



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 241 646**

⑤① Int. Cl.7: **C07K 14/415**
A61K 39/36
G01N 33/68

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **00958467 .3**

⑧⑥ Fecha de presentación : **18.08.2000**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1206488**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **22.05.2002**

⑤④ Título: **Procedimiento para el aislamiento y la purificación de alergenos del polen de las gramíneas.**

③⑩ Prioridad: **24.08.1999 DE 199 39 982**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2005

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2005

⑦③ Titular/es: **MERCK PATENT GmbH**
Frankfurter Strasse, 250
64293 Darmstadt, DE

⑦② Inventor/es: **Suck, Roland;**
Cromwell, Oliver y
Fiebig, Helmut

⑦④ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 241 646 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el aislamiento y la purificación de alérgenos del polen de las gramíneas.

5 La invención se refiere a un procedimiento para el aislamiento y la purificación de manera rápida y eficaz de cinco alérgenos de los grupos 1, 2, 3, 10 y 13 de los pólenes de las gramíneas. Para la purificación de los alérgenos sirven los pólenes de poáceas como materia prima natural, tal como por ejemplo de *Phleum pratense*. La purificación está basada en una combinación, según la invención, de cromatografía de interacción, hidrófoba, filtración a través de gel y cromatografía con intercambio de cationes. Las proteínas, obtenidas de este modo, pueden ser empleadas para un diagnóstico mejorado de alergias al polen así como para preparaciones farmacéuticas para la terapia de enfermedades alérgicas por polen.

15 Las alergias del tipo 1 tienen un significado mundial. Hasta el 20% de la población en los países industrializados sufre molestias tales como rinitis alérgica, conjuntivitis o asma bronquial, que son provocadas por los alérgenos (aeroalérgenos), que se encuentran en el aire, que son liberados por diversas fuentes tales como plantas, ácaros, gatos o perros. Hasta el 40% de estos alérgicos de tipo 1 presentan, a su vez, reactividad específica a IgE con alérgenos procedentes del polen de las gramíneas (Freidhoff *et al.*, 1986, *J Allergy Clin Immunol* 78, 1190-201).

20 Las sustancias, que provocan la alergia del tipo 1, están constituidas por proteínas, glicoproteínas o polipéptidos. Estos alérgenos reaccionan, tras la absorción a través de las mucosas, con moléculas IgE enlazadas en la superficie de los mastocitos en personas sensibilizadas. Cuando se reticulán entre sí dos o varias moléculas IgE por medio de un alérgeno, esto conduce a un vertido de mediadores (por ejemplo histamina, prostaglandina) y citoquinas a través de las células efectoras y, de este modo, a los síntomas clínicos correspondientes.

25 En función de la frecuencia relativa de los alérgicos, que presentan anticuerpos IgE frente a determinados alérgenos se distingue entre alérgenos mayores y alérgenos menores. En el caso del fleo de los prados (*Phleum pratense*) se han caracterizado, hasta el presente Phl p 1 (Petersen *et al.*, 1993, *J. Allergy Clin. Immunol.* 92, 789-796), Phl p 5 (Matthiesen y Löwenstein, 1991, *Clin. Exp. Allergy* 21, 297-307; Petersen *et al.*, 1992), Phl p 6 (Petersen *et al.*, 1995, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 108, 49-54) y Phl p 2/3 (Dolecek *et al.*, 1993) como alérgenos mayores y Phl p 4 (Löwenstein, 1978, *Prog. Allergy* 25, 1- 62) así como grupos 10 y 11 de *Lolium perenne* (Ansari *et al.*, 1987, *J. Allergy Clin. Immunol.* 80, 229-235) como alérgenos menores. Además se ha descrito recientemente otro alérgeno mayor de elevado peso molecular, que se ha designado Phl p 13. Los alérgenos de los grupos 1 y 13 están glicosilados.

35 En relación con la presente invención tienen un significado especial los grupos de alérgenos 1, 2, 3, 10 y 13. Los métodos de purificación establecidos de los alérgenos naturales están basados en el aislamiento de las proteínas individuales correspondientes. Mediante cromatografía de afinidad con empleo de anticuerpos específicos se han purificado por ejemplo hasta el presente alérgenos del grupo 1 a partir de *Lolium perenne* (Boutin *et al.*, 1996, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 112, 218-225) y *Phleum pratense* (Grobe *et al.*, 1999, *Eur. J. Biochem.* 263, 33-40). Este método está limitado en lo que respecta a su capacidad y se lleva a cabo con empleo de un valor del pH extremo de manera que el contenido de la conformación nativa no puede ser asegurado. Otros procedimientos están basados en diversas series, multietapas, de etapas cromatográficas. En este caso se obtienen respectivamente alérgenos individuales, tales como por ejemplo grupo 10 (Ansari *et al.*, 1987, *J. Allergy Clin Immunol* 80, 229-235) o grupo 3 (Ansari *et al.*, 1989, *Biochemistry* 28, 8665-8670). Otros alérgenos se pierden o no pueden ser obtenidos en estado puro con estos métodos.

