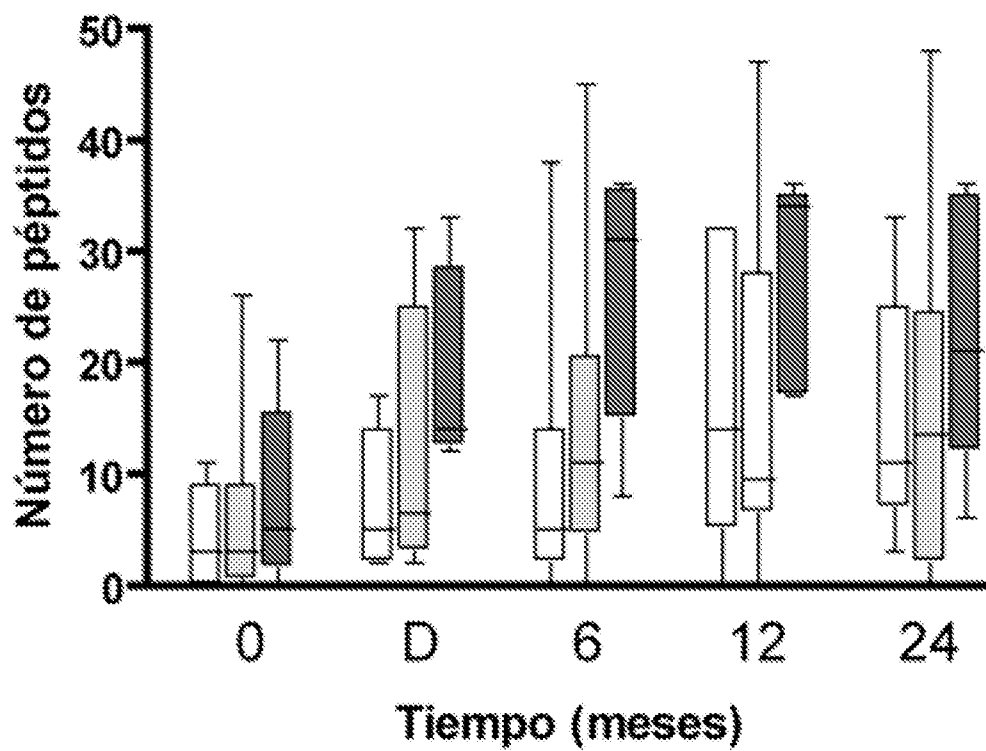


Figura 3

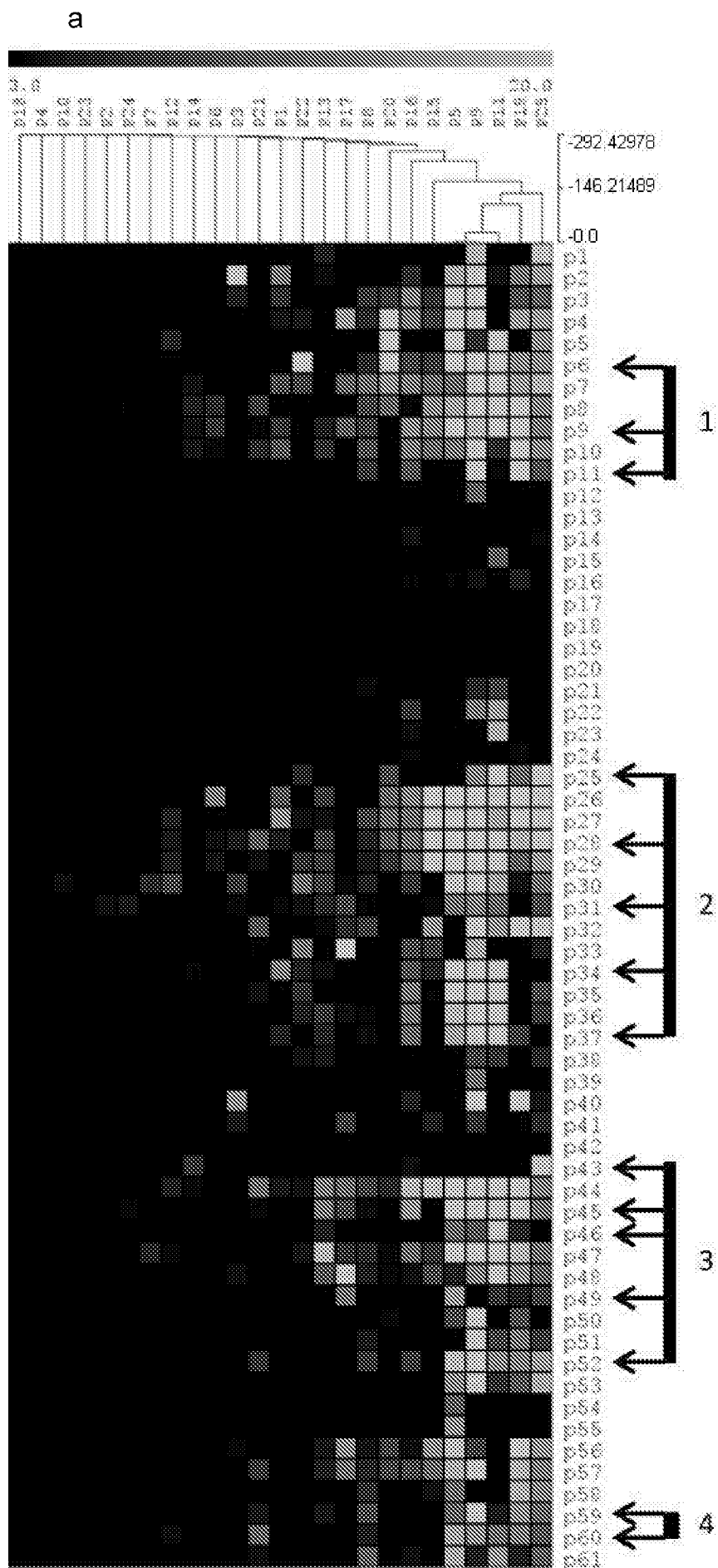




Figura 4

a

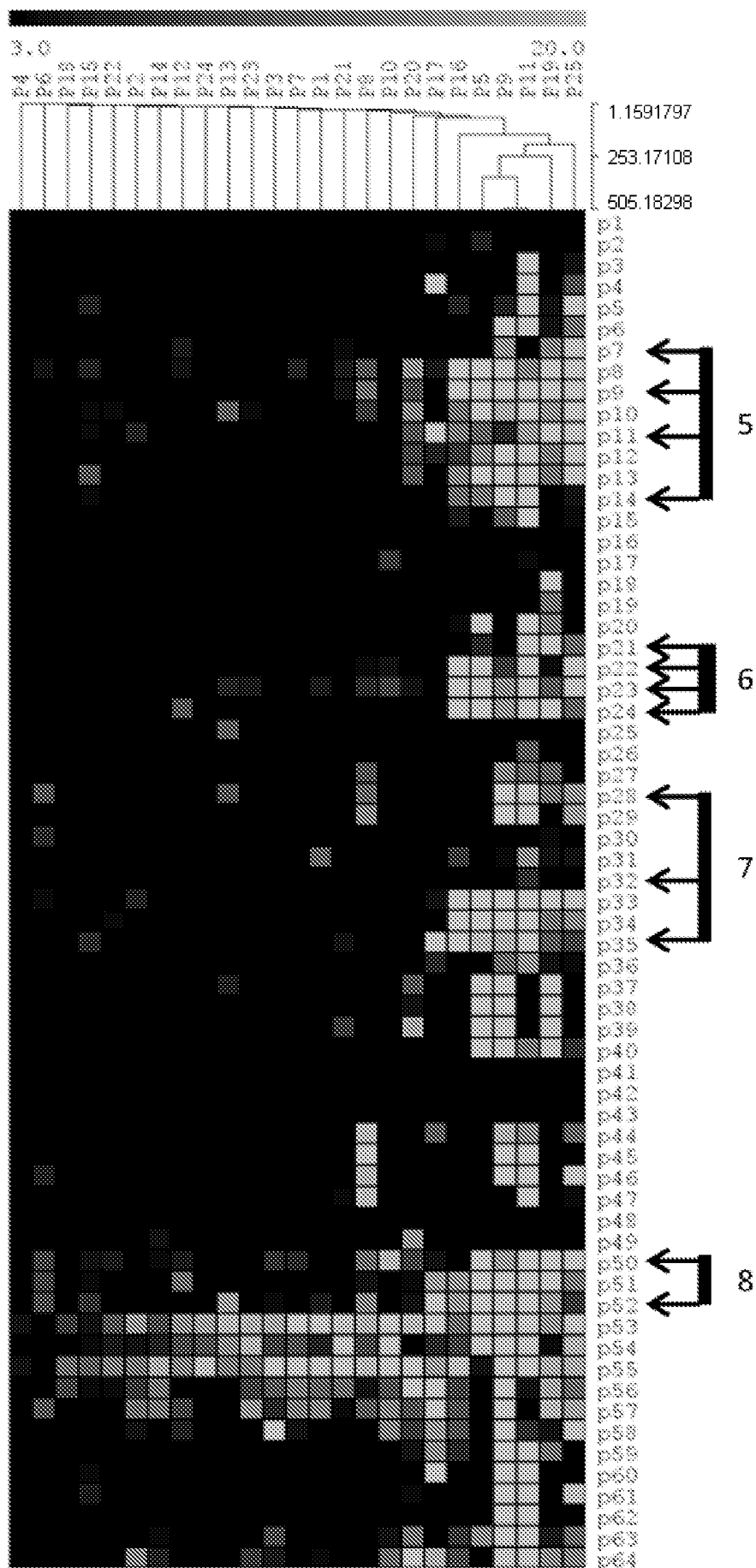


Fig. 4 continuación

b

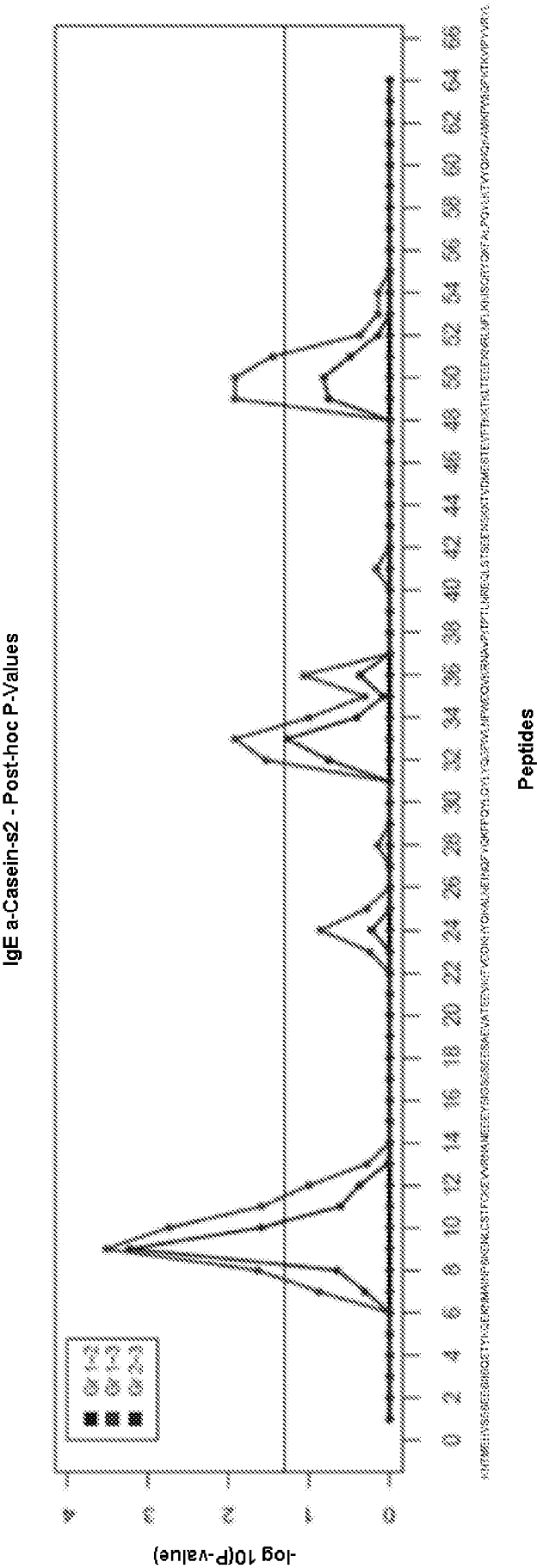


Fig. 5

a

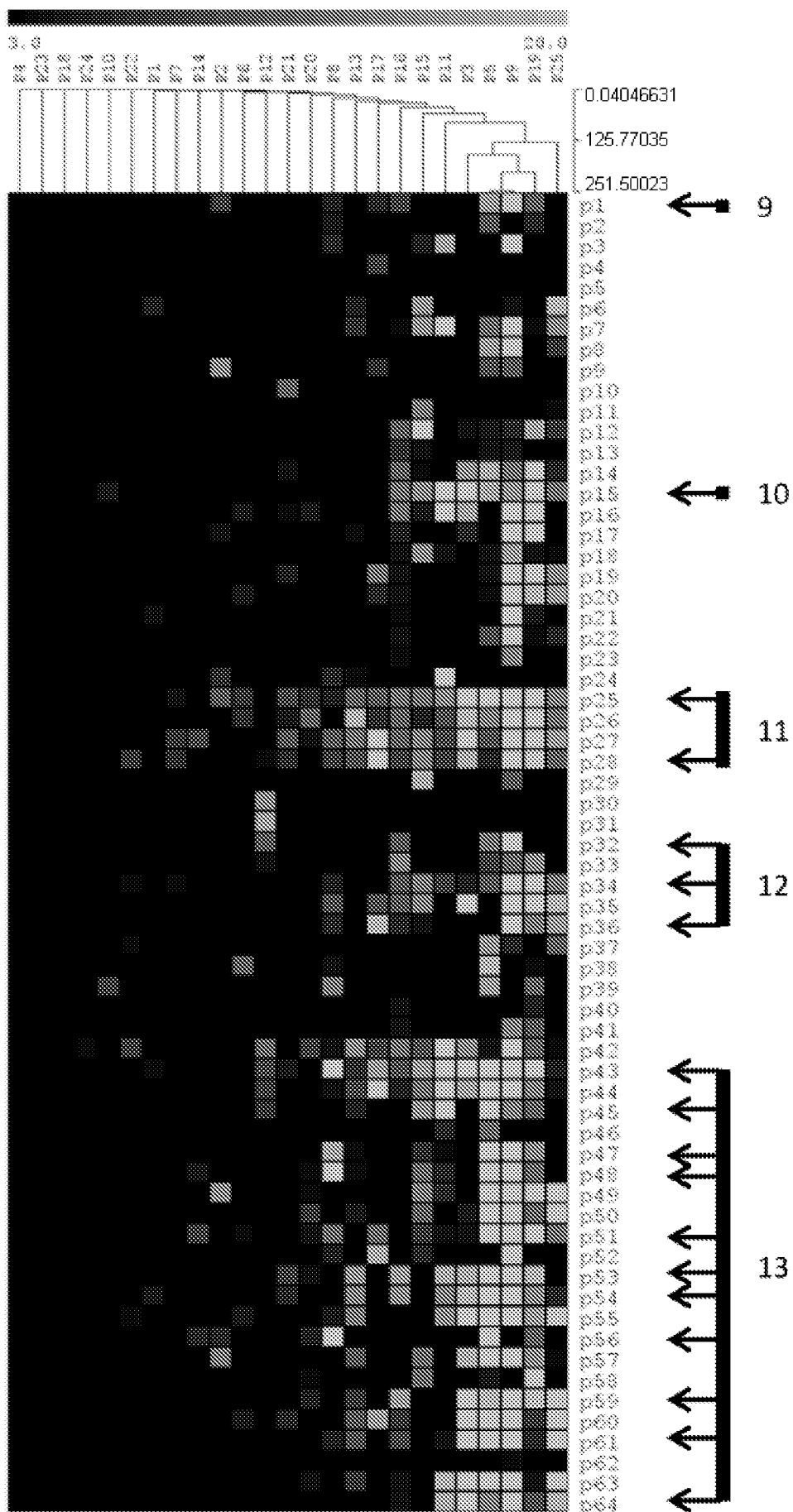


Fig. 5 continuación

b

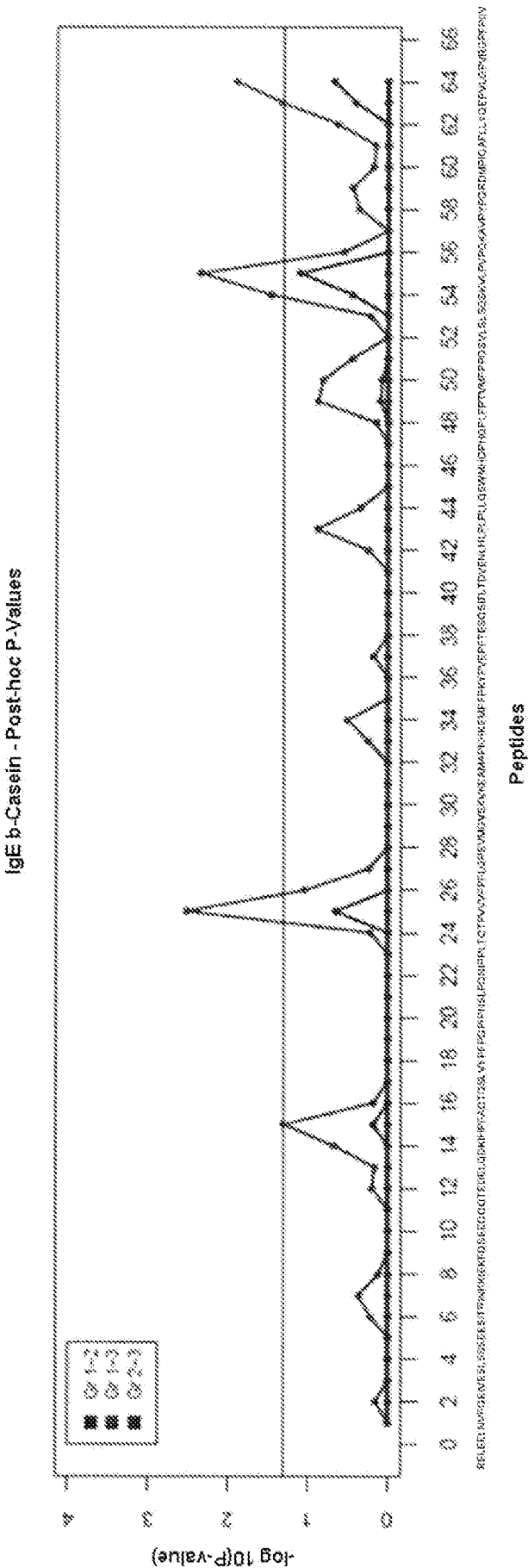


Fig.6

a

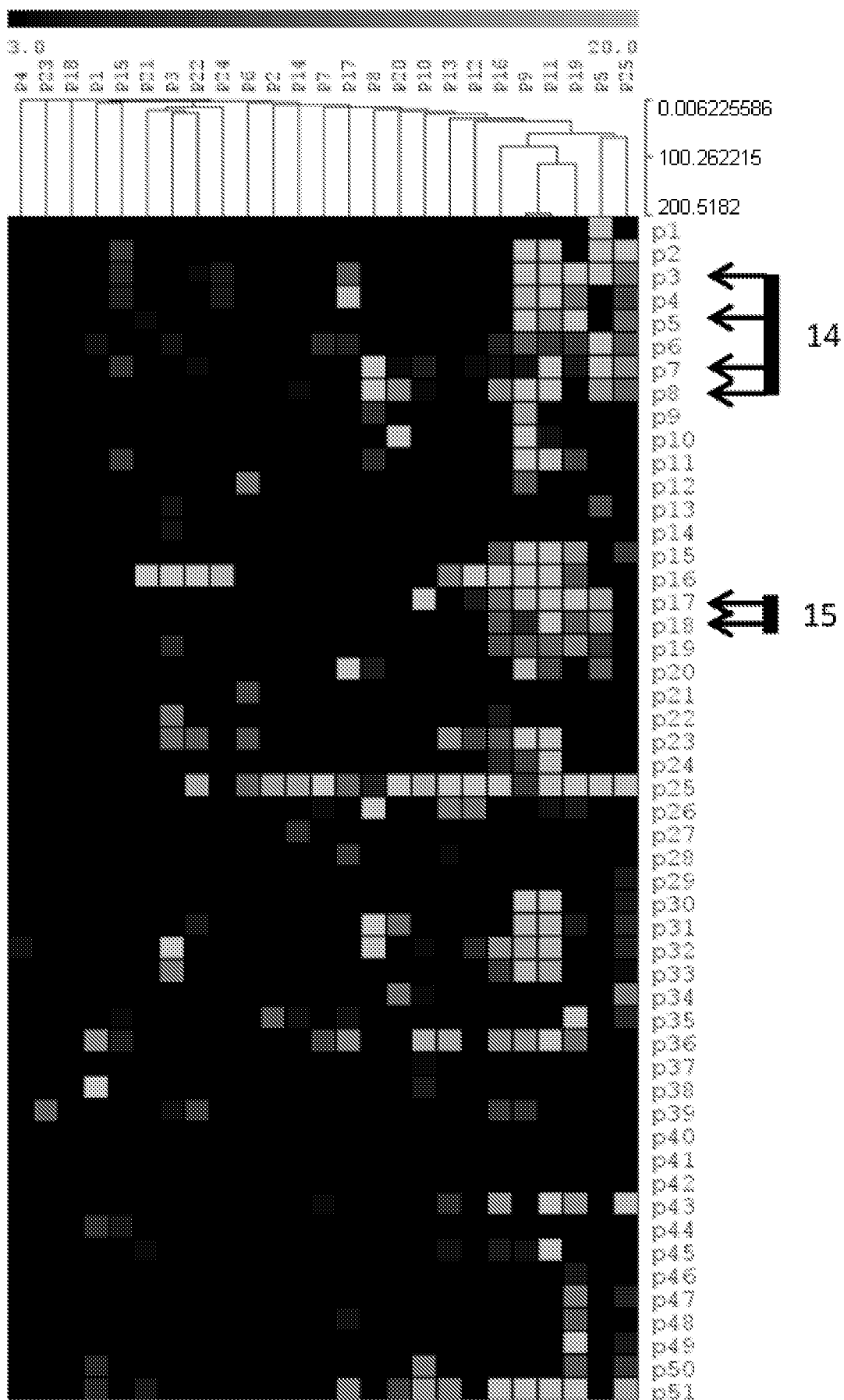


Fig. 6 continuación b

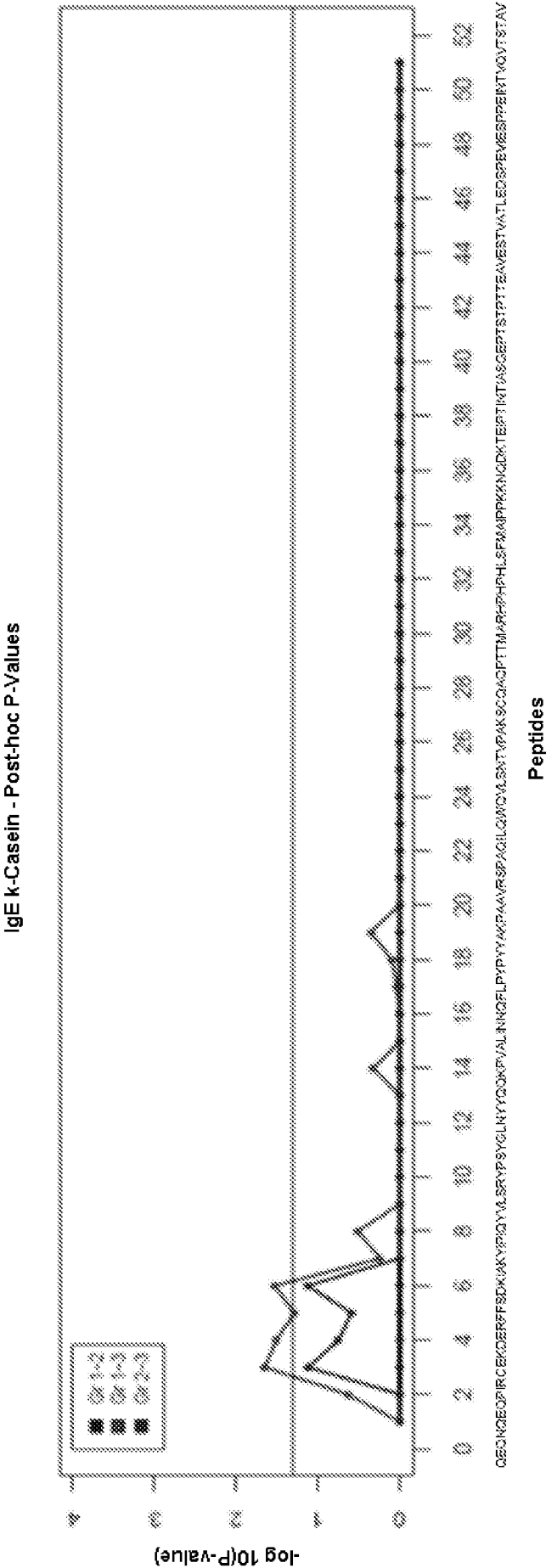


Fig. 7

a

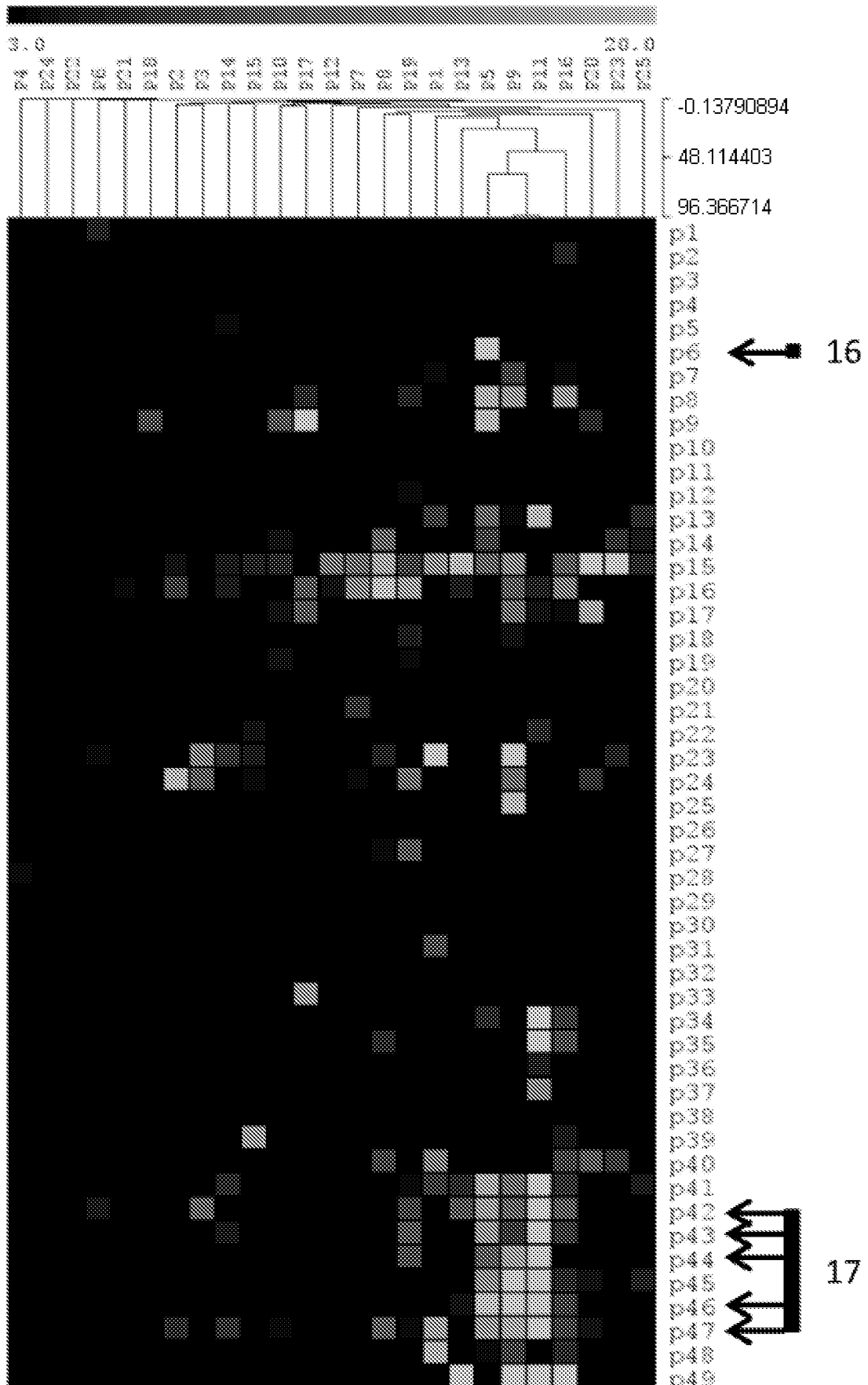


Fig. 7 continuación

b

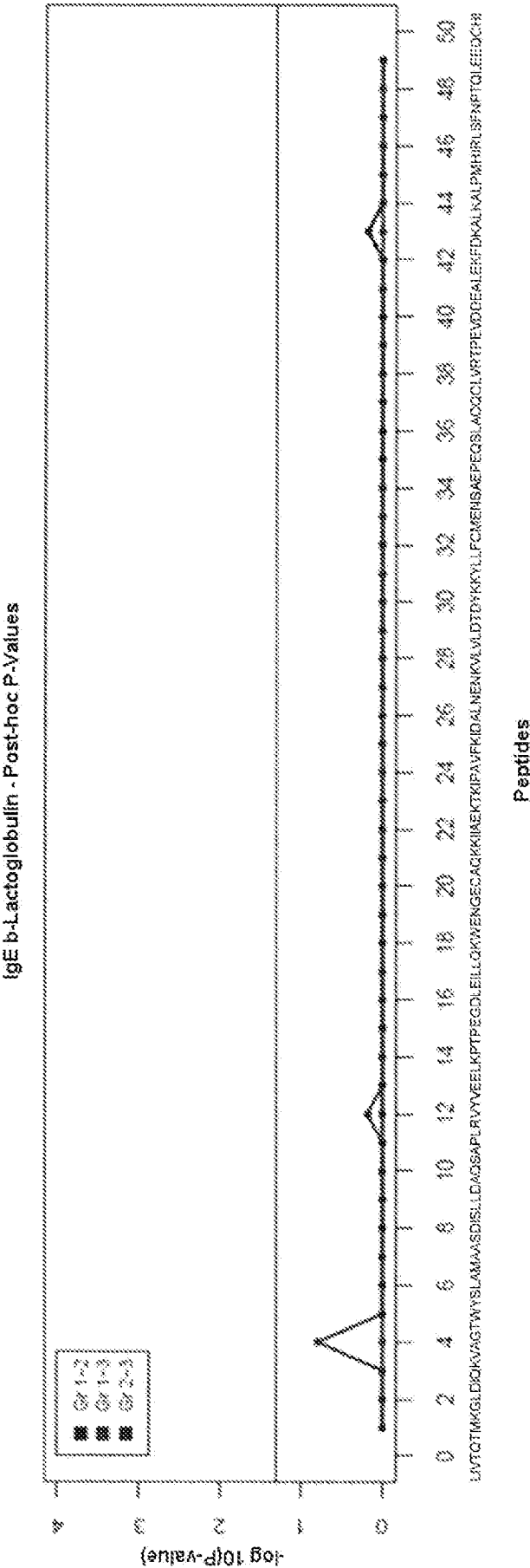


Fig. 8

a

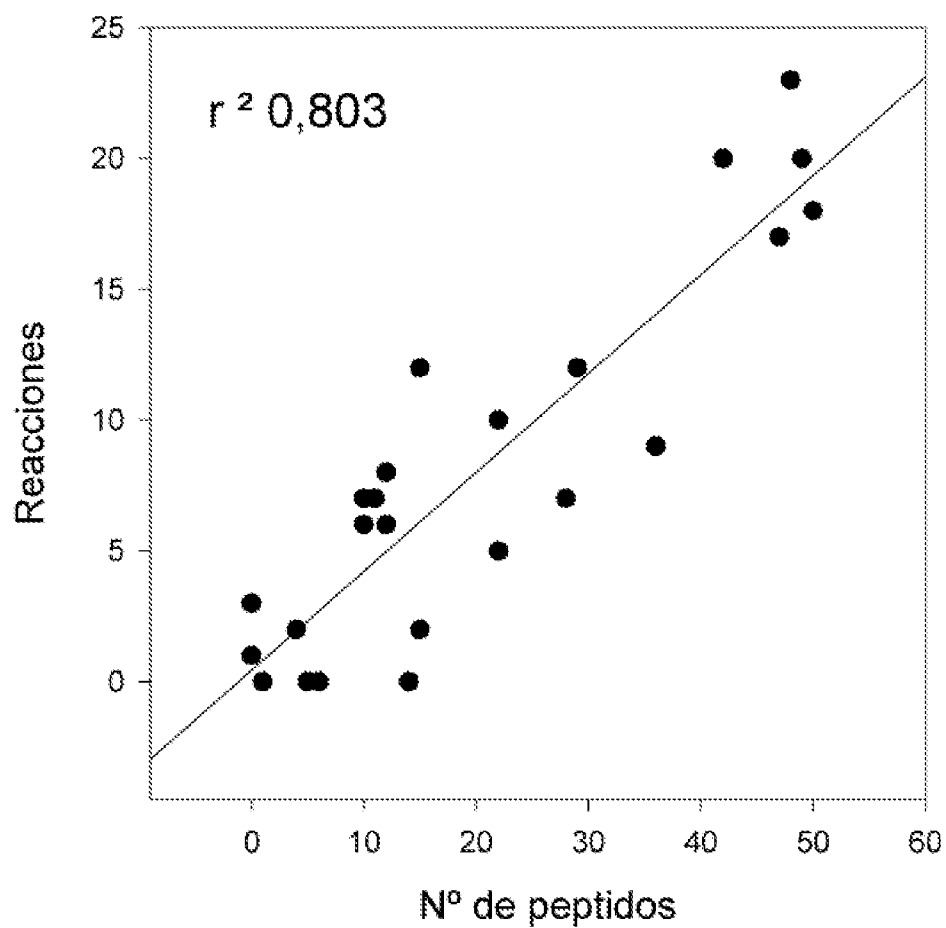


Fig. 8 continuación

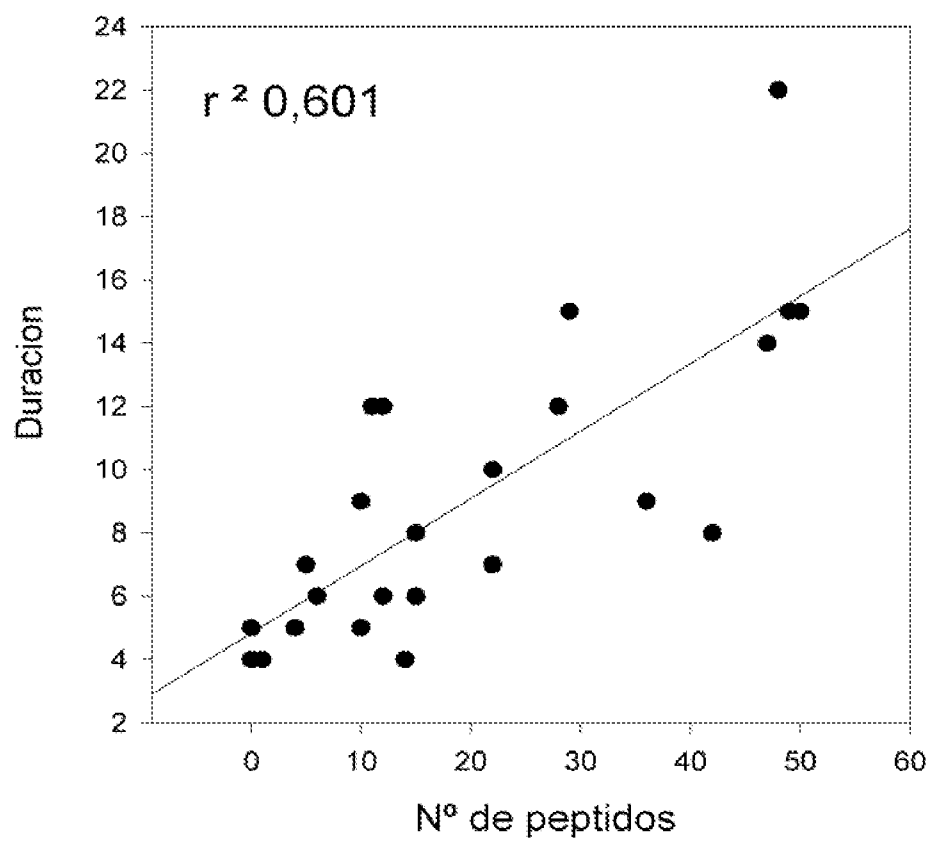
**b**

Fig. 9

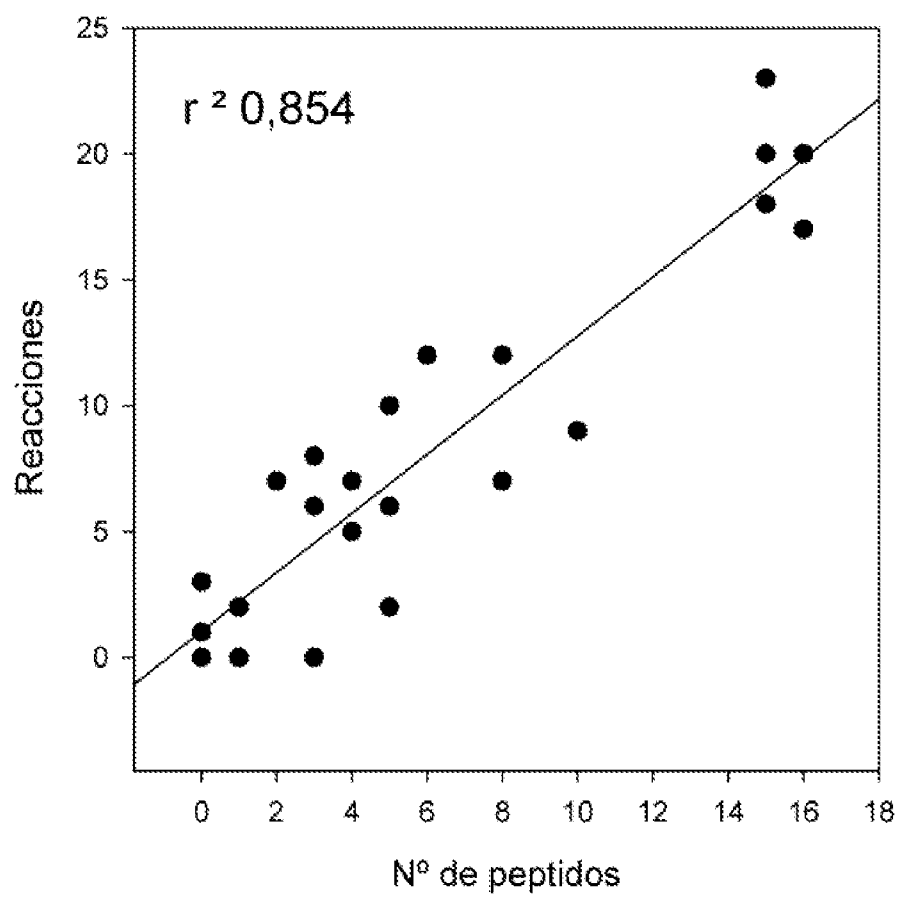
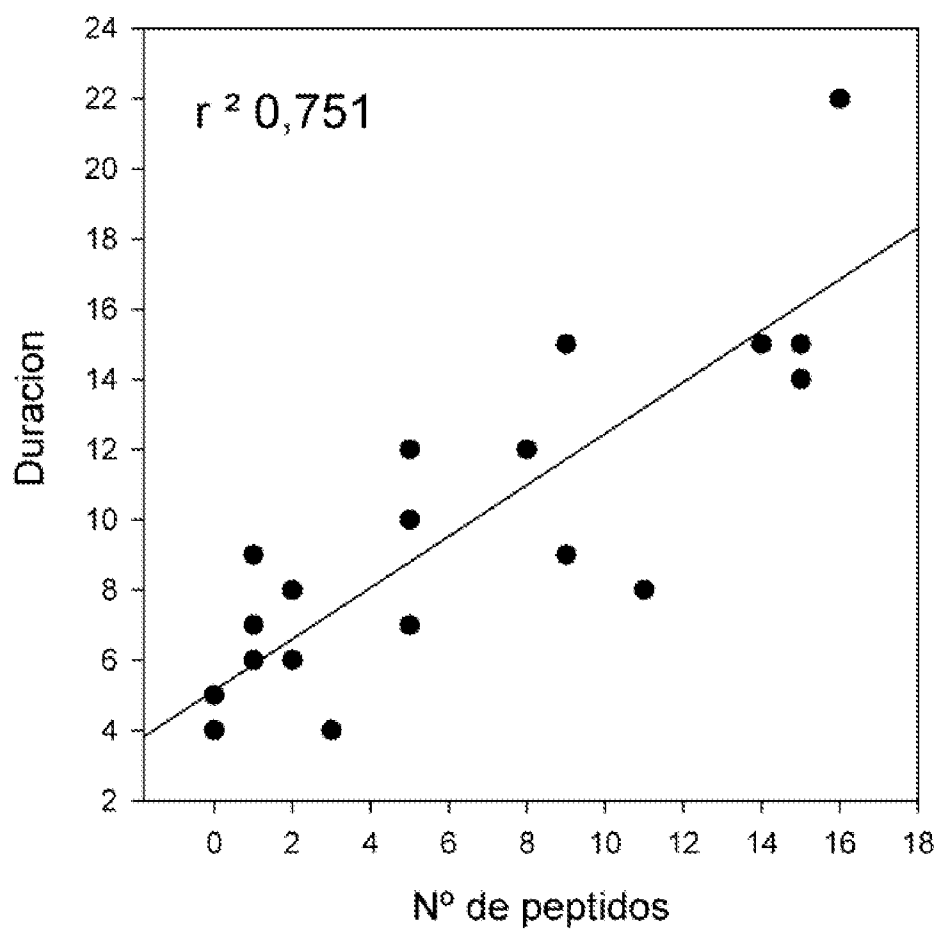


Fig. 10



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070634

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**G01N33/68** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, EMBASE/ELSEVIER, MEDLINE/NLM, XPESP, EMBL-EBI y bases de datos de texto completo TXT

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | WANG J et al. Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 20100301 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/03/2010 VOL: 125 No: 3 Pags: 695 - 702.e6 ISSN 0091-6749 Doi: doi:10.1016/j.jaci.2009.12.017; the whole document.                                                                                                                        | 4-17                  |
| X         | CERECEDO INMACULADA "Aplicación from tecnología microarray al manejo diagnóstico from alergia a proteínas from leche of vaca" Tesis Doctoral (May 2009) [retrieved on 23-09-2014]; Retrieved from Internet: <a href="http://dspace.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/6422/Versi%c3%b3n%20final%20200905024.pdf?sequence=1">URL:&lt;"http://dspace.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/6422/Versi%c3%b3n%20final%20200905024.pdf?sequence=1"&gt;</a> ; the whole document. | 4-17                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                                         |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.                                                               |                                                                                                                                                                                                                                             |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                             |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                                                                |
| "O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.                                                                                           | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                  | "&" document member of the same patent family                                                                                                                                                                                               |

Date of the actual completion of the international search  