45 Se describe un método para la purificación de los alérgenos principales de los grupos 1 y 5 a partir de polen de gramíneas por Fahlbusch *et al.*, (*J. Immunol. Meth.* 194 (1996) 27-34). Sin embargo este método está limitado también lo que se refiere a su capacidad.

50 Los datos de la secuencia DNA están disponibles, entre otros, para Phl p1 (Laffer *et al.*, 1994, *J. Allergy Clin. Immunol.* 94, 1190-98; Petersen *et al.*, 1995, *J. Allergy Clin. Immunol.* 95(5) 987-994), Phl p 5 (Vrtala *et al.*, 1993, *J. Immunol* 151 (9), 4773-4781), Phl p 6 (Petersen *et al.*, 1995, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 108 (1), 55-59) y Phl p 2 (Dolecek *et al.*, 1993, *FEBS* 335 (3), 299-304). Con ayuda de las secuencias cDNA es posible la preparación de alérgenos recombinantes, que pueden encontrar aplicación en el diagnóstico y la terapia (Scheiner and Kraft, 1995, *Allergy* 50, 384-391).

55 Una publicación clásica relativa al tratamiento terapéutico eficaz de alergias está representada por el artículo Spezifische Immuntherapie oder Hyposensibilisierung (Inmunoterapia específica o hiposensibilización) (Fiebig, 1995, *Allergo J.* 4 (6), 336-339; Bousquet *et al.*, 1998, *J. Allergy Clin Immunol.* 102 (4), 558-562). En este caso se inyectan de manera subcutánea al paciente extractos naturales de alérgenos a dosis crecientes. Desde luego en el caso de este método existe el peligro de reacciones alérgicas o incluso de un choque anafiláctico. Con el fin de minimizar estos riesgos se emplean preparados innovativos en forma de alergoides. Estos están constituidos por extractos de alérgenos químicamente modificados, que presentan una reactividad IgE claramente menor, sin embargo idéntica a la reactividad de la célula T en comparación con el extracto no tratado (Fiebig, 1995, *Allergo J.* 4 (7), 377-382).

65 Sería posible una optimación mayor de la terapia con alérgenos altamente purificados. Las combinaciones definidas constituidas por alérgenos naturales pueden sustituir a los extractos actuales puesto que éstos contienen, además de los diversos alérgenos, un número mayor de proteínas acompañantes inmunógenas, pero no alérgicas, que no son necesarias para la inmunoterapia específica. El empleo de combinaciones de alérgenos permite también la preparación

ES 2 241 646 T3

de mezclas de alérgenos específicas para cada paciente de acuerdo con el espectro de sensibilización. Las perspectivas realísticas, que podrían conducir a una hiposensibilización segura con alérgenos naturales altamente purificados, son ofrecidas por alérgenos modificados, en los cuales han sido destruidos los epítopos IgE mediante modificación irreversible de la estructura secundaria y terciaria, sin que se influya negativamente sobre los epítopos de las células T, esenciales para la terapia.

La invención puede emplearse ventajosamente, también, en el diagnóstico *in vitro* e *in vivo* de enfermedades alérgicas, especialmente de polinosis. Para ello se emplearán los grupos de alérgenos, purificados, para la detección de anticuerpos IgE en procedimientos establecidos.

La invención está constituida por un procedimiento bioquímico de purificación, que conduce al aislamiento de 4 alérgenos mayores y de 1 alérgeno menor a partir de extractos acuosos de polen, momentáneos, por medio de una purificación eficaz en tres etapas. Como materias primas naturales sirven pólenes de gramíneas, tales como por ejemplo de *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Dactylis glomerata*, *Poa pratensis*, *Cynodon dactylon*, *Holcus lanatus*. La figura 1 representa entre otras cosas, el esquema de purificación de los 5 alérgenos citados a partir de extractos de polen de gramíneas. En este caso corresponden las denominaciones de los alérgenos Phl p 1 hasta Phl p 13 a las denominaciones empleadas por lo demás en el texto de los alérgenos 1 hasta 13.

El objeto de la invención es, por lo tanto, un procedimiento para la obtención de alérgenos de gramíneas, esencialmente puros, de los grupos 1, 2, 3, 10, 13, en el que se prepara un extracto acuoso del polen de las gramíneas, y los componentes solubles se someten a una cromatografía de interacción, hidrófoba, a una etapa de filtración a través de gel y, en caso dado, a una cromatografía con intercambio de cationes.

Según la invención pueden llevarse a cabo, también, varias etapas de un tipo de cromatografía, por regla general el procedimiento es tan eficaz, que es suficiente una sola etapa de separación, respectivamente.

El procedimiento es adecuado, de forma preferente, para la obtención de los alérgenos citados a partir del polen de las especies *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Dactylis glomerata*, *Festuca pratensis*, *Holcus lanatus*, *Poa pratensis*, *Secale cereale*.

En una variante preferente de realización se lleva a cabo la extracción por medio de solución acuosa tamponada de Tris/HCl. Sin embargo pueden emplearse, según la invención, también otras soluciones acuosas tamponadas conocidas.

Para la purificación de los alérgenos citados se emplean los componentes solubles del extracto. Para ello se centrifuga el extracto durante 3 hasta 8 minutos, preferentemente durante 5 minutos a 18.000 hasta 30.000 x g y el sobrenadante se toma para una purificación adicional. Alternativamente puede llevarse a cabo también una separación de los componentes insolubles mediante otros métodos, por ejemplo mediante filtración.

La primera etapa cromatográfica de purificación se lleva a cabo por medio de cromatografía de interacción hidrófoba, por ejemplo sobre Sepharose®. En este caso se retiene un gran número de impurezas sobre el soporte, mientras que los alérgenos deseados se encuentran en el soluto. Igualmente pueden emplearse otros materiales de soporte correspondientes.

El objeto de la invención es, por lo tanto, un procedimiento correspondiente, en el cual se separan, de otros componentes, los alérgenos de las gramíneas de los grupos 1, 2, 3, 10, 13 por medio de cromatografía de interacción hidrófoba.

En la etapa de purificación subsiguiente se separan los alérgenos de las gramíneas en tres fracciones, representando los grupos 1, 13 respectivamente una fracción y los grupos 2, 3 y 10 la tercera fracción. El objeto de la invención es, por lo tanto, en especial, un procedimiento en el que se obtienen los alérgenos de los grupos 1 y 13 en fracciones separadas por medio de una etapa de filtración a través de gel conectada aguas abajo y se separan de los alérgenos de los grupos 2, 3 y 10.

Estos últimos pueden separarse entre sí, según la invención, por medio de una etapa de cromatografía conectada aguas abajo, por medio de un intercambiador de cationes. El objeto de la invención es, por lo tanto, un procedimiento, en el que los alérgenos de los grupos 2, 3 y 10, obtenidos tras la etapa de filtración a través de gel, se separan entre sí por medio de una cromatografía de intercambio de cationes conectada aguas abajo.

La identificación de los alérgenos citados, en sí conocidos, se lleva a cabo bien por medio de sus propiedades físicas, químicas, biológicas o inmunológicas que, según se sabe, son diferentes, especialmente mediante focalizado isoelectrico, medición mediante absorción de UV, SDS-PAGE y anticuerpos específicos. Estos procedimientos y técnicas son conocidos y se han descrito de manera general.

Los rendimientos de los alérgenos obtenidos según la invención son de 0,5 hasta 1,5% referido al conjunto de la proteína originalmente empleada del polen de las gramíneas.

La invención sirve también para mejorar el diagnóstico *in vitro* e *in vivo* en el ámbito de una identificación del espectro de sensibilización específico del paciente, resolvidora de los componentes alérgenos.

ES 2 241 646 T3

La invención sirve, igualmente, para la obtención de preparados mejorados para la inmunoterapia específica de alergias del polen de las gramíneas, que se consigue mediante la separación de los componentes del extracto inmunógenos, pero irrelevantes para la terapia. Además, puede obtenerse un preparado alérgico mediante la reacción química de los alérgenos purificados.

5

A continuación se describe en detalle el procedimiento.

La purificación de los alérgenos naturales a partir del polen del fleo de los prados se lleva a cabo en un procedimiento con tres etapas (véase la figura 1). Después de la extracción acuosa con solución tamponada de Tris/HCl (20 mM de Tris/HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0) de polen durante 30 minutos se separa el extracto mediante centrifugación, preferentemente a 20.000 x g durante cinco minutos. El sobrenadante tamponado con Tris/HCl (20 mM de Tris/HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0) se combina con sulfato de amonio 1 M y, a continuación, se somete a una cromatografía de interacción hidrófoba (Phenyl-Sepharose High Performance, Pharmacia). Una columna típica está empaquetada con 50 hasta 100 ml de material de soporte y se hace trabajar con una velocidad de flujo de 5 ml/min aproximadamente. La fracción del soluto contiene exclusivamente la proteína de cinco grupos de alérgenos: grupo 1 (30-35 kDa), grupo 2 (11 kDa), grupo 3 (12 kDa), grupo 10 (13 kDa) y grupo 13 (55-60 kDa). A continuación se lleva a cabo una reducción del volumen preferentemente mediante ultrafiltración o por liofilización.