01/10/2014

Date of mailing of the international search report  
(09/10/2014)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer  
M. García Coca

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3493411

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070634

| C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                       |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category *                                            | Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                    | Relevant to claim No. |
| X                                                     | CERECEDO I et al. "Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay" Journal of Allergy and Clinical Immunology, 20080901 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/09/2008 VOL: 122 No: 3 Pags: 589 - 594 ISSN 0091-6749 Doi: doi:10.1016/j.jaci.2008.06.040; the whole document.                       | 4-17                  |
| X                                                     | WO 2011032097 A1 (SINAI SCHOOL MEDICINE ET AL.) 17/03/2011, the whole document.                                                                                                                                                                                                                                                                        | 4-17                  |
| A                                                     | SAVILAHTI E M et al. "Early recovery from cow's milk allergy is associated with decreasing IgE and increasing IgG4 binding to cow's milk epitopes" Journal of Allergy and Clinical Immunology, 20100601 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/06/2010 VOL: 125 No: 6 Pags: 1315 - 1321.e9 ISSN 0091-6749 Doi: doi:10.1016/j.jaci.2010.03.025; the whole document. | 4-17                  |
| A                                                     | MATSUMOTO N et al. "Peptide array-based analysis of the specific IgE and IgG4 in cow's milk allergens and its use in allergy evaluation" Peptides, 20091001 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/10/2009 VOL: 30 No: 10 Pags: 1840 - 1847 ISSN 0196-9781 Doi: doi:10.1016/j.peptides.2009.07.005 Nachman Ronald J; the whole document.                           | 4-17                  |

Continuation of Box II, point 1.

The first step of the claimed method consists in "extracting a biological sample from the patient". This step involves an invasive interaction with the human body, and for this reason this Office considers that the claimed method is a surgical method, since it comprises a step that involves a physical intervention on the human or animal body, which is per se a surgical method. There might be cases in which this step can be eliminated or omitted, whenever said step is not an essential part of the claimed method. This is the case, for example, when a step that consists in a surgical method is a preliminary step carried out before the method according to the invention. This could be the case when a step for extracting samples from the patient is required but this step is not part of the diagnostic method itself performed on the sample.

Continuation of Box II, point 2.

The description (page 18, line 23 - page 19, line 4) indicates that, on the basis of an assay carried out by the authors of the invention, "58 epitopes/peptides of the five proteins involved in cow's milk protein allergy (CMPA) were found which are useful for the prognosis of the response to oral immunotherapy for cow's milk allergy (table 1 and figures 3-7). Moreover, the evolution in time of IgE recognition (and optionally IgG4 recognition) of these 58 epitopes/peptides makes it possible to determine the duration of oral immunotherapy (increase in IgG4 recognition and decrease of IgE recognition), and to indicate the immunological state of the patient, which can be a state of tolerance/desensitisation (the patient tolerates the food substance, requiring daily and uninterrupted exposure to the allergen) or a state of permanent tolerance (the patient tolerates the food substance, and abstention from the food substance for a period of time does not change the state of tolerance), and hence the global effectiveness of oral immunotherapy with cow's milk. Bioinformatics studies located a subgroup of 27 epitopes/peptides among the 58 above-mentioned epitopes/peptides which exhibit a high prognostic value for the number of reactions during oral immunotherapy (table 3 and figure 9) and for the duration of treatment required to achieve tolerance (table 4 and figure 10)".

Moreover, on page 20, lines 11-21, it is indicated that "through the analysis of the IgE recognition pattern of the immunologically active sequences of the 58 epitopes/peptides shown in table 1, and of subsets of said sequences, such as the 16 peptides shown in table 3 or the 16 peptides shown in table 4, a series of reference values (see figures 8-10) has been determined which, according to the number of IgE-recognised peptides in a sample extracted from a patient before the start of oral immunotherapy, allows the number of adverse reactions and the time required to achieve desensitisation to be estimated, as well as the need or not for pre-medication. Moreover, it allows patients to be classified as low-risk, moderate risk or high-risk patients, according to the number of IgE-recognised peptides, before oral immunotherapy is started".

It is concluded from these indications in the description that the method consists in determining the effectiveness of oral immunotherapy with cow's milk by analysing the IgE recognition pattern of ALL 58 epitopes/peptides, or at least of 27 of these epitopes/peptides, grouped into two groups of 16 epitopes/peptides.

In order to establish the present international search report, the search was carried out in respect of claims 4-11 (in full) and claims 12-17 (in part).

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

ES2014/070634

**Box No. I** Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☐

in the international application as filed

☐

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

A sequence listing was available to the International Searching Authority (ISA/ES) at the time the international search was carried out, in an acceptable format, and this sequence listing was used for carrying out the international search.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

ES2014/070634

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.: 11.1

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 1-11 relate to subject matter which this Authority considers falls under the provisions of PCT Rule 67.1(iv) relating to methods for the treatment of the human or animal body by surgery or therapy, and to diagnostic means. Nevertheless, a search in respect of claims 4-11 has been carried out on the basis of the use of the claimed peptides (see Supplemental Box, point 1).

2. ☐ Claims Nos.: 1-3

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims 1-3 are not properly supported by the description (see Supplemental Box, point 2).

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2014/070634

| Patent document cited<br>in the search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-----------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO2011032097 A1                               | 17.03.2011          | US2011071043 A1            | 24.03.2011          |
|                                               |                     | US8802375 B2               | 12.08.2014          |
|                                               |                     | EP2478373 A1               | 25.07.2012          |
| -----                                         | -----               | -----                      | -----               |

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070634

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**G01N33/68** (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

**G01N**

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, EMBASE/ELSEVIER, MEDLINE/NLM, XPESP, EMBL-EBI y bases de datos de texto completo TXT

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                                                                                                                               | Relevante para las reivindicaciones nº |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| X          | WANG J et al. "Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy" Journal of Allergy and Clinical Immunology, 20100301 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/03/2010 VOL: 125 No: 3 Pags: 695 - 702.e6 ISSN 0091-6749 Doi: doi:10.1016/j.jaci.2009.12.017; todo el documento. | 4-17                                   |
| X          | CERECEDO INMACULADA "Aplicación de la tecnología microarray al manejo diagnóstico de la alergia a proteínas de la leche de vaca" Tesis Doctoral (mayo 2009) [recuperado el 23-09-2014]; Recuperado de Internet: URL<"http://dspace.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/6422/Versi%c3%b3n%20final%20200905024.pdf?sequence=1"> todo el documento.      | 4-17                                   |

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

|                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Categorías especiales de documentos citados:                                                                                                                                               | "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.     |
| "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.                                                                                      | "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.                                                                                    |
| "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.                                                                   | "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. |
| "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). | "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.                                                                                                                                                                                                                 |
| "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                |

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
**01/10/2014**

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**09 de octubre de 2014 (09/10/2014)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
M. García Coca

Nº de teléfono 91 3493411

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070634

| C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                        |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Categoría *                                          | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                                                                                                                              | Relevante para las reivindicaciones nº |
| X                                                    | CERECEDO I et al. "Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay" Journal of Allergy and Clinical Immunology, 20080901 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/09/2008 VOL: 122 No: 3 Pags: 589 - 594 ISSN 0091-6749 Doi: doi:10.1016/j.jaci.2008.06.040; todo el documento.                       | 4-17                                   |
| X                                                    | WO 2011032097 A1 (SINAI SCHOOL MEDICINE ET AL.) 17/03/2011, todo el documento.                                                                                                                                                                                                                                                                        | 4-17                                   |
| A                                                    | SAVILAHTI E M et al. "Early recovery from cow's milk allergy is associated with decreasing IgE and increasing IgG4 binding to cow's milk epitopes" Journal of Allergy and Clinical Immunology, 20100601 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/06/2010 VOL: 125 No: 6 Pags: 1315 - 1321.e9 ISSN 0091-6749 Doi: doi:10.1016/j.jaci.2010.03.025; todo el documento. | 4-17                                   |
| A                                                    | MATSUMOTO N et al. "Peptide array-based analysis of the specific IgE and IgG4 in cow's milk allergens and its use in allergy evaluation" Peptides, 20091001 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/10/2009 VOL: 30 No: 10 Pags: 1840 - 1847 ISSN 0196-9781 Doi: doi:10.1016/j.peptides.2009.07.005 Nachman Ronald J; todo el documento.                           | 4-17                                   |

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2014/070634

## Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)

1 En lo que se refiere a **las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias presentada o entregada:

a. Medios

- ☐ en papel  
☒ en formato electrónico

b. Cuando

- ☐ en la solicitud internacional tal y como se presentó  
☐ junto con la solicitud internacional en formato electrónico  
☐ posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda

2. ☐ Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.

3. Comentarios adicionales:

**A la hora de realizar la búsqueda internacional la Administración encargada de la Búsqueda Internacional (ISA/ES) estaba en posesión del listado de secuencias en un formato aceptado por ésta y tal listado se ha utilizado para la realización de la búsqueda internacional.**

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2014/070634

## Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones n°s: **1-11**  
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

**Las reivindicaciones N° 1-11 se refieren a una materia que esta Administración considera que están afectadas por las disposiciones de la Regla 67. 1 (iv) PCT, relativas a métodos de tratamiento quirúrgico o terapéutico del cuerpo humano o animal, así como medios de diagnóstico. A pesar de ello, se ha efectuado una búsqueda para las reivindicaciones 4-11 basada en el uso de los péptidos reivindicados (ver Recuadro suplementario 1).**

2. ☒ Las reivindicaciones n°s: **1-3**  
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

**Las reivindicaciones 1-3 no están adecuadamente fundadas en la descripción (Ver Recuadro suplementario 2).**

3. ☐ Las reivindicaciones n°s:  
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

## Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

### Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

## Continuación del Recuadro II punto 1.

La primera etapa del método reivindicado es “aislar una muestra biológica del sujeto”. Esta etapa implica una interacción invasiva con el cuerpo humano, por lo que esta oficina considera que el método reivindicado es un método quirúrgico ya que comprende una etapa que implica una intervención física sobre el cuerpo humano o animal que constituye por sí misma un método quirúrgico.

Habrán casos en que dicha etapa pueda eliminarse u omitirse siempre que dicha etapa no forme parte esencial del método reivindicado. Por ejemplo, cuando la etapa que constituye un método quirúrgico sea una etapa previa al método de la invención. Este puede ser el caso de que sea necesaria una etapa de extracción de muestras del paciente pero dicha etapa no forma parte del propio método de diagnóstico, que se realiza sobre la muestra.

## Continuación del Recuadro II punto 2.

En la descripción (página 18 línea 23 - página 19 línea 4) se indica que a partir del ensayo hecho por los autores de la invención, ***“se encontraron 58 epítomos/péptidos de las cinco proteínas responsables de la APLV que son informativos para el pronóstico de la respuesta a la ITO frente a leche de vaca (tabla 1 y figuras 3 a 7). Además, la evolución temporal en el reconocimiento por IgE (y opcionalmente IgG4) de estos 58 epítomos/péptidos permite determinar el tiempo de duración de la ITO (aumento de reconocimiento IgG4 y disminución de IgE), y señalar el estado inmunológico del paciente de tolerancia/desensibilización (tolera el alimento requiriendo exposición al alérgeno a diario y sin interrupción) o tolerancia permanente (tolera el alimento y la suspensión del mismo durante un periodo de tiempo no cambia el estado de tolerancia), y por tanto la eficacia global de la ITO con leche de vaca. Mediante el análisis bioinformático, de entre los 58 epítomos/péptidos descritos anteriormente, se localizó un subgrupo de 27 epítomos/péptidos que presentan un elevado valor pronóstico del número de reacciones durante la ITO (tabla 3 y figura 9) y del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia (tabla 4 y figura 10)”***.

Además, en la página 20 líneas 11-21, se indica que ***“analizando el patrón de reconocimiento IgE de las secuencias inmunológicamente activas de los 58 epítomos/péptidos mostrados en la tabla 1, así como de subconjuntos de dichas secuencias como lo son los 16 péptidos mostrados en la tabla 3 o los 16 péptidos mostrados en la tabla 4, se han establecido una serie de valores de referencia (ver figuras 8-10) que permiten, en función del número de péptidos reconocidos por IgE en una muestra aislada de un paciente antes de empezar el tratamiento ITO, estimar el número de reacciones adversas y el tiempo requerido para alcanzar la desensibilización así como la necesidad o no de pre-medicación. Además, nos permite clasificar a los pacientes en función del número de péptidos reconocidos por IgE antes de empezar la ITO como de bajo riesgo, riesgo moderado o riesgo alto”***.

De lo indicado en la descripción se deduce que el método se basa en determinar la eficacia de la ITO con leche de vaca, mediante el análisis del patrón de reconocimiento IgE de TODOS los 58 epítomos/péptidos, o al menos de 27 de los mismos, agrupados en 2 grupos de 16 epítomos/péptidos.

Para la realización del presente Informe de Búsqueda Internacional, se ha realizado la búsqueda de las reivindicaciones 4-11 y parcialmente de las reivindicaciones 12-17.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070634

| Documento de patente citado<br>en el informe de búsqueda | Fecha de<br>Publicación | Miembro(s) de la<br>familia de patentes | Fecha de<br>Publicación |
|----------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|
| WO2011032097 A1                                          | 17.03.2011              | US2011071043 A1                         | 24.03.2011              |
|                                                          |                         | US8802375 B2                            | 12.08.2014              |
|                                                          |                         | EP2478373 A1                            | 25.07.2012              |
| -----                                                    | -----                   | -----                                   | -----                   |

Listado de Secuencias  
SEQUENCE LISTING

<110> FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL  
HOSPITAL

UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL

FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL  
HOSPITAL

CLINICO SAN CARLOS

<120> MÉTODO PARA EL PRONÓSTICO DE LA EFICACIA DE  
LA INMUNOTERAPIA ORAL

PARA EL TRATAMIENTO DE LA ALERGIA A LAS  
PROTEÍNAS DE LECHE DE  
VACA

<130> PT0042/2013

<160> 75

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 35

<212> PRT

<213> Bos taurus

## Listado de Secuencias

<400> 1

Leu Asn Glu Asn Leu Leu Arg Phe Phe Val Ala Pro Phe Pro Glu Val  
1 5 10 15

Phe Gly Lys Glu Lys Val Asn Glu Leu Ser Lys Asp Ile Gly Ser Glu  
20 25 30

Ser Thr Glu  
35

<210> 2

<211> 56

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 2

Pro Asn Ser Val Glu Gln Lys His Ile Gln Lys Glu Asp Val Pro Ser  
1 5 10 15

Glu Arg Tyr Leu Gly Tyr Leu Glu Gln Leu Leu Arg Leu Lys Lys Tyr

## Listado de Secuencias

20

25

30

Lys Val Pro Gln Leu Glu Ile Val Pro Asn Ser Ala Glu Glu Arg Leu

35

40

45

His Ser Met Lys Glu Gly Ile His

50

55

<210> 3

<211> 46

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 3

Ile His Ala Gln Gln Lys Glu Pro Met Ile Gly Val Asn Gln Glu Leu

1

5

10

15

Ala Tyr Phe Tyr Pro Glu Leu Phe Arg Gln Phe Tyr Gln Leu Asp Ala

20

25

30

## Listado de Secuencias

Tyr Pro Ser Gly Ala Trp Tyr Tyr Val Pro Leu Gly Thr Gln  
35 40 45

<210> 4

<211> 23

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 4

Asp Ala Pro Ser Phe Ser Asp Ile Pro Asn Pro Ile Gly Ser Glu Asn  
1 5 10 15

Ser Glu Lys Thr Thr Met Pro  
20

<210> 5

<211> 41

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 5

## Listado de Secuencias

Thr Tyr Lys Gln Glu Lys Asn Met Ala Ile Asn Pro Ser Lys Glu Asn  
1                    5                    10                    15

Leu Cys Ser Thr Phe Cys Lys Glu Val Val Arg Asn Ala Asn Glu Glu  
                  20                    25                    30

Glu Tyr Ser Ile Gly Ser Ser Ser Glu  
                  35                    40

<210> 6

<211> 29

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 6

Ser Ala Glu Val Ala Thr Glu Glu Val Lys Ile Thr Val Asp Asp Lys  
1                    5                    10                    15

His Tyr Gln Lys Ala Leu Asn Glu Ile Asn Gln Phe Tyr  
                  20                    25

## Listado de Secuencias

<210> 7  
<211> 41  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<400> 7

Leu Asn Glu Ile Asn Gln Phe Tyr Gln Lys Phe Pro Gln Tyr Leu Gln  
1                    5                    10                    15

Tyr Leu Tyr Gln Gly Pro Ile Val Leu Asn Pro Trp Asp Gln Val Lys  
20                    25                    30

Arg Asn Ala Val Pro Ile Thr Pro Thr  
35                    40

<210> 8  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<400> 8

## Listado de Secuencias

Thr Lys Lys Thr Lys Leu Thr Glu Glu Glu Lys Asn Arg Leu Asn Phe  
1 5 10 15

Leu Lys Lys Ile Ser Gln Arg Tyr Gln Lys  
20 25

<210> 9  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<400> 9

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

Ser Ser Ser Glu  
20

<210> 10  
<211> 20

## Listado de Secuencias

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 10

Asp Glu Leu Gln Asp Lys Ile His Pro Phe Ala Gln Thr Gln Ser Leu  
1 5 10 15

Val Tyr Pro Phe  
20

<210> 11

<211> 29

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 11

Asn Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr Pro Val Val Val Pro Pro Phe Leu  
1 5 10 15

Gln Pro Glu Val Met Gly Val Ser Lys Val Lys Glu Ala  
20 25

## Listado de Secuencias

<210> 12

<211> 32

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 12

Gly Val Ser Lys Val Lys Glu Ala Met Ala Pro Lys His Lys Glu Met  
1 5 10 15

Pro Phe Pro Lys Tyr Pro Val Glu Pro Phe Thr Glu Ser Gln Ser Leu  
20 25 30

<210> 13

<211> 83

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 13

Leu Thr Asp Val Glu Asn Leu His Leu Pro Leu Pro Leu Leu Gln Ser  
1 5 10 15

## Listado de Secuencias

Trp Met His Gln Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr Val Met Phe Pro  
20 25 30

Pro Gln Ser Val Leu Ser Leu Ser Gln Ser Lys Val Leu Pro Val Pro  
35 40 45

Gln Lys Ala Val Pro Tyr Pro Gln Arg Asp Met Pro Ile Gln Ala Phe  
50 55 60

Leu Leu Tyr Gln Glu Pro Val Leu Gly Pro Val Arg Gly Pro Phe Pro  
65 70 75 80

Ile Ile Val

<210> 14

<211> 35

<212> PRT

<213> Bos taurus

## Listado de Secuencias

<400> 14

Gln Pro Ile Arg Cys Glu Lys Asp Glu Arg Phe Phe Ser Asp Lys Ile  
1 5 10 15

Ala Lys Tyr Ile Pro Ile Gln Tyr Val Leu Ser Arg Tyr Pro Ser Tyr  
20 25 30

Gly Leu Asn  
35

<210> 15

<211> 23

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 15

Ala Leu Ile Asn Asn Gln Phe Leu Pro Tyr Pro Tyr Tyr Ala Lys Pro  
1 5 10 15

## Listado de Secuencias

Ala Ala Val Arg Ser Pro Ala  
20

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 16

Ala Gly Thr Trp Tyr Ser Leu Ala Met Ala Ala Ser Asp Ile Ser Leu  
1 5 10 15

Leu Asp Ala Gln  
20

<210> 17

<211> 35

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 17

## Listado de Secuencias

Arg Thr Pro Glu Val Asp Asp Glu Ala Leu Glu Lys Phe Asp Lys Ala  
1 5 10 15

Leu Lys Ala Leu Pro Met His Ile Arg Leu Ser Phe Asn Pro Thr Gln  
20 25 30

Leu Glu Glu  
35

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 18

Leu Asn Glu Asn Leu Leu Arg Phe Phe Val Ala Pro Phe Pro Glu Val  
1 5 10 15

Phe Gly Lys Glu  
20

## Listado de Secuencias

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 19

Val Ala Pro Phe Pro Glu Val Phe Gly Lys Glu Lys Val Asn Glu Leu

1                      5                      10                      15

Ser Lys Asp Ile

20

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 20

Val Phe Gly Lys Glu Lys Val Asn Glu Leu Ser Lys Asp Ile Gly Ser

1                      5                      10                      15

## Listado de Secuencias

Glu Ser Thr Glu  
20

<210> 21  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<400> 21

Pro Asn Ser Val Glu Gln Lys His Ile Gln Lys Glu Asp Val Pro Ser  
1 5 10 15

Glu Arg Tyr Leu  
20

<210> 22  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<400> 22

## Listado de Secuencias

Gln Lys Glu Asp Val Pro Ser Glu Arg Tyr Leu Gly Tyr Leu Glu Gln  
1 5 10 15

Leu Leu Arg Leu  
20

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 23

Tyr Leu Gly Tyr Leu Glu Gln Leu Leu Arg Leu Lys Lys Tyr Lys Val  
1 5 10 15

Pro Gln Leu Glu  
20

<210> 24

<211> 20

## Listado de Secuencias

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 24

Arg Leu Lys Lys Tyr Lys Val Pro Gln Leu Glu Ile Val Pro Asn Ser  
1 5 10 15

Ala Glu Glu Arg  
20

<210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 25

Leu Glu Ile Val Pro Asn Ser Ala Glu Glu Arg Leu His Ser Met Lys  
1 5 10 15

Glu Gly Ile His  
20

## Listado de Secuencias

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 26

Ile His Ala Gln Gln Lys Glu Pro Met Ile Gly Val Asn Gln Glu Leu  
1 5 10 15

Ala Tyr Phe Tyr  
20

<210> 27

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 27

Glu Pro Met Ile Gly Val Asn Gln Glu Leu Ala Tyr Phe Tyr Pro Glu  
1 5 10 15

## Listado de Secuencias

Leu Phe Arg Gln  
20

<210> 28

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 28

Ile Gly Val Asn Gln Glu Leu Ala Tyr Phe Tyr Pro Glu Leu Phe Arg  
1 5 10 15

Gln Phe Tyr Gln  
20

<210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

## Listado de Secuencias

<400> 29

Phe Tyr Pro Glu Leu Phe Arg Gln Phe Tyr Gln Leu Asp Ala Tyr Pro  
1 5 10 15

Ser Gly Ala Trp  
20

<210> 30

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 30

Tyr Gln Leu Asp Ala Tyr Pro Ser Gly Ala Trp Tyr Tyr Val Pro Leu  
1 5 10 15

Gly Thr Gln Tyr  
20

<210> 31

## Listado de Secuencias

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 31

Asp Ala Pro Ser Phe Ser Asp Ile Pro Asn Pro Ile Gly Ser Glu Asn  
1 5 10 15

Ser Glu Lys Thr  
20

<210> 32

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 32

Ser Phe Ser Asp Ile Pro Asn Pro Ile Gly Ser Glu Asn Ser Glu Lys  
1 5 10 15

Thr Thr Met Pro

## Listado de Secuencias

20

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 33

Thr Tyr Lys Gln Glu Lys Asn Met Ala Ile Asn Pro Ser Lys Glu Asn  
1 5 10 15

Leu Cys Ser Thr  
20

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 34

Asn Met Ala Ile Asn Pro Ser Lys Glu Asn Leu Cys Ser Thr Phe Cys

## Listado de Secuencias

1                    5                    10                    15

Lys Glu Val Val  
20

<210> 35  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<400> 35

Ser Lys Glu Asn Leu Cys Ser Thr Phe Cys Lys Glu Val Val Arg Asn  
1                    5                    10                    15

Ala Asn Glu Glu  
20

<210> 36  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

## Listado de Secuencias

<400> 36

Cys Lys Glu Val Val Arg Asn Ala Asn Glu Glu Glu Tyr Ser Ile Gly  
1 5 10 15

Ser Ser Ser Glu  
20

<210> 37

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 37

Ser Ala Glu Val Ala Thr Glu Glu Val Lys Ile Thr Val Asp Asp Lys  
1 5 10 15

His Tyr Gln Lys  
20

## Listado de Secuencias

<210> 38

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 38

Val Ala Thr Glu Glu Val Lys Ile Thr Val Asp Asp Lys His Tyr Gln  
1                    5                    10                    15

Lys Ala Leu Asn  
20

<210> 39

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 39

Glu Glu Val Lys Ile Thr Val Asp Asp Lys His Tyr Gln Lys Ala Leu  
1                    5                    10                    15

## Listado de Secuencias

Asn Glu Ile Asn  
20

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 40

Lys Ile Thr Val Asp Asp Lys His Tyr Gln Lys Ala Leu Asn Glu Ile  
1 5 10 15

Asn Gln Phe Tyr  
20

<210> 41

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 41

## Listado de Secuencias

Leu Asn Glu Ile Asn Gln Phe Tyr Gln Lys Phe Pro Gln Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Tyr Leu Tyr Gln  
20

<210> 42  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<400> 42

Gln Tyr Leu Gln Tyr Leu Tyr Gln Gly Pro Ile Val Leu Asn Pro Trp  
1 5 10 15

Asp Gln Val Lys  
20

<210> 43  
<211> 20  
<212> PRT

## Listado de Secuencias

<213> Bos taurus

<400> 43

Pro Ile Val Leu Asn Pro Trp Asp Gln Val Lys Arg Asn Ala Val Pro  
1 5 10 15

Ile Thr Pro Thr  
20

<210> 44

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 44

Thr Lys Lys Thr Lys Leu Thr Glu Glu Glu Lys Asn Arg Leu Asn Phe  
1 5 10 15

Leu Lys Lys Ile  
20

## Listado de Secuencias

<210> 45

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 45

Thr Glu Glu Glu Lys Asn Arg Leu Asn Phe Leu Lys Lys Ile Ser Gln  
1 5 10 15

Arg Tyr Gln Lys  
20

<210> 46

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 46

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

## Listado de Secuencias

Ser Ser Ser Glu  
20

<210> 47  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<400> 47

Asp Glu Leu Gln Asp Lys Ile His Pro Phe Ala Gln Thr Gln Ser Leu  
1 5 10 15

Val Tyr Pro Phe  
20

<210> 48  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<400> 48

## Listado de Secuencias

Asn Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr Pro Val Val Val Pro Pro Phe Leu  
1 5 10 15

Gln Pro Glu Val  
20

<210> 49  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<400> 49

Val Val Val Pro Pro Phe Leu Gln Pro Glu Val Met Gly Val Ser Lys  
1 5 10 15

Val Lys Glu Ala  
20

<210> 50  
<211> 20

## Listado de Secuencias

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 50

Gly Val Ser Lys Val Lys Glu Ala Met Ala Pro Lys His Lys Glu Met  
1 5 10 15

Pro Phe Pro Lys  
20

<210> 51

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 51

Glu Ala Met Ala Pro Lys His Lys Glu Met Pro Phe Pro Lys Tyr Pro  
1 5 10 15

Val Glu Pro Phe  
20

## Listado de Secuencias

<210> 52

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 52

His Lys Glu Met Pro Phe Pro Lys Tyr Pro Val Glu Pro Phe Thr Glu  
1 5 10 15

Ser Gln Ser Leu  
20

<210> 53

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 53

Leu Thr Asp Val Glu Asn Leu His Leu Pro Leu Pro Leu Leu Gln Ser  
1 5 10 15

## Listado de Secuencias

Trp Met His Gln  
20

<210> 54  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<400> 54

Leu His Leu Pro Leu Pro Leu Leu Gln Ser Trp Met His Gln Pro His  
1 5 10 15

Gln Pro Leu Pro  
20

<210> 55  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

## Listado de Secuencias

<400> 55

Leu Leu Gln Ser Trp Met His Gln Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr  
1 5 10 15

Val Met Phe Pro  
20

<210> 56

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 56

Ser Trp Met His Gln Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr Val Met Phe  
1 5 10 15

Pro Pro Gln Ser  
20

<210> 57

## Listado de Secuencias

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 57

Leu Pro Pro Thr Val Met Phe Pro Pro Gln Ser Val Leu Ser Leu Ser  
1 5 10 15

Gln Ser Lys Val  
20

<210> 58

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 58

Phe Pro Pro Gln Ser Val Leu Ser Leu Ser Gln Ser Lys Val Leu Pro  
1 5 10 15

Val Pro Gln Lys

## Listado de Secuencias

20

<210> 59

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 59

Gln Ser Val Leu Ser Leu Ser Gln Ser Lys Val Leu Pro Val Pro Gln  
1                    5                    10                    15

Lys Ala Val Pro  
20

<210> 60

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 60

Ser Gln Ser Lys Val Leu Pro Val Pro Gln Lys Ala Val Pro Tyr Pro

## Listado de Secuencias

1                      5                      10                      15

Gln Arg Asp Met  
20

<210> 61  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<400> 61

Gln Lys Ala Val Pro Tyr Pro Gln Arg Asp Met Pro Ile Gln Ala Phe  
1                      5                      10                      15

Leu Leu Tyr Gln  
20

<210> 62  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

## Listado de Secuencias

<400> 62

Pro Gln Arg Asp Met Pro Ile Gln Ala Phe Leu Leu Tyr Gln Glu Pro  
1 5 10 15

Val Leu Gly Pro  
20

<210> 63

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 63

Phe Leu Leu Tyr Gln Glu Pro Val Leu Gly Pro Val Arg Gly Pro Phe  
1 5 10 15

Pro Ile Ile Val  
20

## Listado de Secuencias

<210> 64

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 64

Gln Pro Ile Arg Cys Glu Lys Asp Glu Arg Phe Phe Ser Asp Lys Ile  
1 5 10 15

Ala Lys Tyr Ile  
20

<210> 65

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 65

Lys Asp Glu Arg Phe Phe Ser Asp Lys Ile Ala Lys Tyr Ile Pro Ile  
1 5 10 15

## Listado de Secuencias

Gln Tyr Val Leu  
20

<210> 66  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<400> 66

Ser Asp Lys Ile Ala Lys Tyr Ile Pro Ile Gln Tyr Val Leu Ser Arg  
1 5 10 15

Tyr Pro Ser Tyr  
20

<210> 67  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<400> 67

## Listado de Secuencias

Ile Ala Lys Tyr Ile Pro Ile Gln Tyr Val Leu Ser Arg Tyr Pro Ser  
1 5 10 15

Tyr Gly Leu Asn  
20

<210> 68  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<400> 68

Ala Leu Ile Asn Asn Gln Phe Leu Pro Tyr Pro Tyr Tyr Ala Lys Pro  
1 5 10 15

Ala Ala Val Arg  
20

<210> 69  
<211> 20  
<212> PRT

## Listado de Secuencias

<213> Bos taurus

<400> 69

Asn Asn Gln Phe Leu Pro Tyr Pro Tyr Tyr Ala Lys Pro Ala Ala Val  
1 5 10 15

Arg Ser Pro Ala  
20

<210> 70

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 70

Ala Gly Thr Trp Tyr Ser Leu Ala Met Ala Ala Ser Asp Ile Ser Leu  
1 5 10 15

Leu Asp Ala Gln  
20

## Listado de Secuencias

<210> 71  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<400> 71

Arg Thr Pro Glu Val Asp Asp Glu Ala Leu Glu Lys Phe Asp Lys Ala  
1            5                    10                    15

Leu Lys Ala Leu  
20

<210> 72  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<400> 72

Glu Val Asp Asp Glu Ala Leu Glu Lys Phe Asp Lys Ala Leu Lys Ala  
1            5                    10                    15

## Listado de Secuencias

Leu Pro Met His

20

<210> 73

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 73

Asp Glu Ala Leu Glu Lys Phe Asp Lys Ala Leu Lys Ala Leu Pro Met

1

5

10

15

His Ile Arg Leu

20

<210> 74

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 74

## Listado de Secuencias

Phe Asp Lys Ala Leu Lys Ala Leu Pro Met His Ile Arg Leu Ser Phe  
1            5            10            15

Asn Pro Thr Gln  
20

<210> 75

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 75

Ala Leu Lys Ala Leu Pro Met His Ile Arg Leu Ser Phe Asn Pro Thr  
1            5            10            15

Gln Leu Glu Glu  
20

**Resumen****MÉTODO PARA EL PRONÓSTICO DE LA EFICACIA DE LA INMUNOTERAPIA ORAL  
PARA EL TRATAMIENTO DE LA ALERGIA A LAS PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA**

La presente invención proporciona la solución a los problemas planteados en el estado  
de la técnica ya que proporciona un método que permite pronosticar el número de  
reacciones que se producirán durante la inmunoterapia oral (ITO) frente a las proteínas  
de la leche de vaca y/o la estimación del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar  
la tolerancia o desensibilización durante la ITO frente a las proteínas de la leche de  
vaca y/o la necesidad de pre-medicación durante la ITO en un sujeto humano.

10

15

20

25

**Figuras**

Figura 1

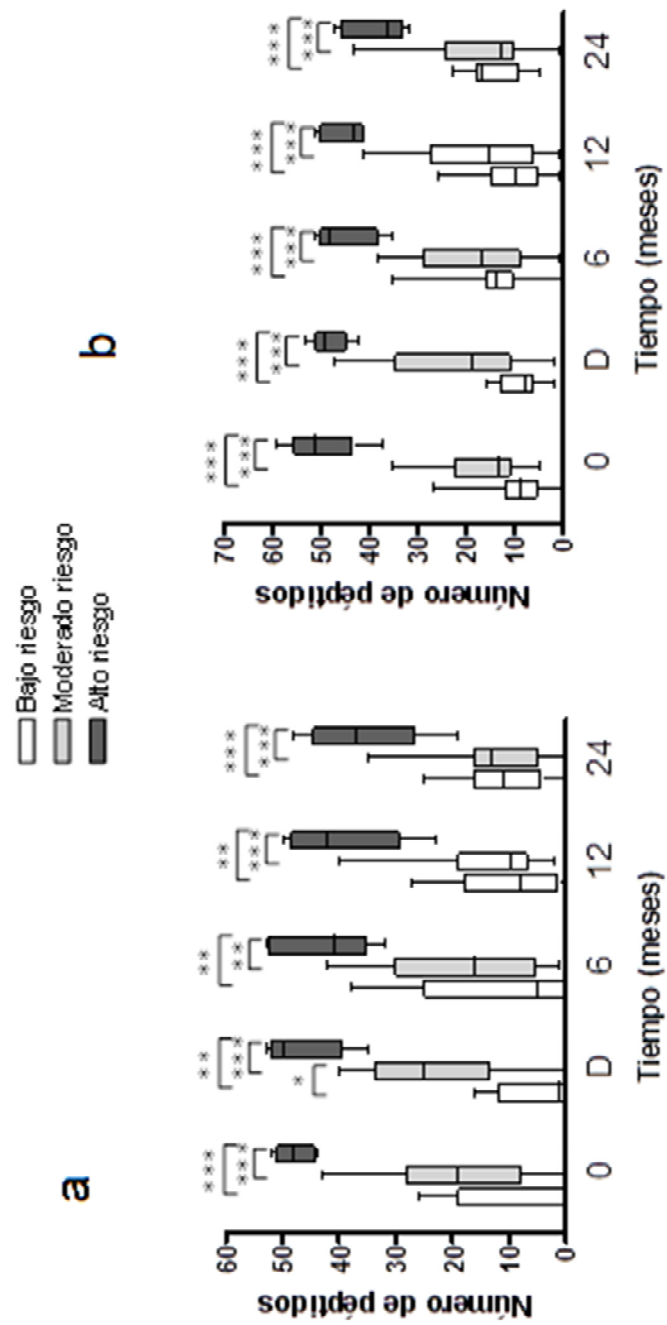


Figura 1 continuación

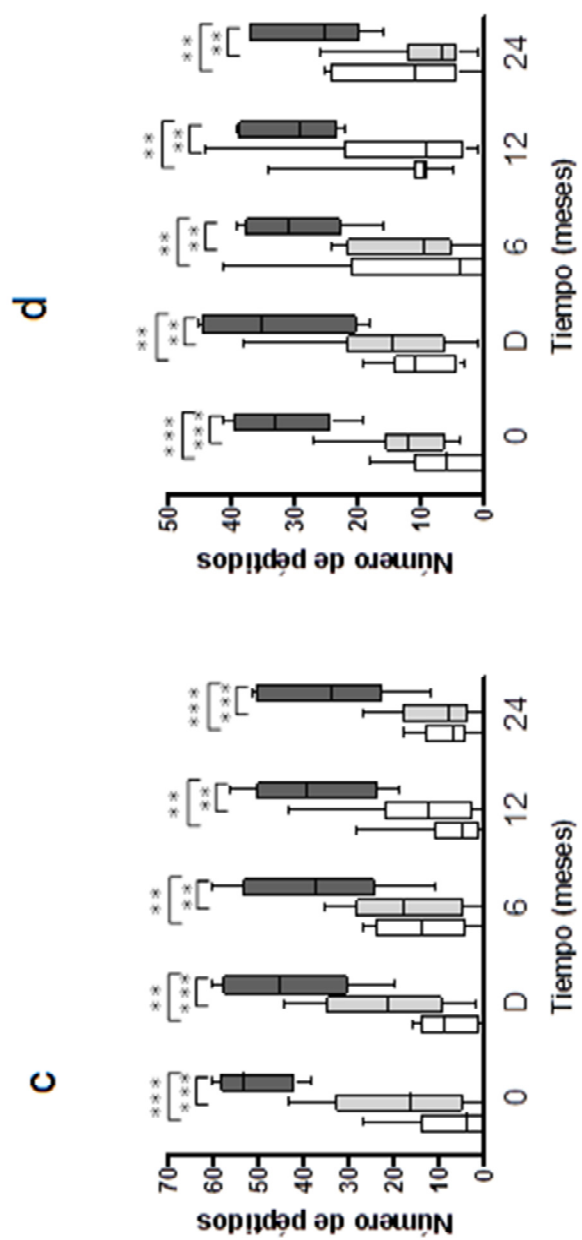


Figura 1 continuación

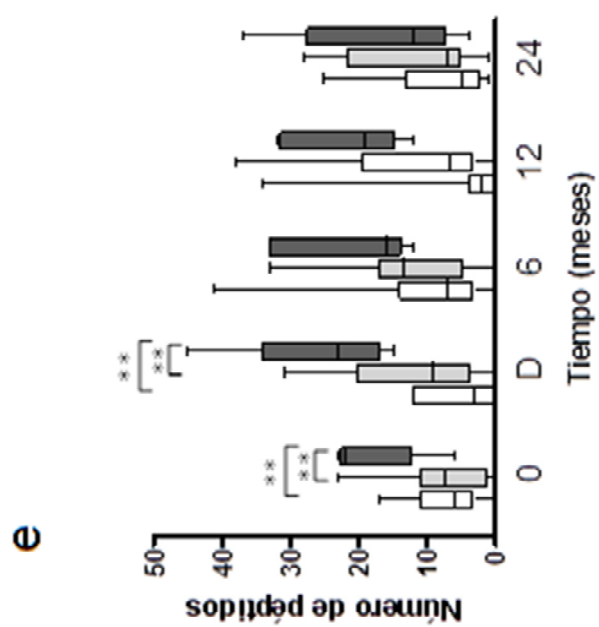


Figura 2

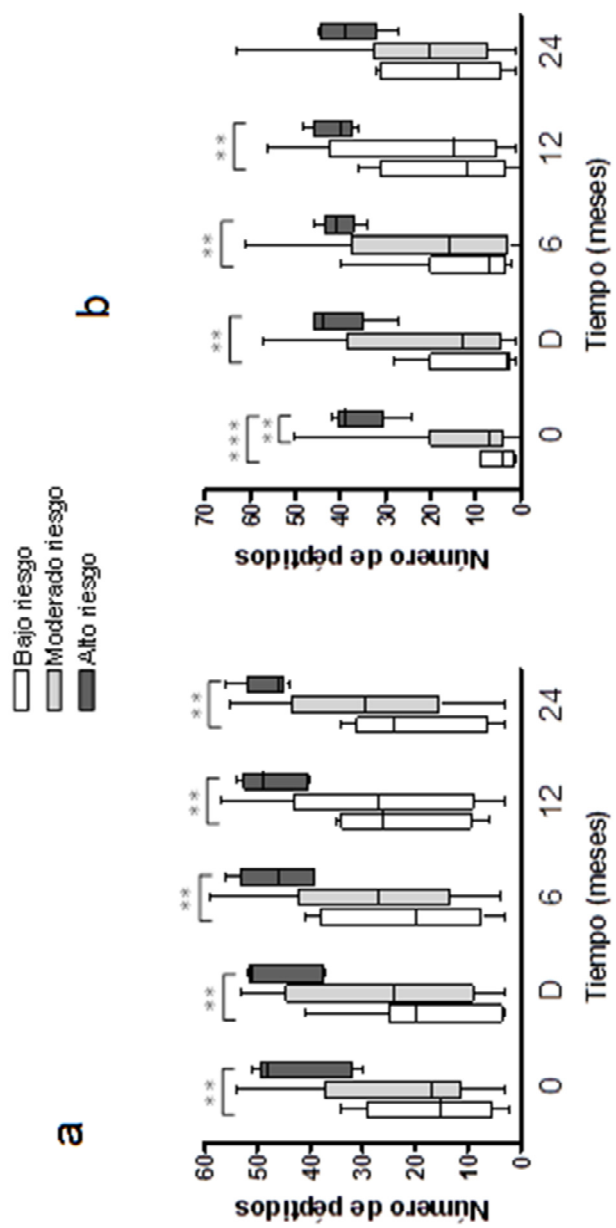


Figura 2 continuación

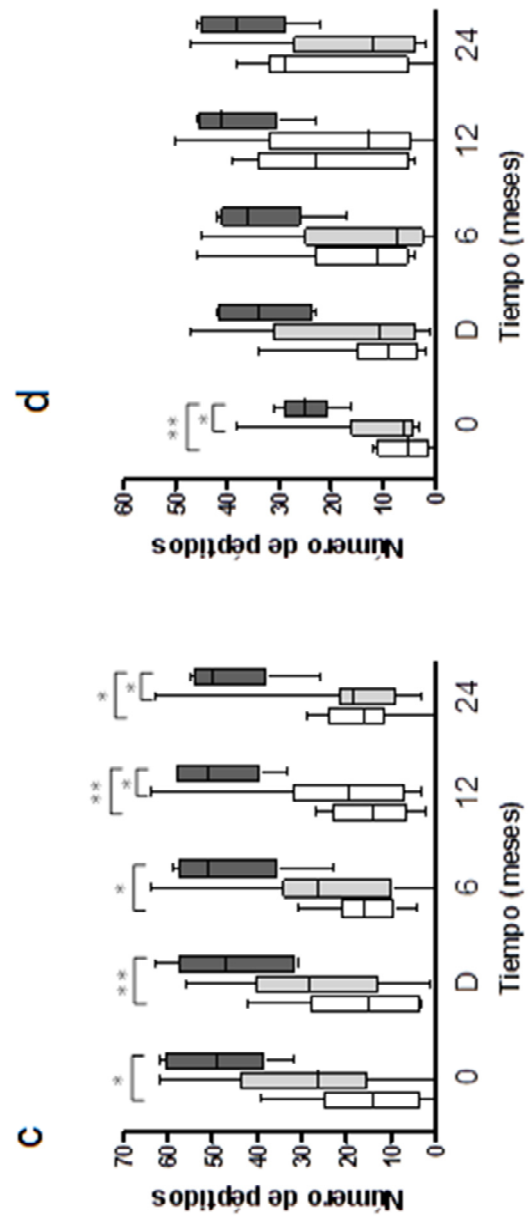


Figura 2 continuación

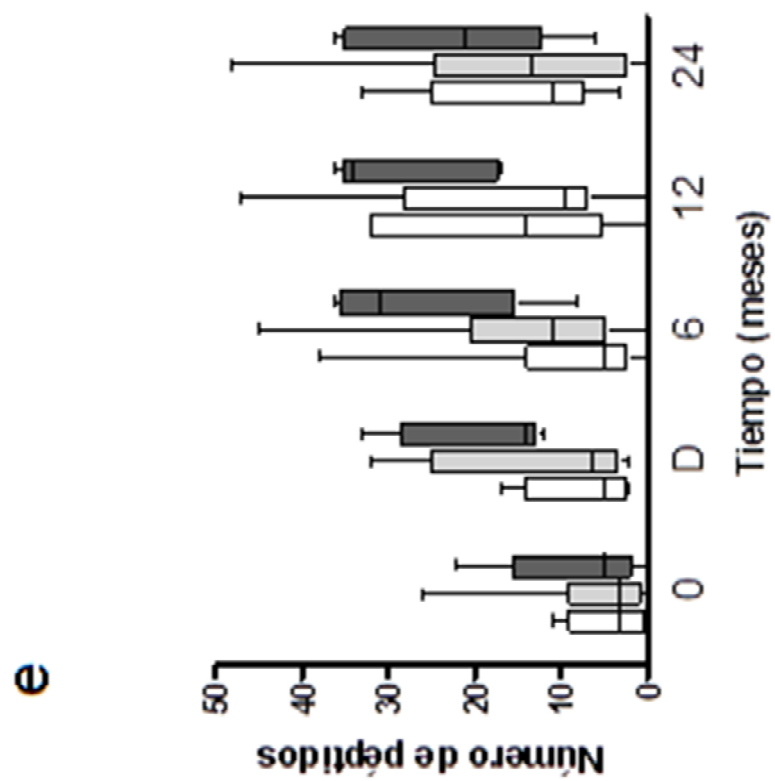


Figura 3

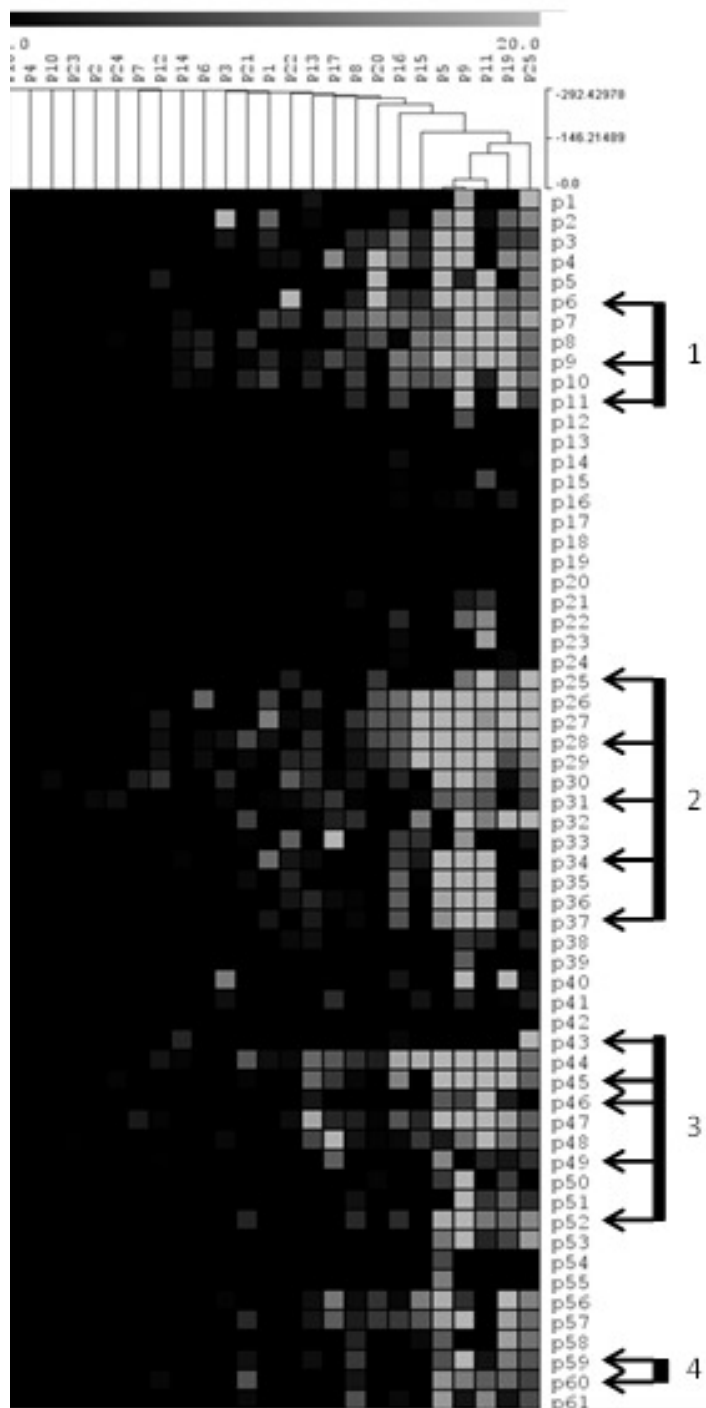
**a**

Figura 3 continuación

b

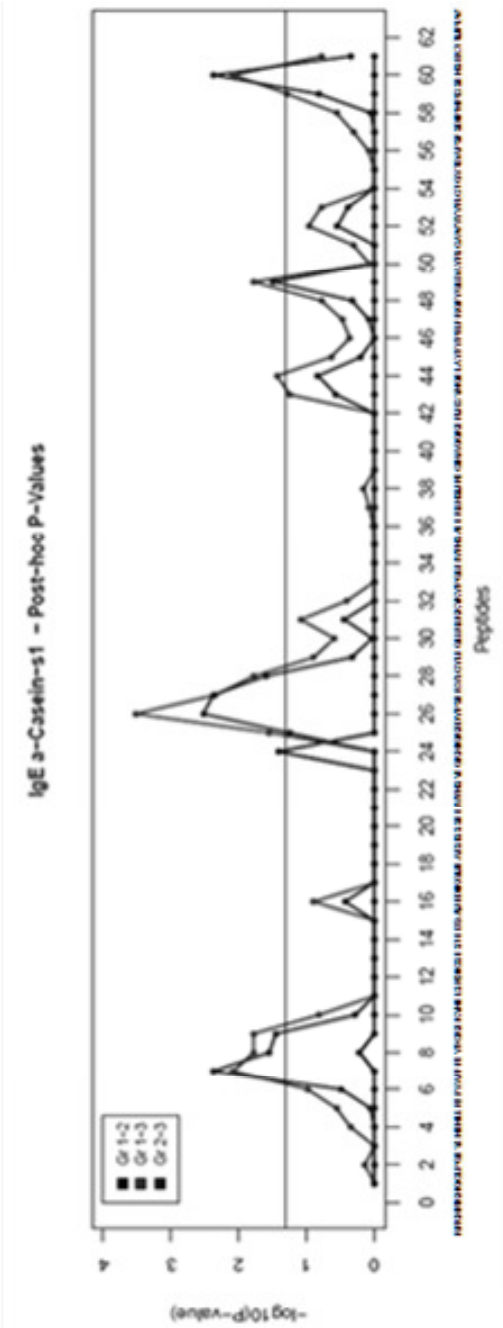


Figura 4

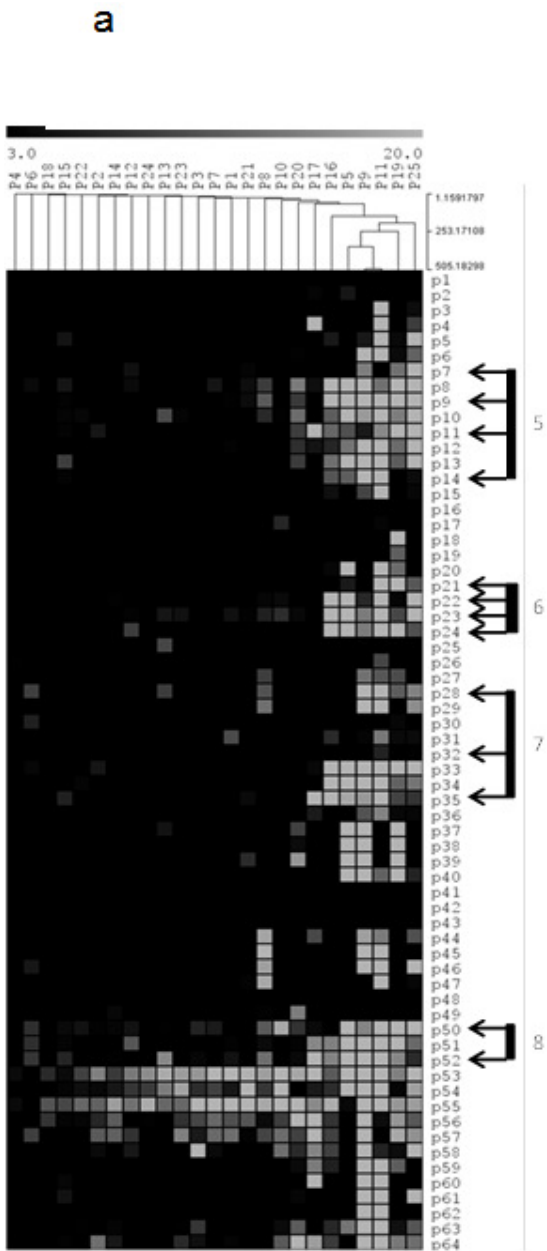


Figura 4 continuación

b

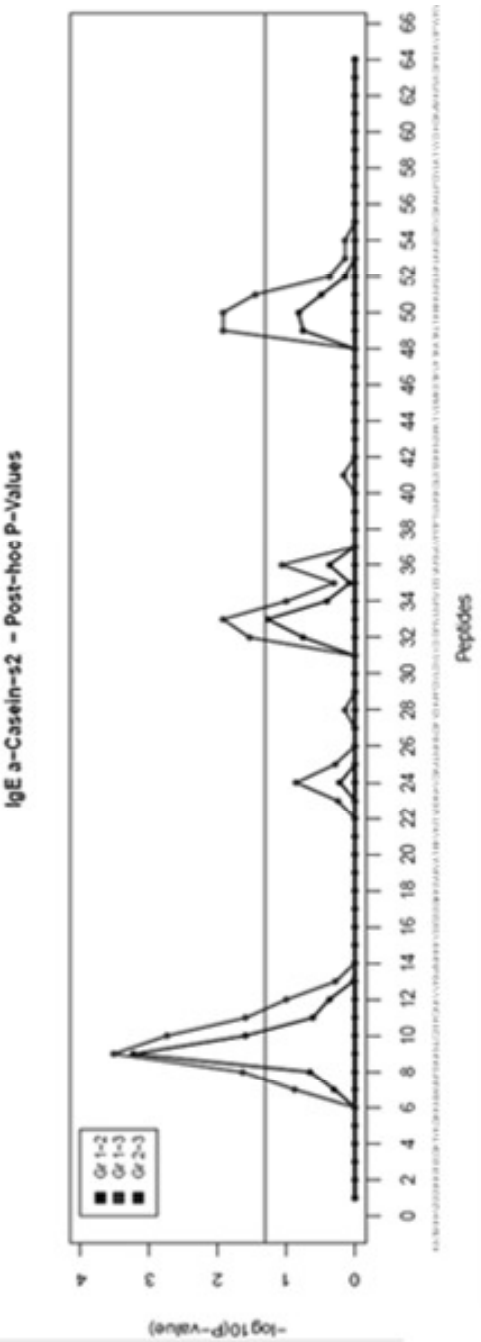


Figura 5

a

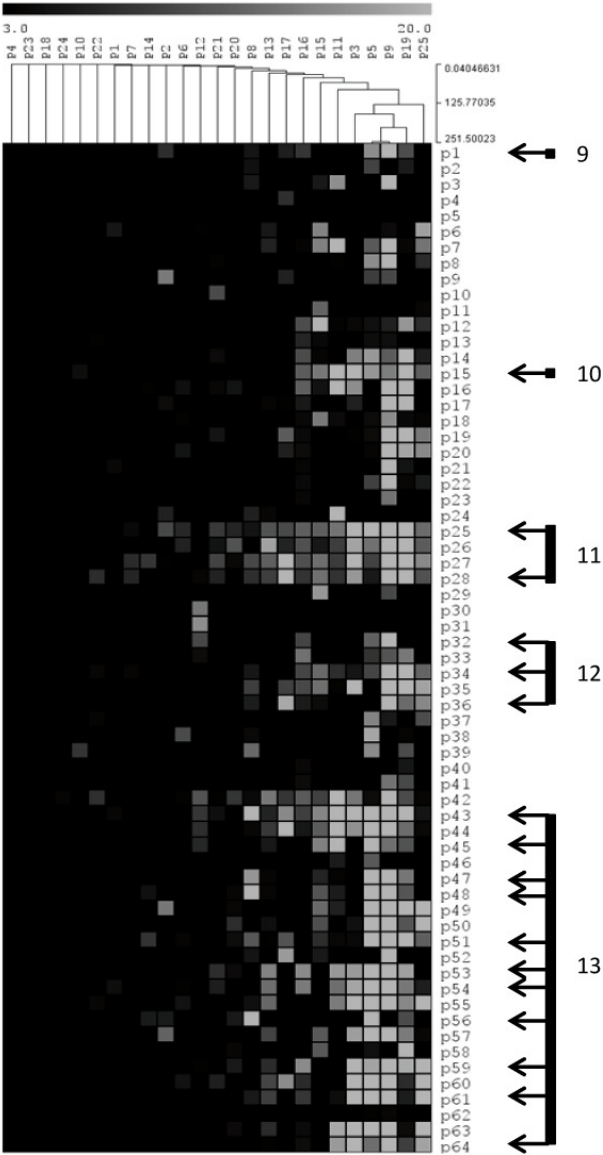


Figura 5 continuación

b

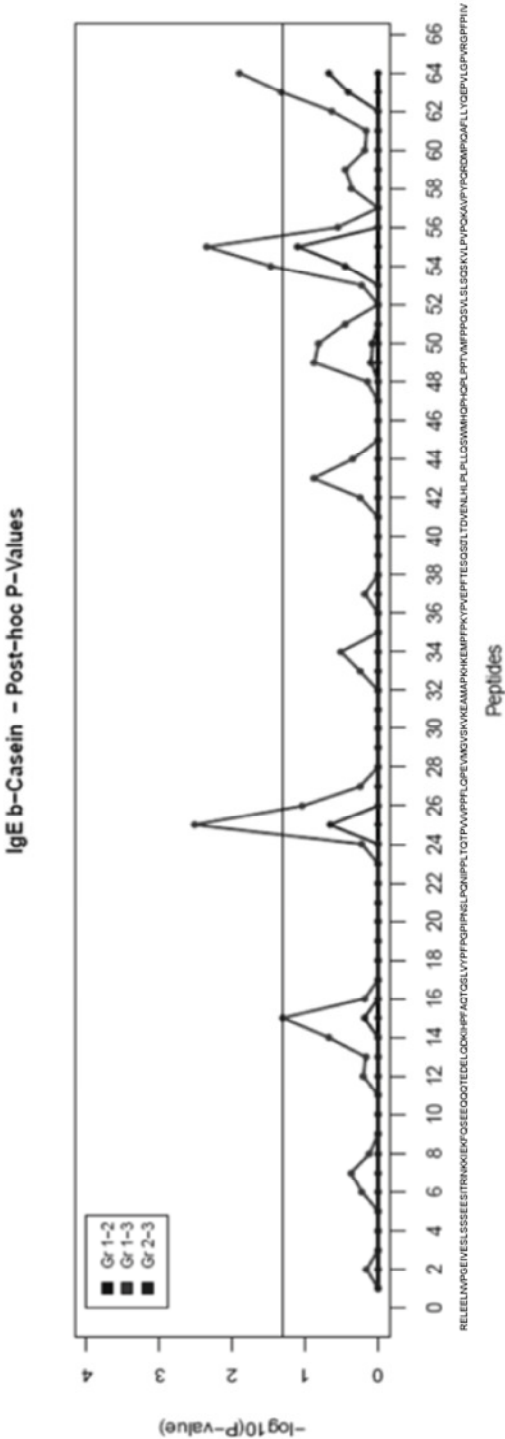


Figura 6

a

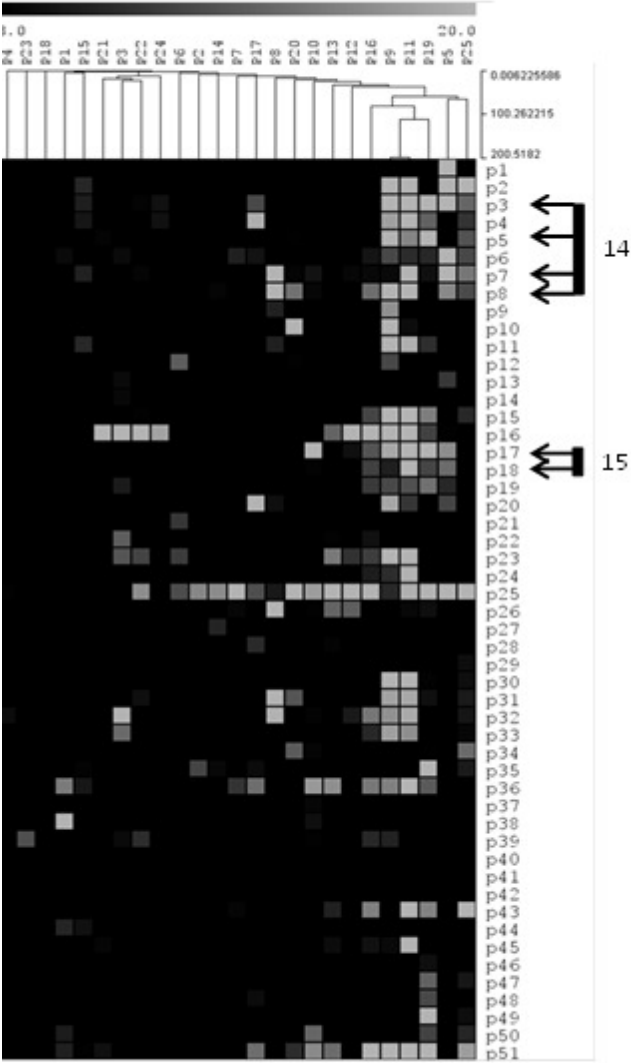


Figura 6 continuación

b

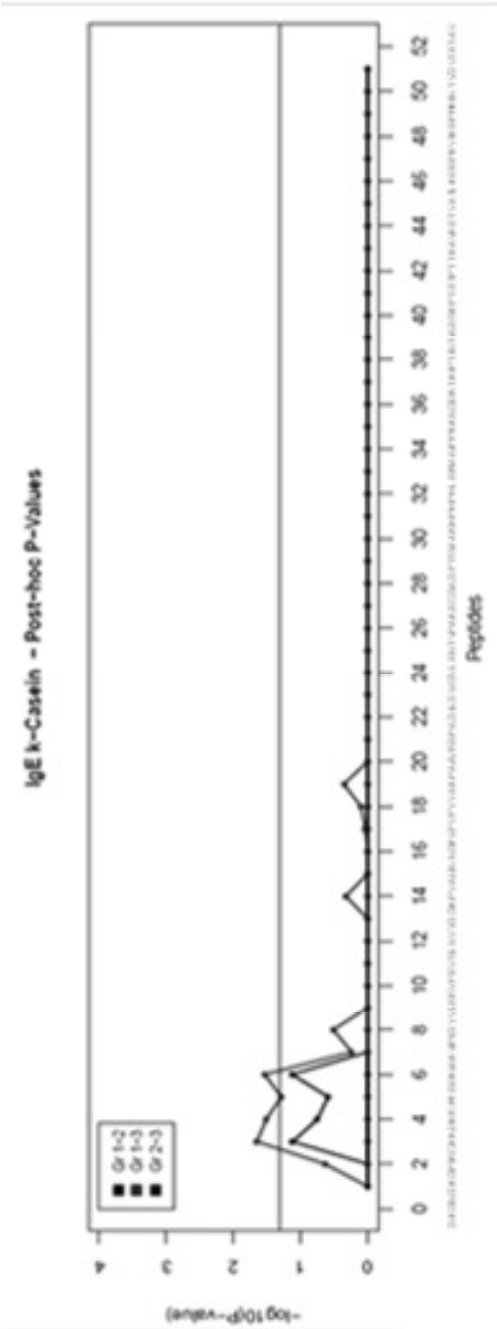
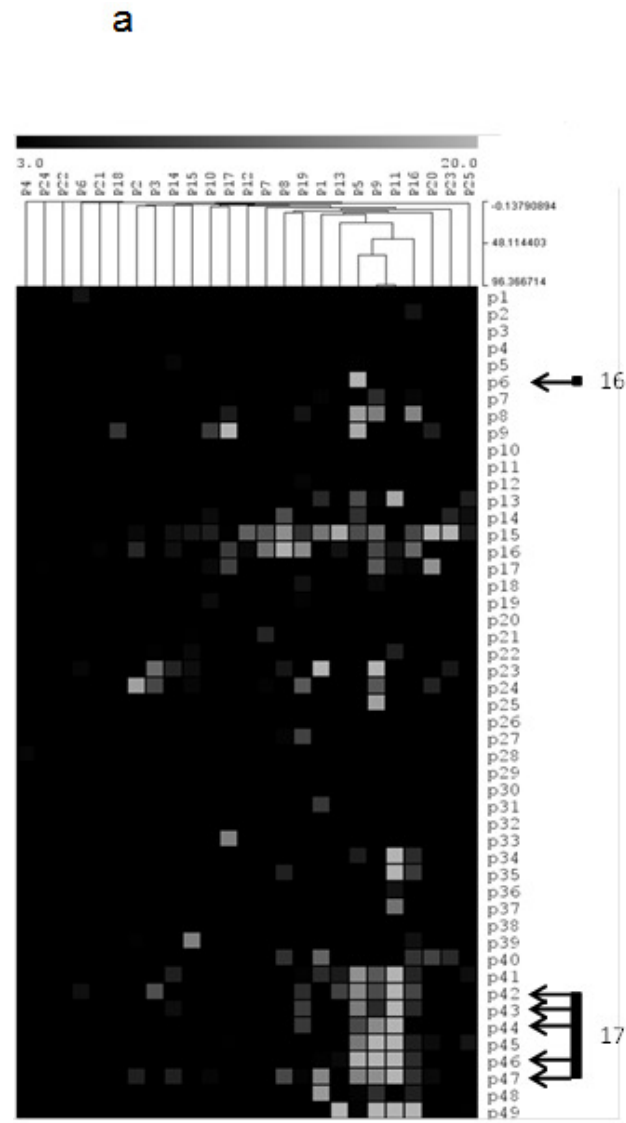


Figura 7



b

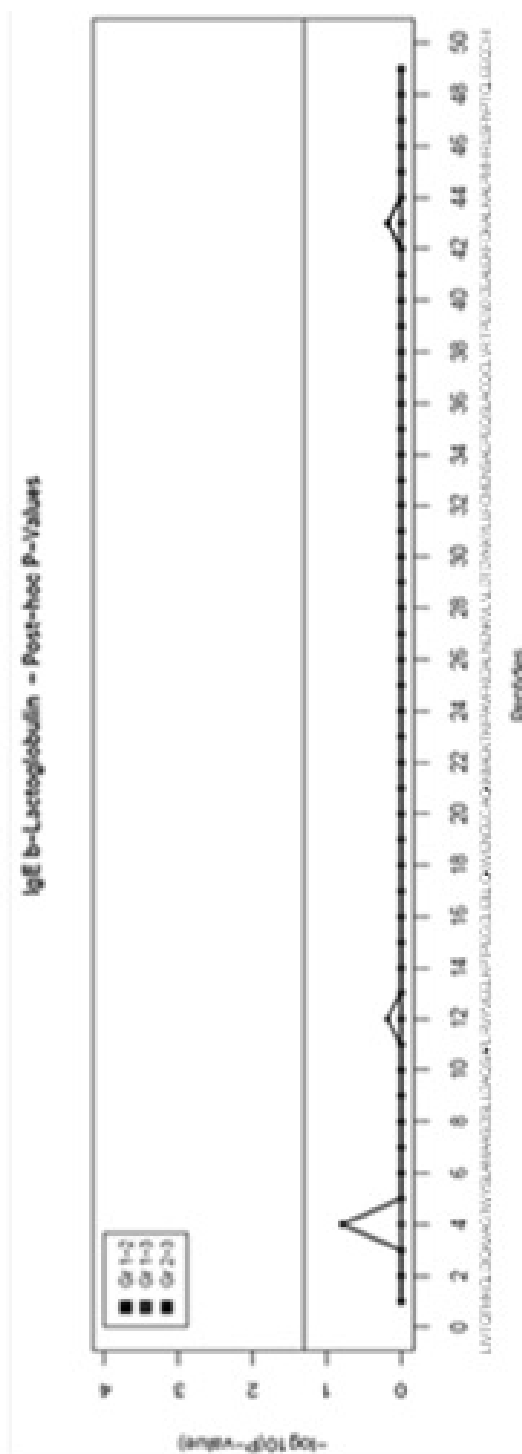


Figura 8

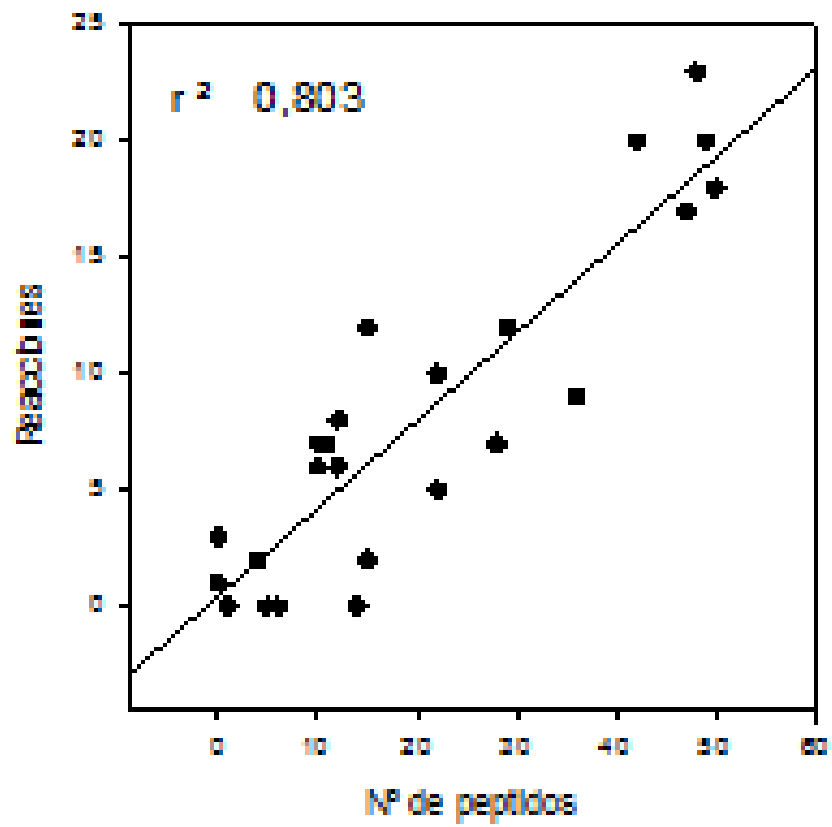
**a**

Figura 8 continuación

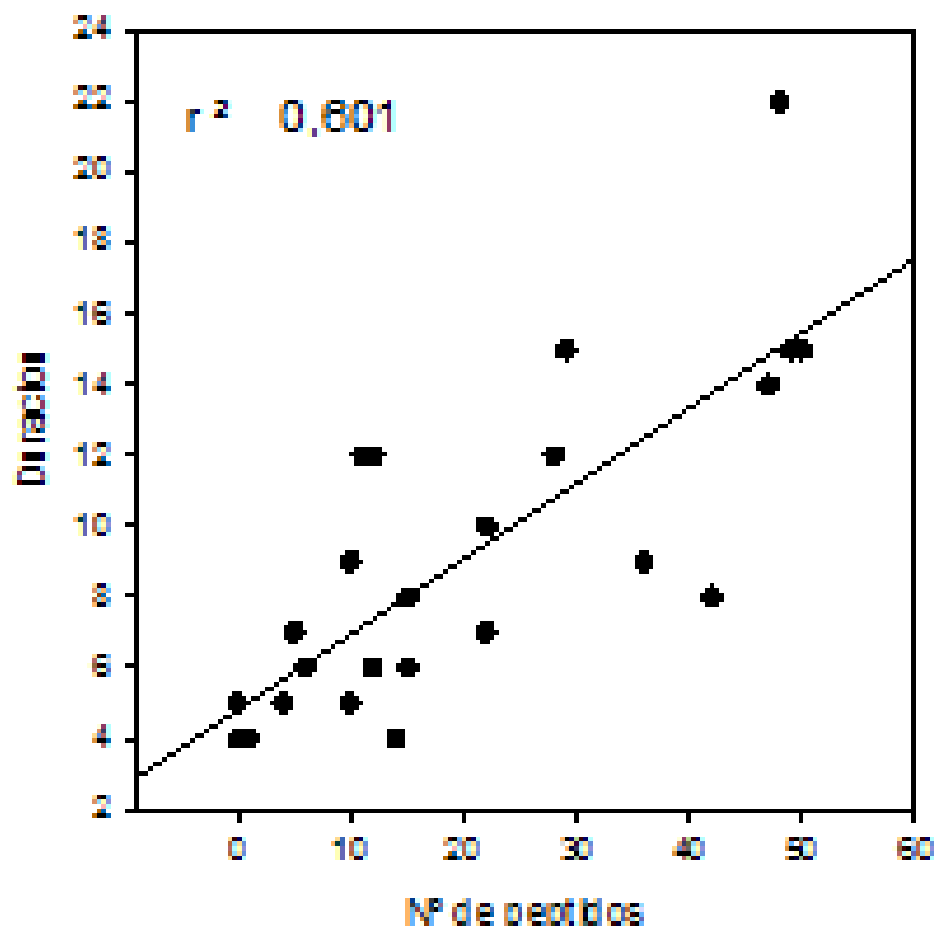
**b**

Figura 9

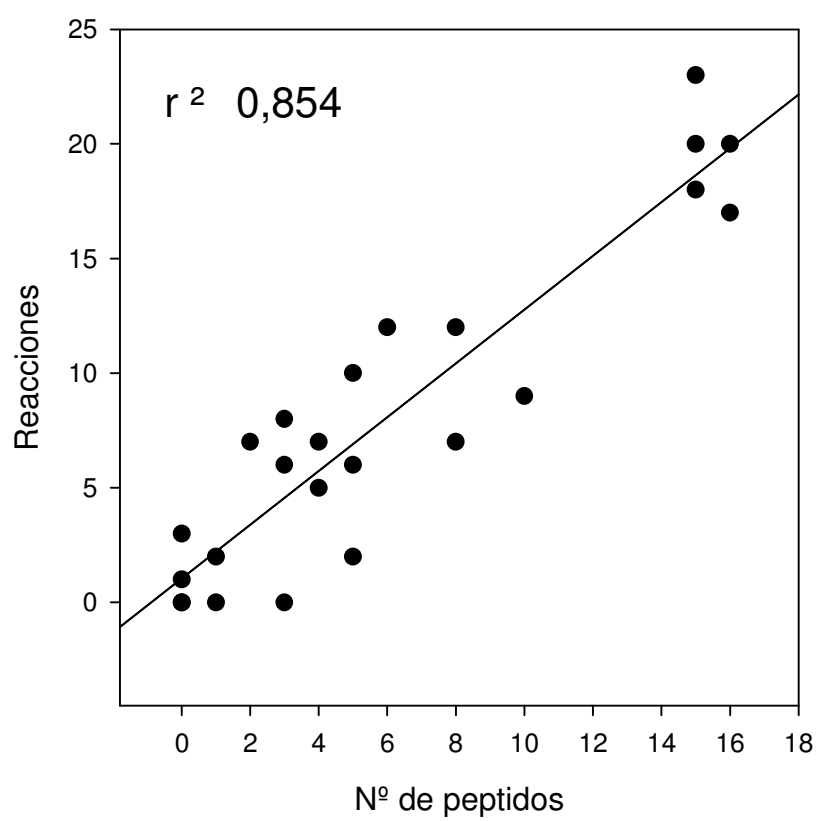
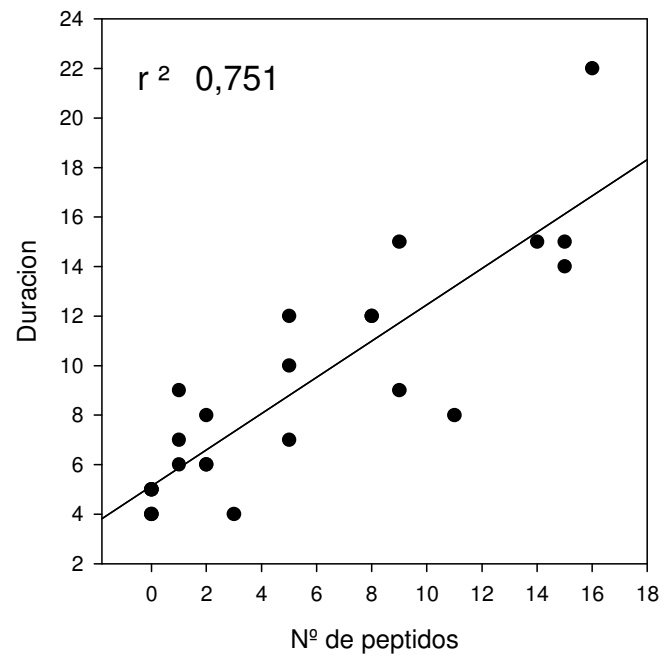


Figura 10



## Figuras

Figura 1

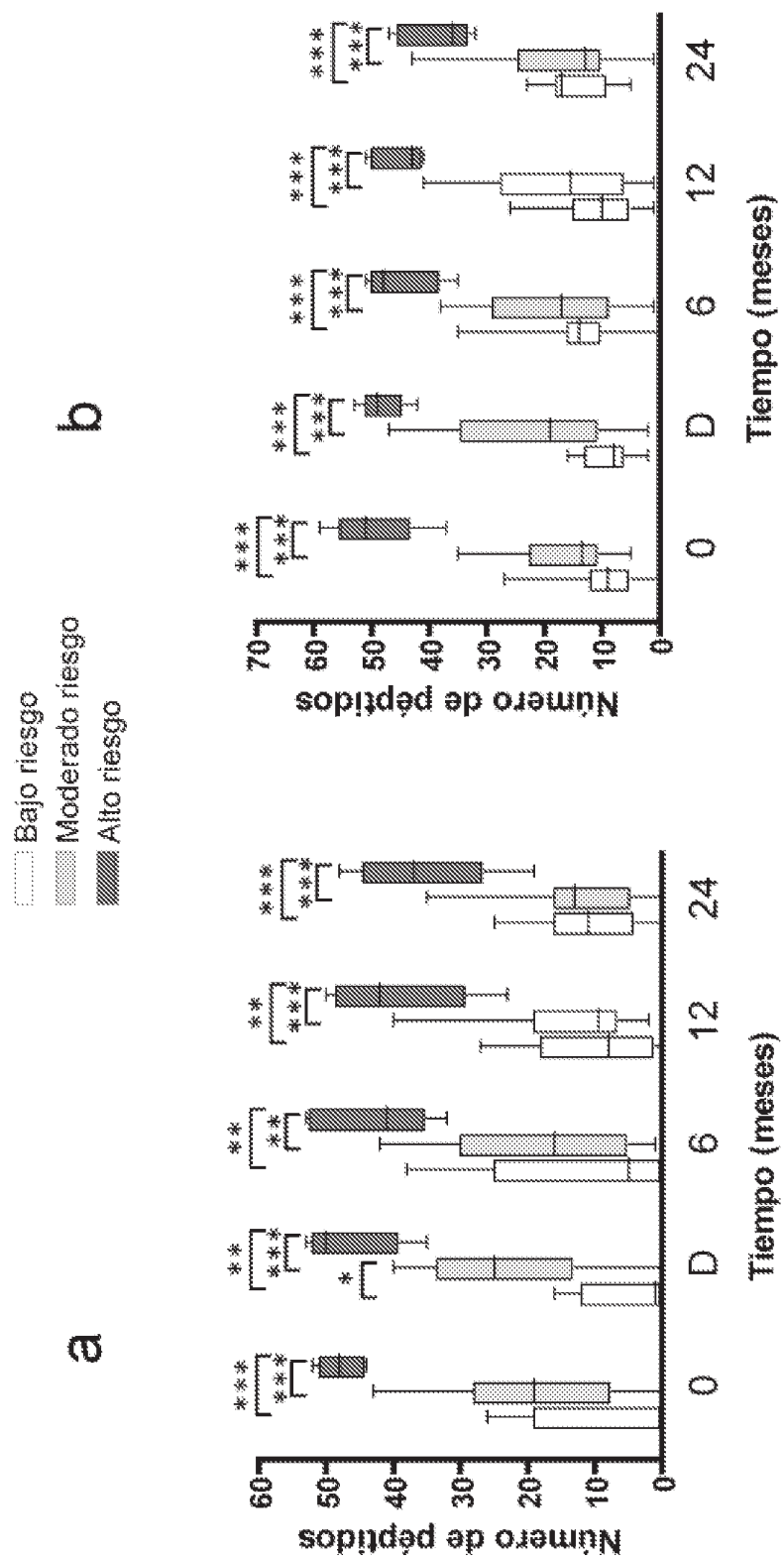


Figura 1 continuación

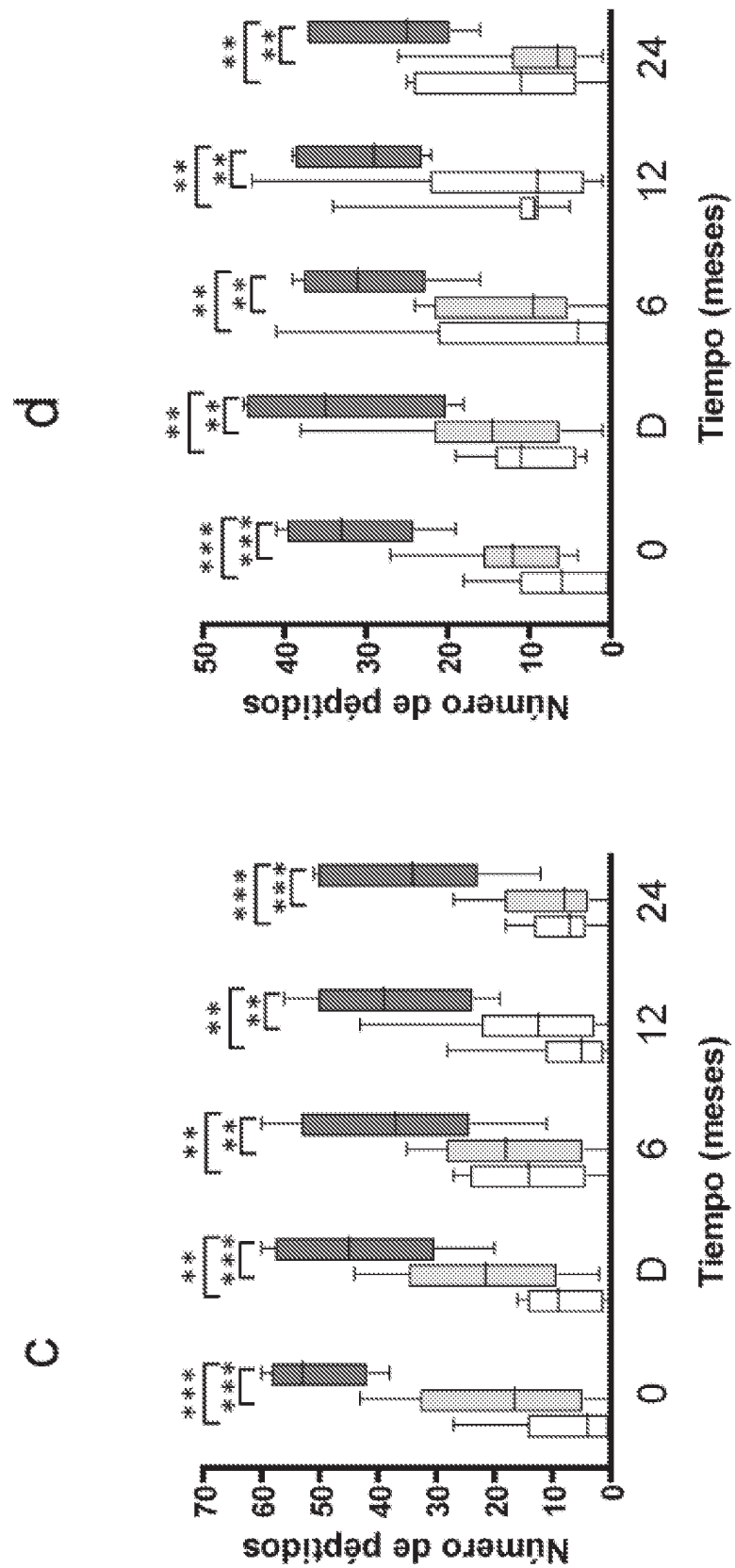


Figura 1 continuación

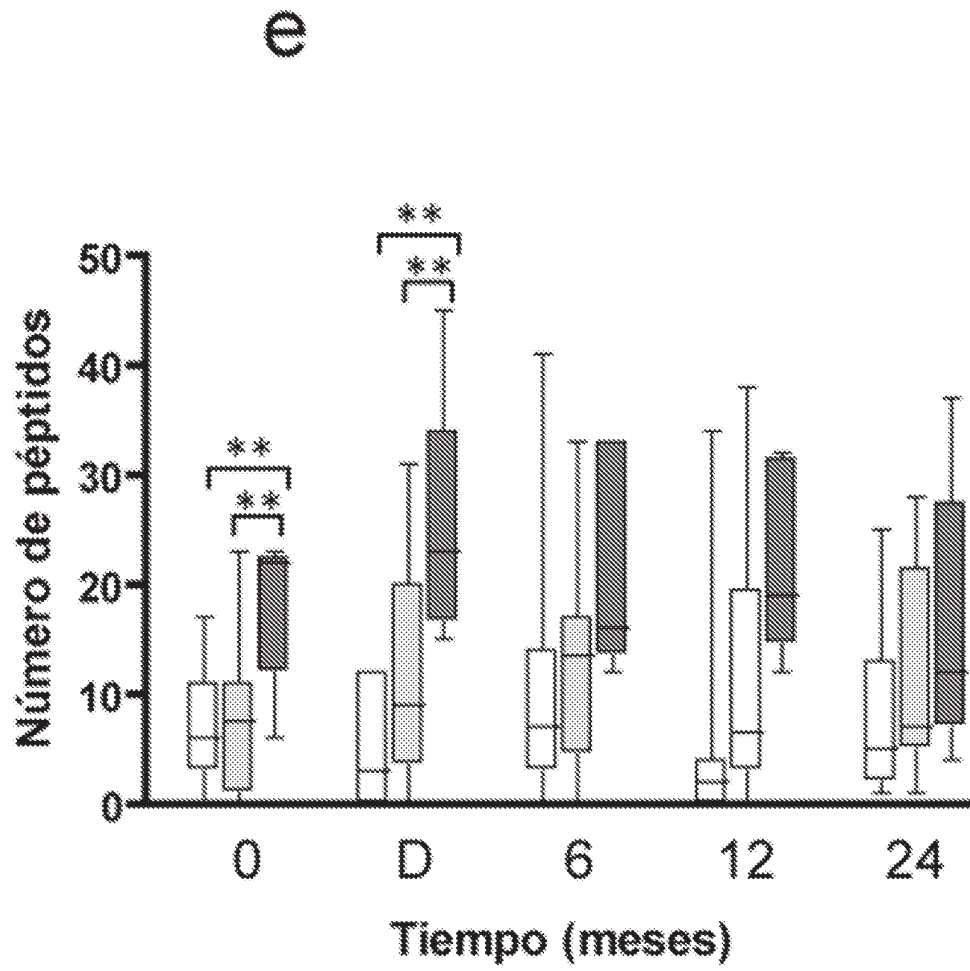


Figura 2

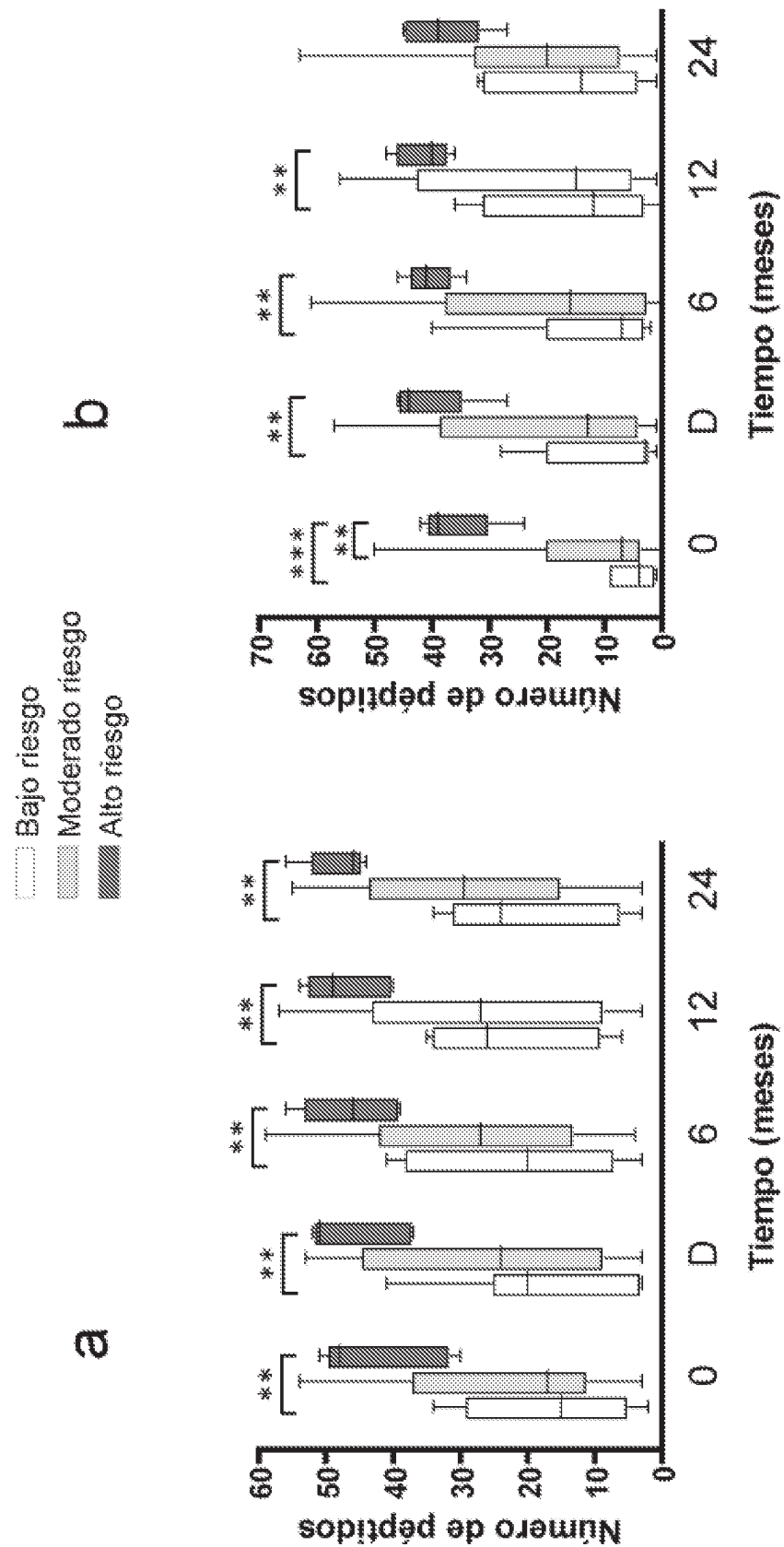
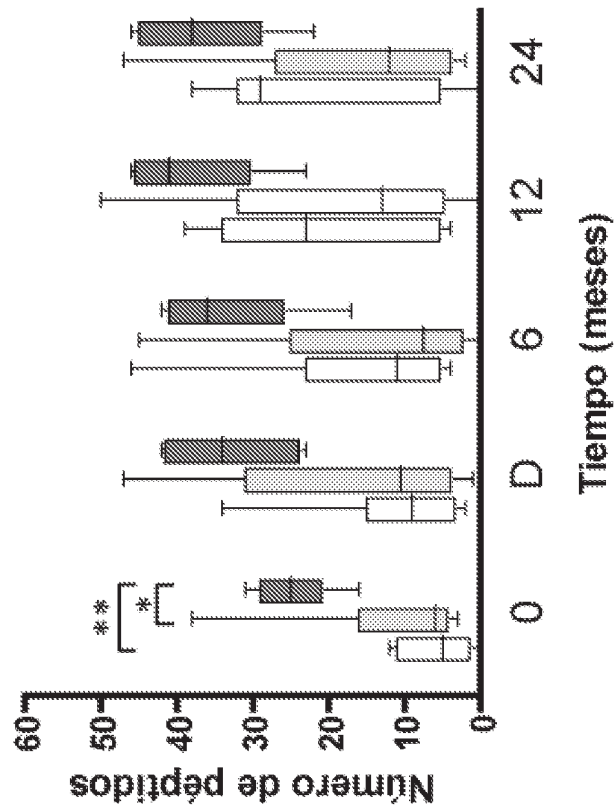


Figura 2 continuación

d



c

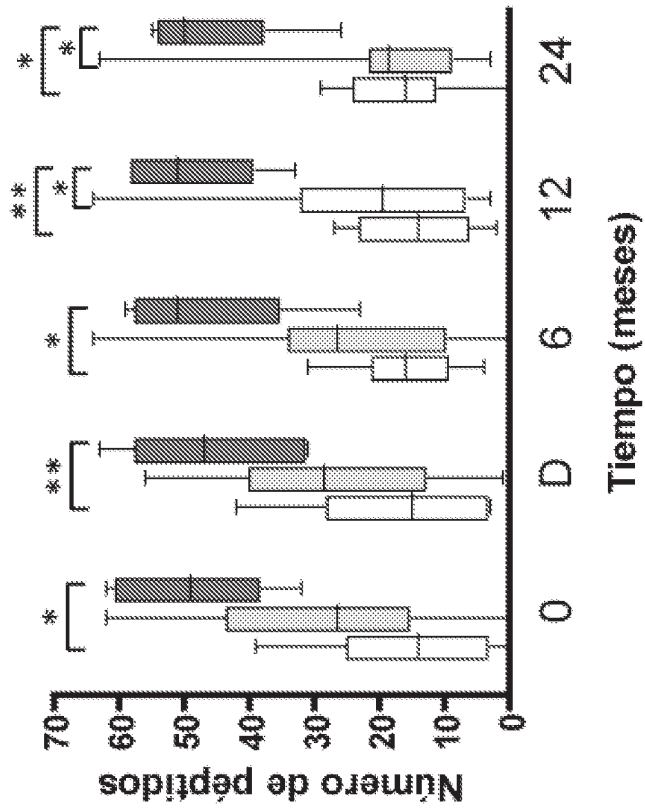


Figura 2 continuación

e

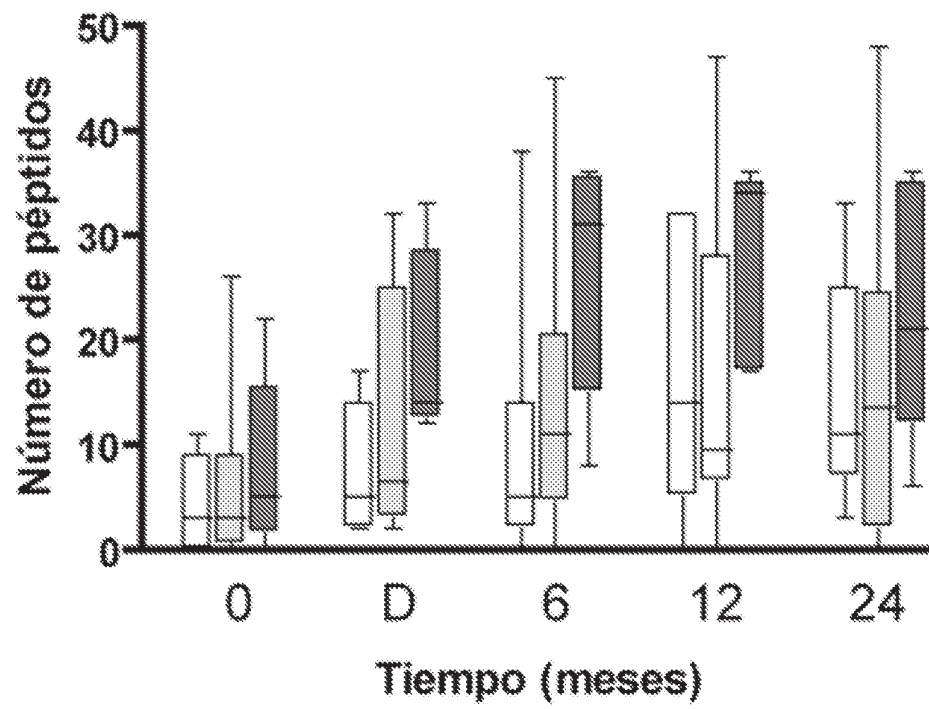


Figura 3

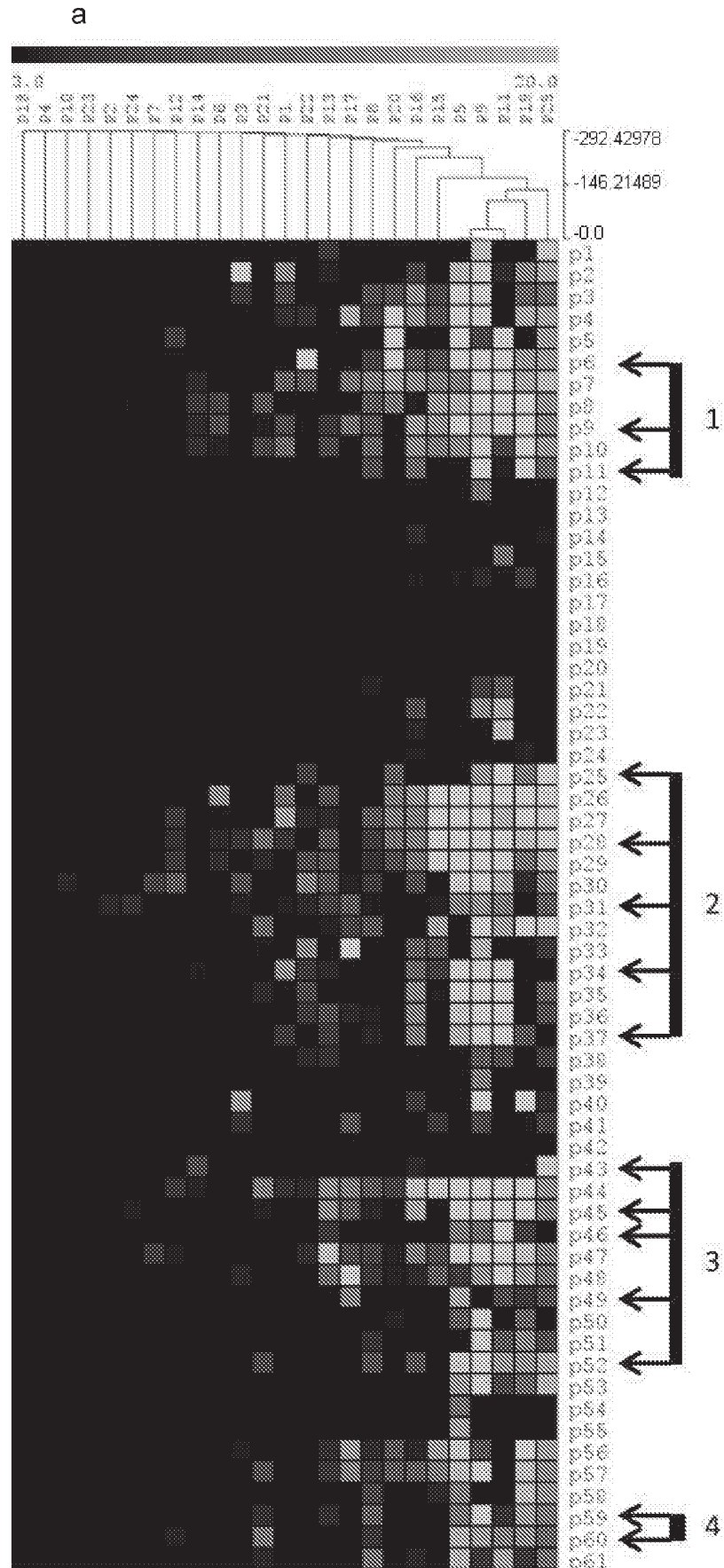


Figura 3 continuación

b

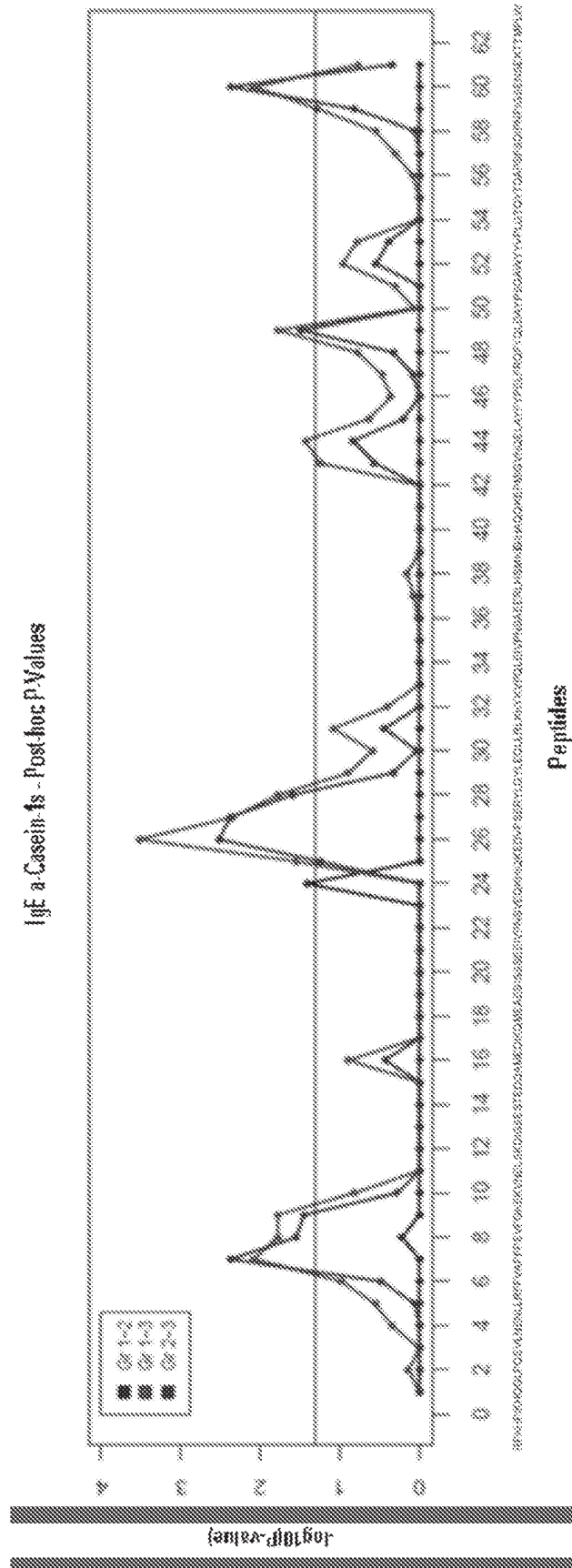


Figura 4

a

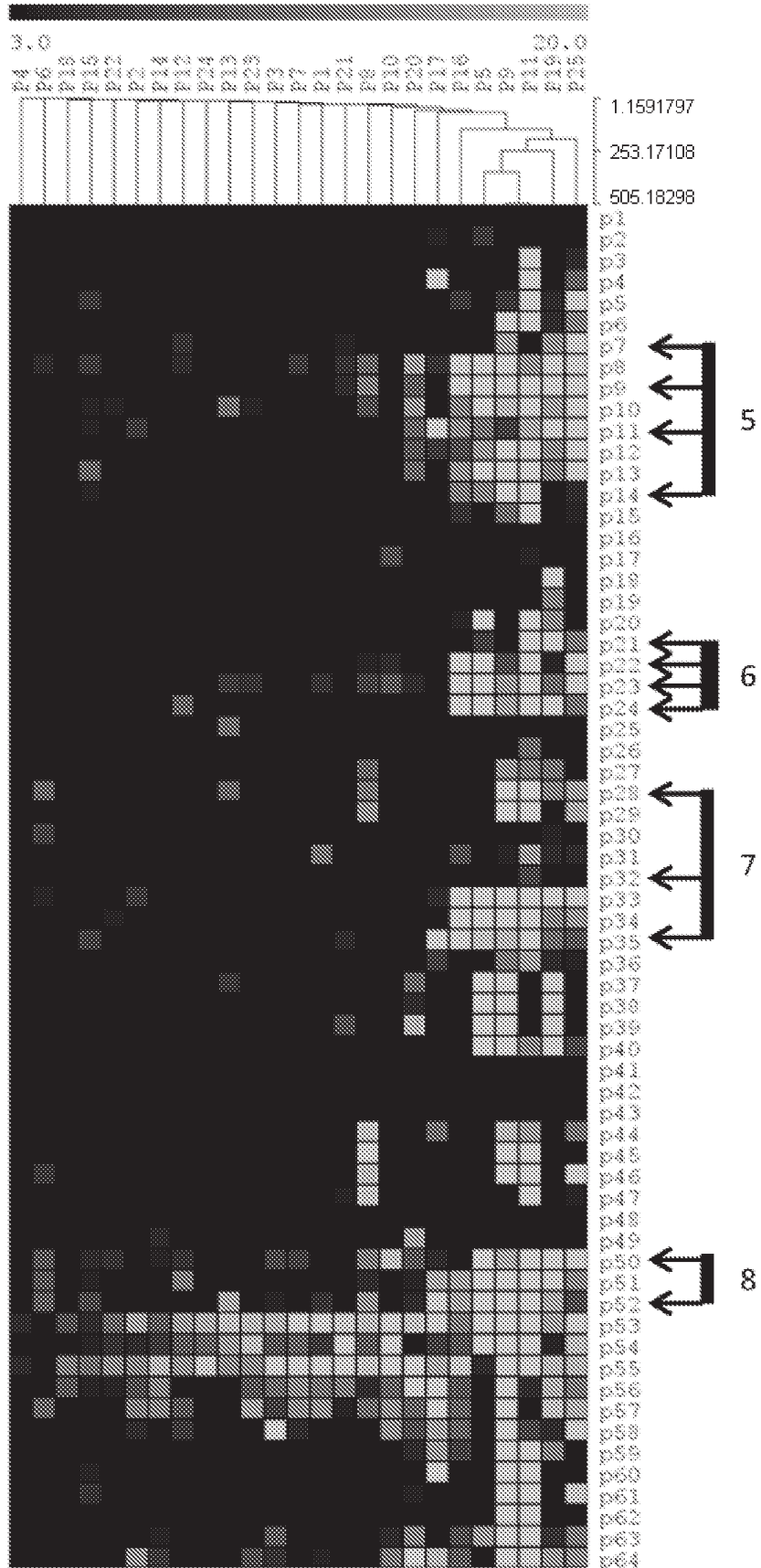


Fig. 4 continuación

b

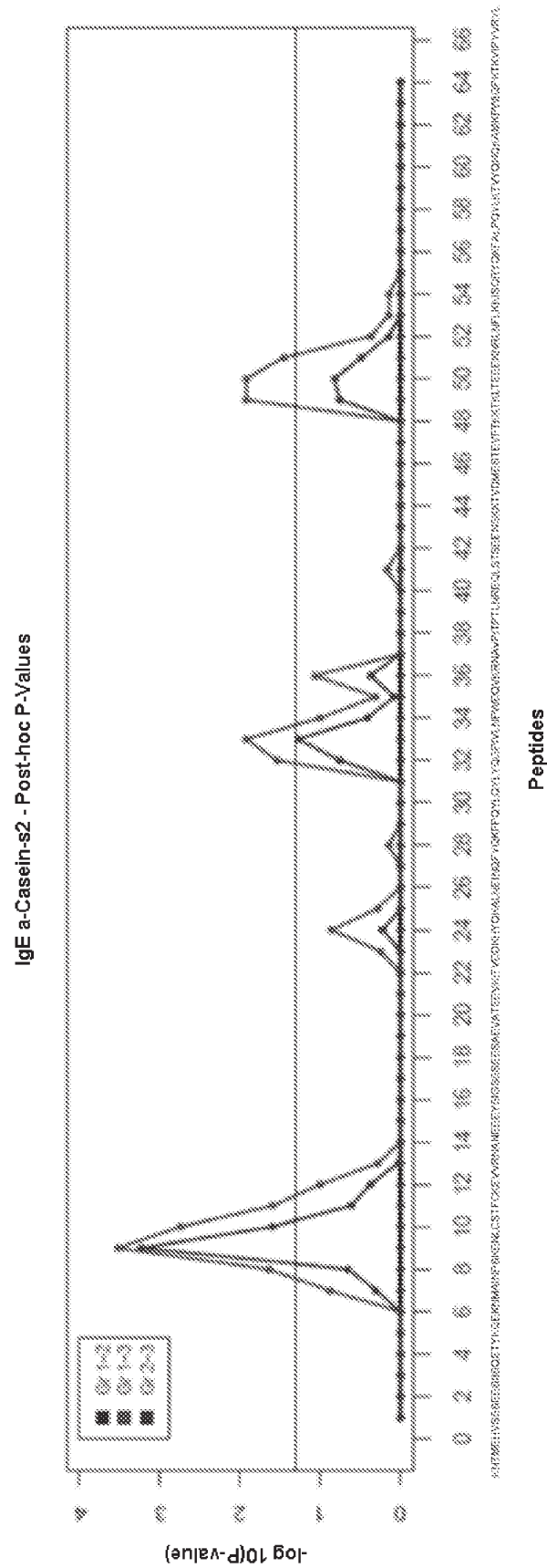


Fig. 5

a

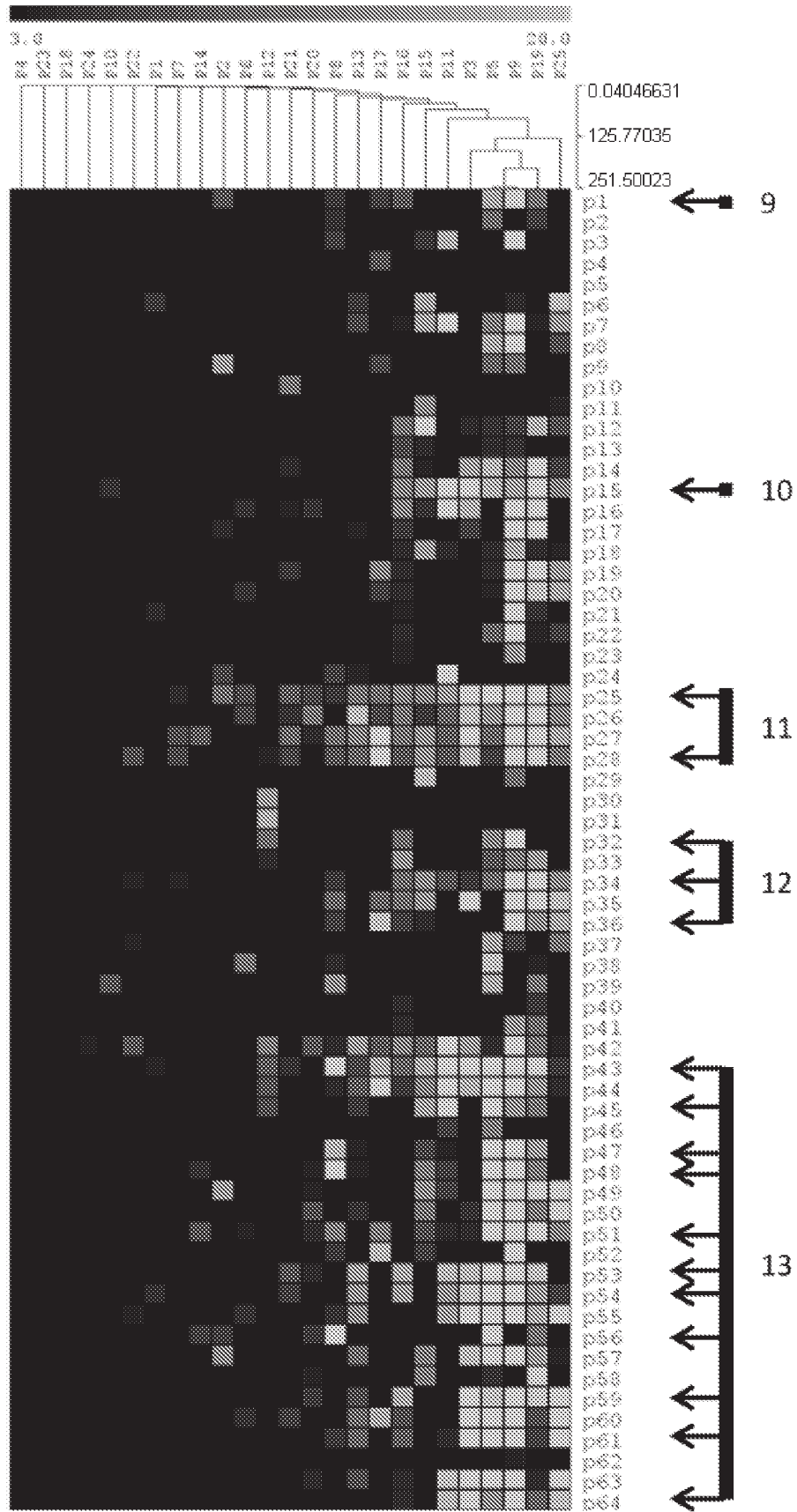


Fig. 5 continuación

b

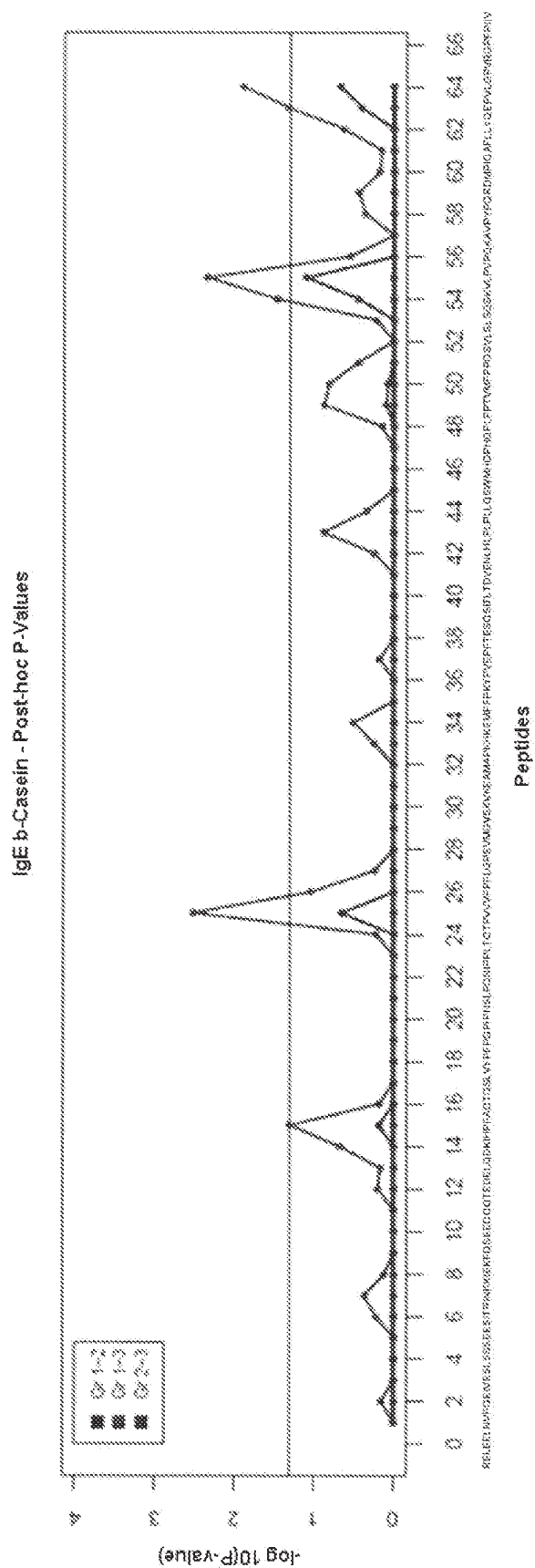


Fig.6

a

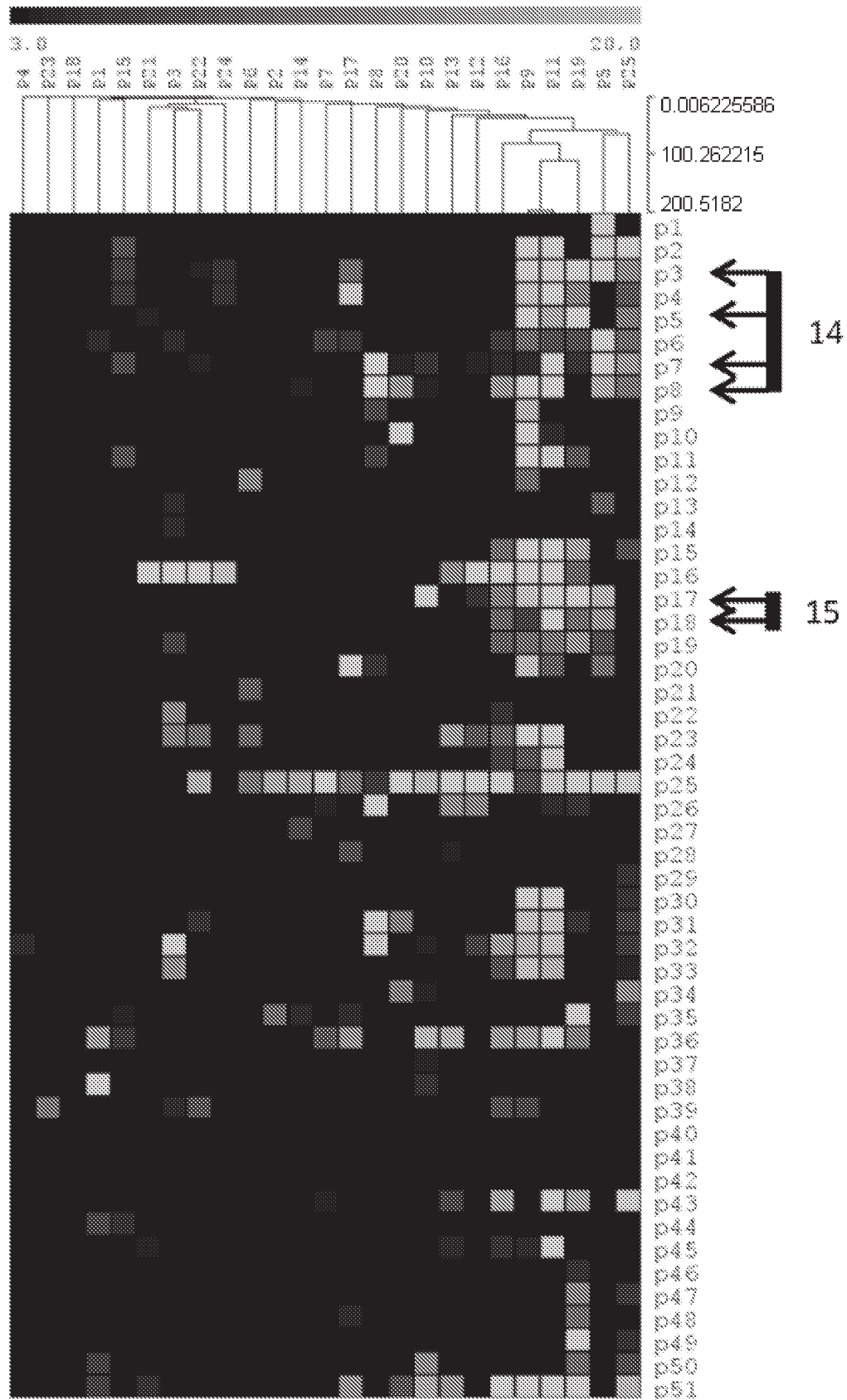


Fig. 6 continuación b

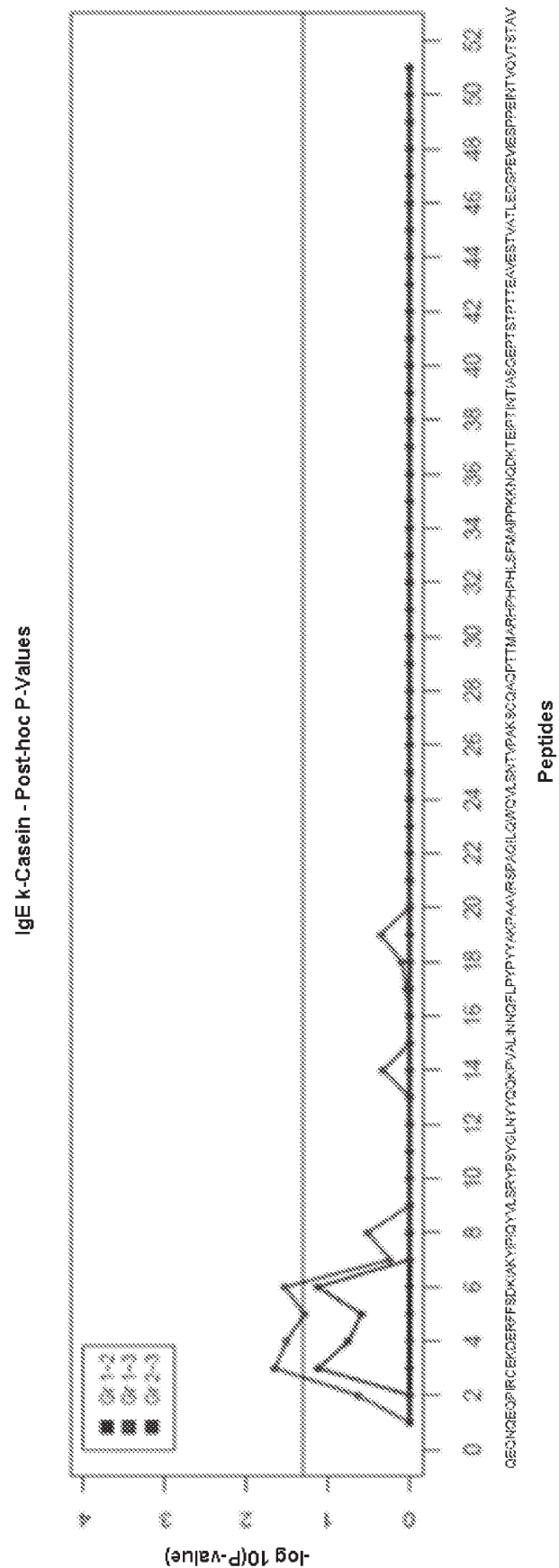


Fig. 7

a

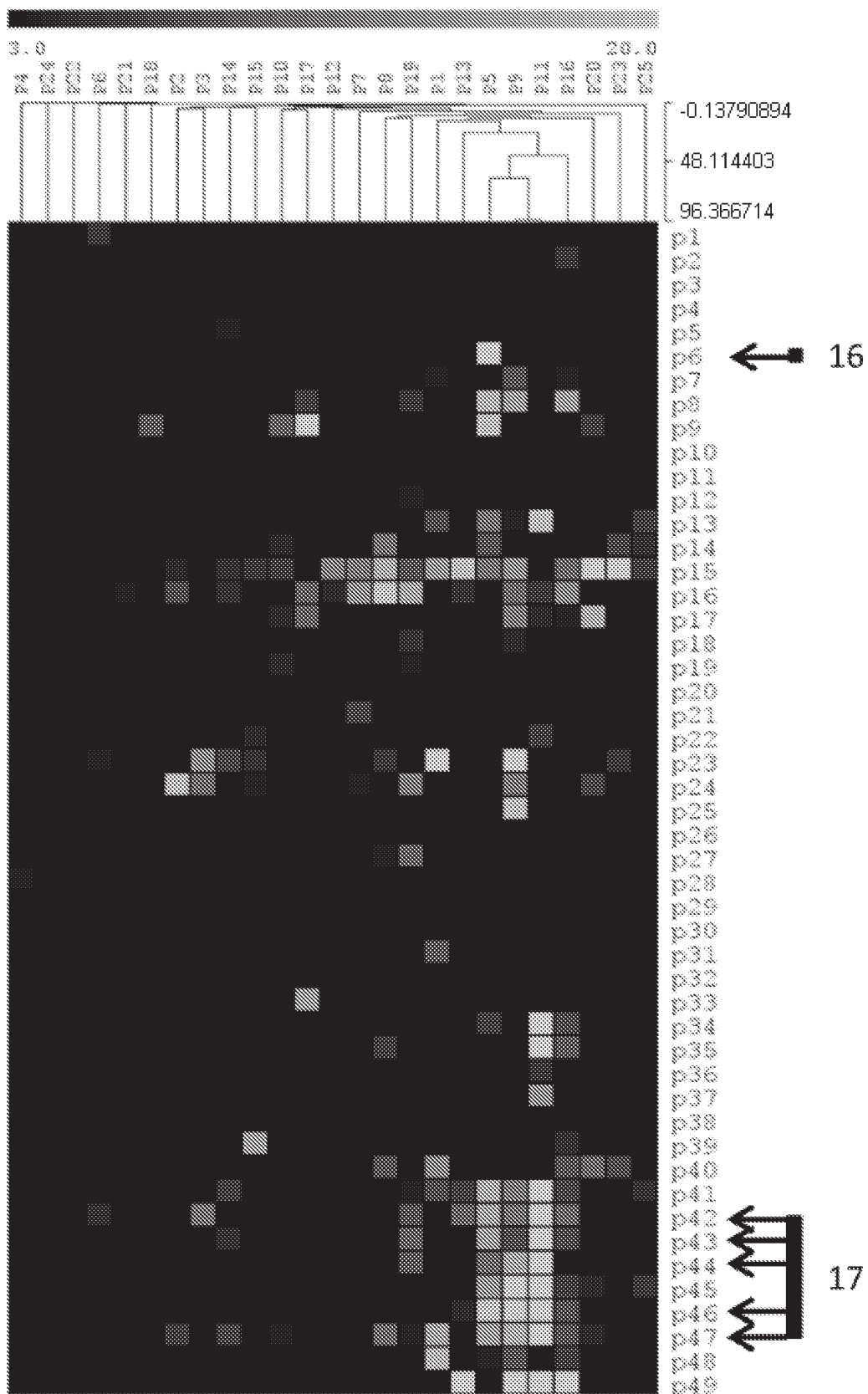


Fig. 7 continuación

b

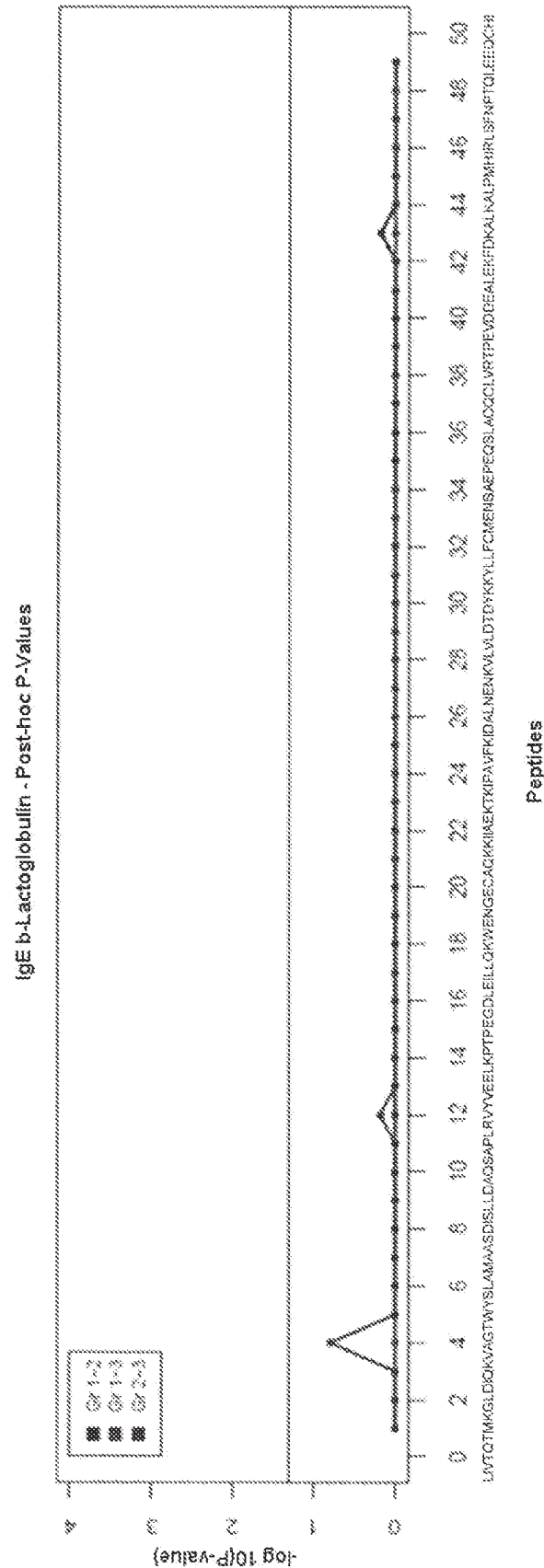


Fig. 8

a

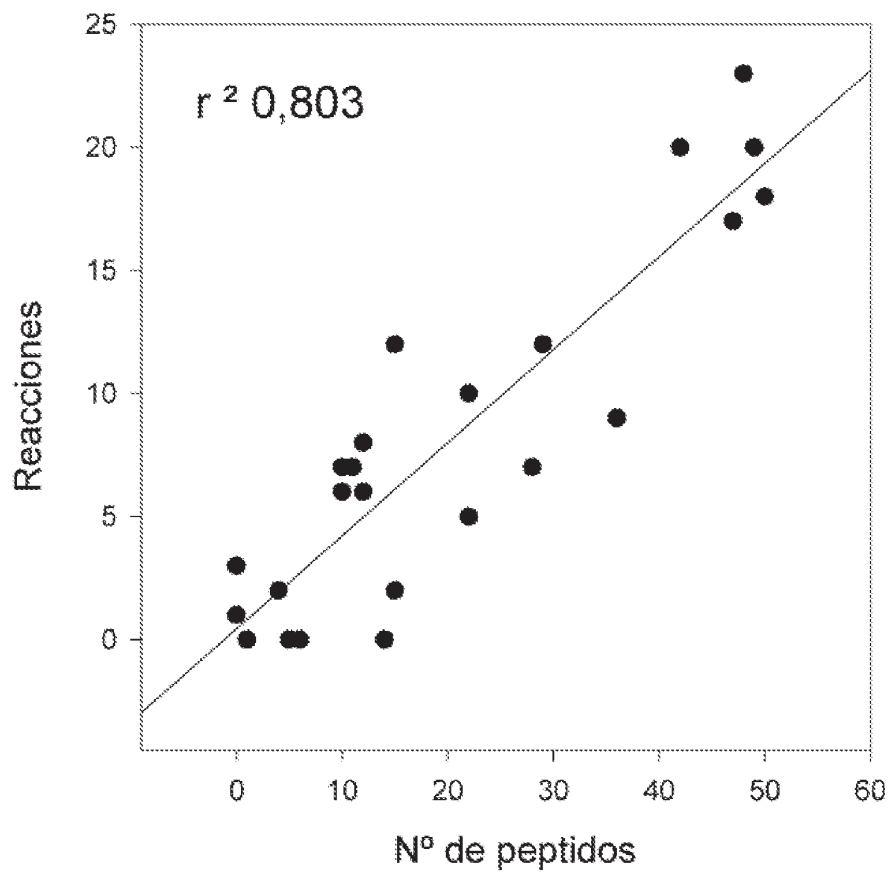


Fig. 8 continuación

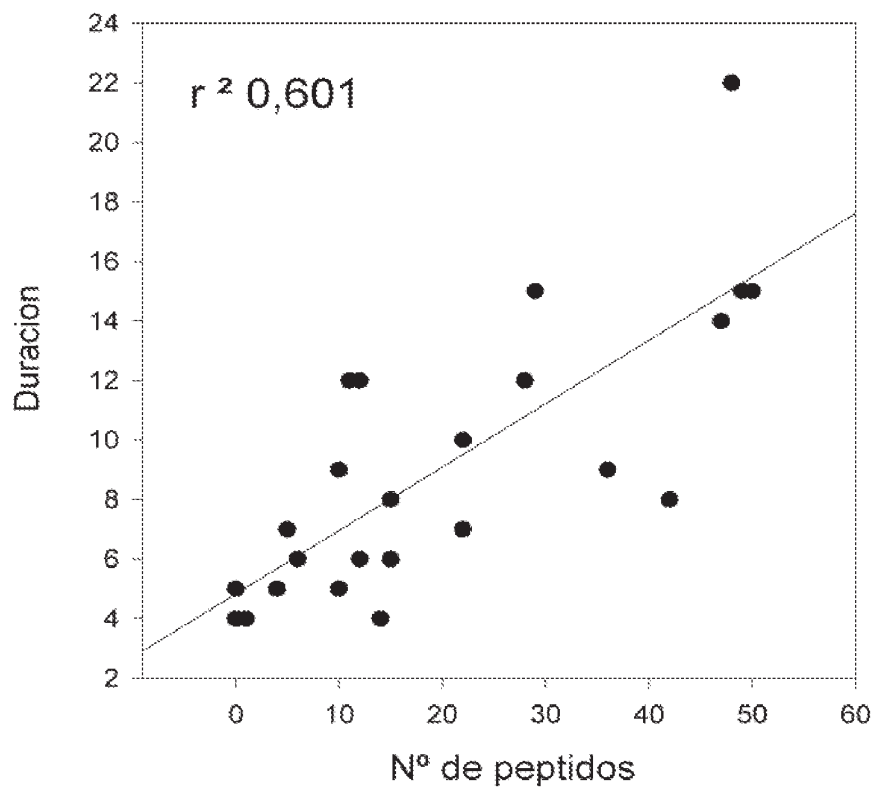
**b**

Fig. 9

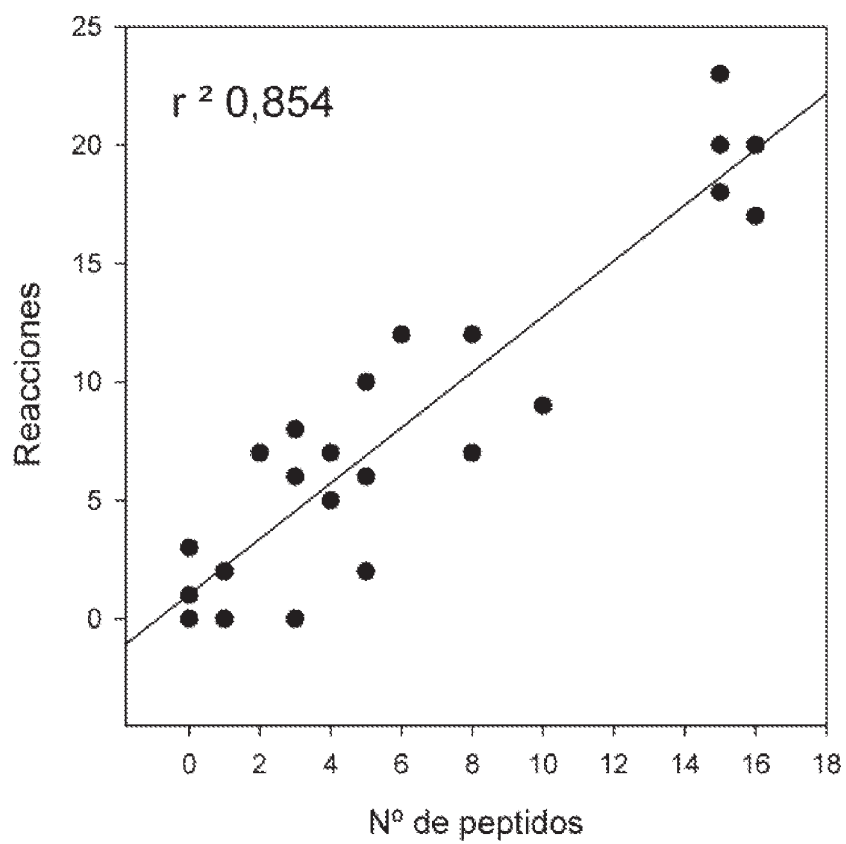
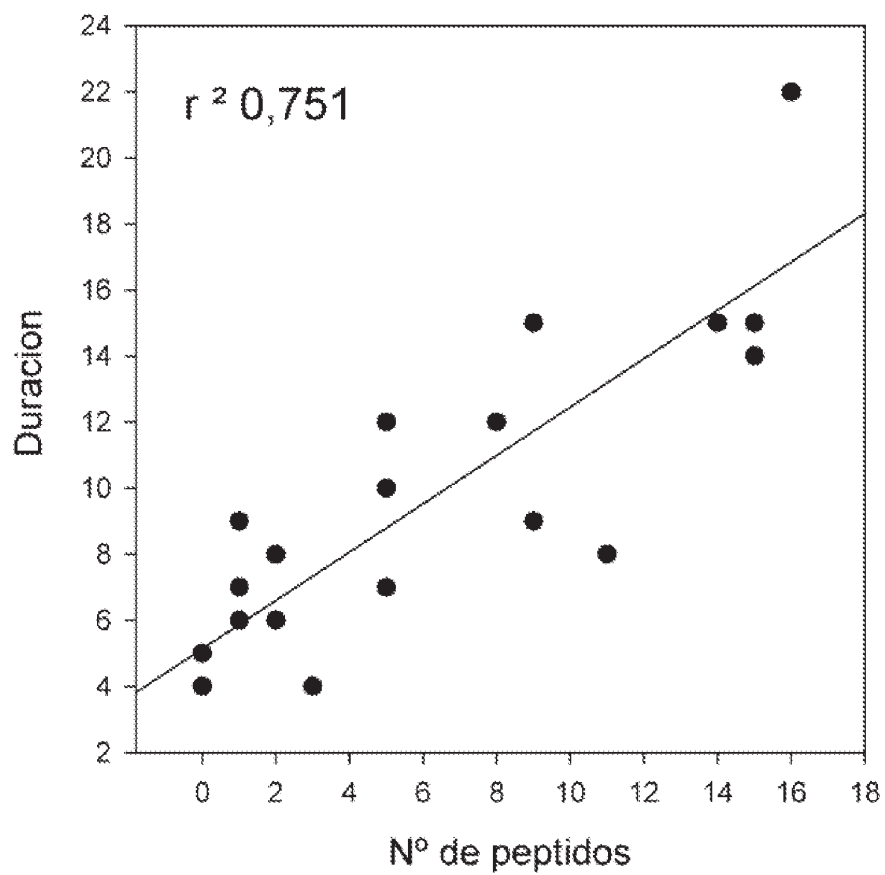


Fig. 10



## Figuras

Figura 1