10

15

En una segunda etapa se separan los alérgenos de los grupos 13 y 1 a continuación mediante filtración a través de gel, de manera correspondiente a sus pesos moleculares diferentes con Superdex[®] 75 prep grade (Pharmacia) o con materiales de soporte similares, conocidos, adecuados para esta finalidad, de los alérgenos de bajo peso molecular. El medio de elución está constituido preferentemente por bicarbonato de amonio 50 mM. La columna se hace trabajar con una velocidad de flujo de 5 ml/min aproximadamente. Se obtienen tres fracciones, que contienen los alérgenos 1, 13 (separados respectivamente) y 2, 3, 10 (en una sola fracción).

20

25

Los alérgenos de bajo peso molecular de los grupos 2, 3 y 10, que se han eluido junto con la tercera fracción de la filtración a través de gel, se separan entre sí por medio de cromatografía de intercambio catiónico. Para ello se recoge la muestra liofilizada en un tampón acuoso, preferentemente tampón de fosfato 20 mM, pH 7,2 y se aplica sobre una columna intercambiadora de cationes, equilibrada con este tampón (por ejemplo Source S[®]). En el soluto se encuentra el alérgeno ácido 2. Mediante un gradiente salino de NaCl desde 0 hasta 500 mM durante aproximadamente 20 volúmenes de la columna, se eluyen, sucesivamente, los alérgenos enlazados 3 y 10. De este modo se ha separado el grupo de alérgenos de bajo peso molecular en sus alérgenos individuales. Según la invención pueden emplearse también otros materiales intercambiadores de cationes.

30

La presente invención posibilita, por lo tanto, mediante el procedimiento según la invención, puesto a disposición, que se caracteriza por la serie especial de etapas de cromatografía así como por la elección de los medios para la cromatografía, un método de producción altamente calibrado, empleable industrialmente para la obtención de varios alérgenos naturales, de gramíneas, altamente purificados con un coste menor de trabajo y de tiempo. Puesto que los procedimientos de purificación empleados son muy cuidadosos para las proteínas, se mantienen sus conformaciones y su antigenidad. Esto es una condición previa para llevar a cabo un diagnóstico con éxito de las enfermedades alérgicas.

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 241 646 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la obtención de alérgenos de gramíneas, esencialmente puros, de los grupos 1, 2, 3, 10, 13, **caracterizado** porque se prepara un extracto acuoso del polen de las gramíneas y los componentes solubles se someten a una cromatografía de interacción, hidrófoba, a una etapa de filtración a través del gel y, en caso dado, a una cromatografía de intercambio catiónico.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se emplea para la extracción el polen de las especies *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Dactylis glomerata*, *Festuca pratensis*, *Holcus lanatus*, *Poa pratensis*, *Secale cereale*.
- 15 3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado** porque la extracción se lleva a cabo por medio de solución acuosa de Tris/HCl tamponada.
- 20 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque en una primera etapa se separan, de los otros componentes, por medio de cromatografía de interacción, hidrófoba, los alérgenos de las gramíneas de los grupos 1, 2, 3, 10, 13.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque los alérgenos de los grupos 1 y 13 se obtienen por medio de una etapa de filtración a través de gel, conectada aguas abajo, en fracciones separadas y se separan de los alérgenos de los grupos 2, 3 y 10.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque los alérgenos de los grupos, 2, 3 y 10, obtenidos tras la etapa de filtración a través de gel, se separan entre sí por medio de una cromatografía de intercambio de cationes conectada aguas abajo.
- 35 7. Procedimiento para la obtención de alérgenos de gramíneas, esencialmente puros, del grupo 13, **caracterizado** porque se prepara un extracto acuoso de polen de las gramíneas y los componentes solubles se someten a una cromatografía de interacción hidrófoba y a una etapa de filtración a través de gel, obteniéndose en la última etapa tres fracciones, representando respectivamente una fracción los alérgenos de los grupos 1 y 13 y representando la tercera fracción los alérgenos de los grupos 2, 3 y 10.
- 40 8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque la gramínea está constituida por *Phleum pratensis* (fleo de los prados).
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Figura 1:

