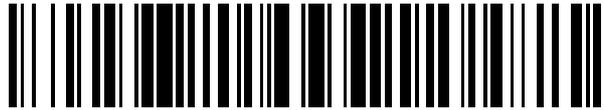


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 956**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 39/35 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2011 PCT/SE2011/050503**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2011 WO11133105**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2011 E 11772331 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 2560990**

54 Título: **Nuevo Alérgeno**

30 Prioridad:

23.04.2010 SE 1050406

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

02.12.2016

73 Titular/es:

PHADIA AB (100.0%)

Box 6460

751 37 Uppsala, SE

72 Inventor/es:

MATTSSON, LARS;

LIDHOLM, JONAS y

LUNDGREN, THOMAS

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 592 956 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

Nuevo Alérgeno

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la alergia. Más específicamente, la invención se refiere a la identificación de nuevos alérgenos de mamíferos y para el diagnóstico y el tratamiento de la alergia a los mamíferos.

Antecedentes

10 Aproximadamente el 20% de las poblaciones de los países industrializados llegan a ser hipersensibles (alérgicas) a la exposición a antígenos de una variedad de fuentes ambientales. Aquellos antígenos que inducen los tipos inmediatos y/o retardados de hipersensibilidad son conocidos como alérgenos (Breiteneder et al. 1997). Estos incluyen productos de hierbas, árboles, malezas, caspa de animales, insectos, alimentos, medicamentos y productos químicos. Los anticuerpos implicados en la alergia atópica pertenecen principalmente al isotipo de la inmunoglobulina E (IgE). La IgE se une a los basófilos y mastocitos y a células dendríticas mediante un receptor específico de alta afinidad Fc ϵ RI. Tras la exposición a un alérgeno, los anticuerpos IgE específicos de alérgeno en la superficie celular se hacen reticulados, lo que conduce a la liberación de mediadores inflamatorios tales como histamina y leucotrienos dando como resultado manifestaciones fisiológicas de la alergia (Akdis 2006).

20 Las pruebas de diagnóstico para la alergia implican la detección de anticuerpos IgE de pacientes con una especificidad para las proteínas de una fuente de alérgenos. Típicamente, un extracto acuoso de la fuente de alérgenos, que contiene una mezcla de proteínas, se utiliza en estas pruebas. Para la mayoría de las fuentes de alérgenos, se han identificado solamente en parte y caracterizado las proteínas alérgicas presentes en el extracto crudo. Los procedimientos de ensayo diagnósticos para la detección de anticuerpos IgE específicos en pacientes pueden o bien utilizar un inmunoensayo in vitro usando suero del paciente, o bien una prueba de punción cutánea (SPT), realizada por aplicación tópica del extracto específico sobre la piel del paciente (Wainstein et al. 2007).

25 En los últimos años, se han identificado y caracterizado muchas importantes proteínas alérgicas en los extractos alérgicos. Esto ha permitido la cuantificación de anticuerpos IgE específicos a cada uno de estos componentes alérgicos individuales, a menudo referido como diagnóstico de componentes resuelto (CRD) (Valenta et al. 1999) (Hiller et al. 2002), que, en muchos casos, puede conducir a un mejorado diagnóstico de la hipersensibilidad (Stumvoll et al. 2003). El uso de CRD también se ha sugerido como una ayuda en la selección de un tratamiento óptimo de inmunoterapia (Valenta et al., 2007). Además, en algunos casos pueden ser utilizados los alérgenos individuales para mejorar la sensibilidad de diagnóstico de un extracto pinchando el extracto con un componente. En conclusión, por lo tanto, es de gran importancia identificar y caracterizar las importantes proteínas alérgicas en cada fuente de alérgenos.

35 Aparte de la reducción de los síntomas de la alergia, por ejemplo, mediante antihistamínicos, se puede realizar un tratamiento más a largo plazo y curativo de la alergia con la inmunoterapia específica. La aplicación del extracto alérgico causante de la enfermedad, más comúnmente por vía subcutánea o por vía sublingual, que causa una activación específica de una respuesta inmune protectora a las proteínas alérgicas. Aunque los mecanismos exactos no se conocen completamente, una activación tal específica del sistema inmune alivia los síntomas de la alergia tras la exposición subsiguiente del medio ambiente del mismo alérgeno (Akdis et al. 2007). Un desarrollo adicional de la inmunoterapia habitual ha sido utilizar una o varias proteínas alérgicas purificadas en lugar de un extracto natural crudo. Tal inmunoterapia se ha realizado con éxito para los pacientes alérgicos al polen de gramíneas (Jutel et al. 2005) y también se ha sugerido para el tratamiento de la alergia contra la caspa de animales (Gronlund et al. 2009).

45 La caspa del caballo es una causa cada vez más común de la alergia respiratoria (Liccardi et al. 2011), con síntomas que incluyen rinitis, conjuntivitis, inflamación bronquial y asma. La exposición ocupacional a los alérgenos de los caballos es un factor de riesgo significativo para la sensibilización alérgica (Tutluoglu et al., 2002), pero las concentraciones considerables de alérgenos pueden detectarse también en otros lugares, tales como escuelas (Kim et al., 2005). La sensibilización de IgE a la caspa de caballo estaba en un estudio demostrado que se asociaba con un alto riesgo de desarrollar asma (Ronmark et al., 2003).

50 Los extractos de pelo de caballo y caspa contienen una complejidad de proteínas alérgicas y, hasta el momento, se han identificado cuatro alérgenos de caballo: Equ c 1, Equ c 2, Equ c 3 y Equ c 4/5. Los dos primeros son ambos miembros de la familia de proteínas de lipocalina y se han purificado a partir de su fuente natural (Dandeu et al. 1993; Goubran Botros et al., 1998), mientras que sólo Equ c 1 se ha expresado como una proteína recombinante (Gregoire et al. 1996). La secuencia de aminoácidos de Equ c 1 es 67% similar a la del alérgeno de gato Fel d 4 (Smith et al. 2004). Equ c 3, albúmina de suero de caballo, es una proteína relativamente conservada que muestra una extensa reactividad cruzada con otras albúminas de mamíferos (Goubran Botros et al. 1996). Equ c 4/5, se purificó y se informó por primera vez como una proteína que se unía a IgE en la caspa de caballo (Goubran Botros et al. 1998; Goubran Botros et al., 2001) y sólo más tarde se identificó como sudor espumoso de los caballos (McDonald et al., 2009). Equ c 1 se afirma que es el más importante de los alérgenos de caballos conocidos (Dandeu et al., 1993) y el reconocimiento de anticuerpos IgE de la proteína recombinante estaba presente en el 76% de una población de

sujetos alérgicos a caballos estudiados (Saarelainen et al., 2008). En otro estudio utilizando alérgenos nativos purificados, sólo el 33% de los pacientes alérgicos a caballos se sensibilizó frente a Equ c 2 y 23% frente a Equ c 4/5 (Goubran Botros et al. 1998). La frecuencia de la unión de IgE a la albúmina de suero de caballo se ha abordado en varios estudios que demuestran reactividad en hasta el 40% de los sujetos alérgicos al caballo (Spitzauer et al 1993; Cabañas et al., 2000). Sin embargo, como la sensibilización a albúminas de suero está a menudo acompañada por una mayor concentración de anticuerpos IgE de otros componentes alérgénicos, su relevancia clínica específica es incierta.

Aunque los alérgenos de caspa de caballo Equ c 1, Equ c 2, Equ c 3 y Equ c 4/5 se conocen desde hace mucho tiempo, no se ha hecho ninguna estimación cuantitativa de la contribución de cada componente a la respuesta de la IgE total frente a la caspa de caballo.

Compendio de la invención

Como se indicó anteriormente, un inmunoensayo de laboratorio bien diseñado para anticuerpos IgE específicos puede detectar la mayoría de los casos de sensibilización frente al caballo usando extracto de caspa de caballo natural. Sin embargo, en un inmunoensayo miniaturizado o no de laboratorio, tales como microarrays alérgenos o pruebas de consultorio médico, la combinación de condiciones de ensayo menos favorables, menor capacidad de reactivos alérgenos que se unen al anticuerpo y el extracto de alérgeno natural de potencia limitada, puede causar una insuficiencia de sensibilidad diagnóstica. Una situación similar puede existir también para los inmunoensayos para la IgE específica frente a otros epitelios de animales. Por lo tanto, hay una necesidad, en algunos casos, de usar proteínas alérgénicas puras para conseguir suficiente sensibilidad en ensayos de diagnóstico para los anticuerpos IgE específicos frente a epitelios de animales.

Tales alérgenos pueden ser útiles no sólo como reactivos para el aumento de la sensibilidad en las pruebas de diagnóstico de rutina, sino también en diferentes tipos de aplicaciones de diagnóstico de los componentes de resolución (Valenta et al. 1999) (Hiller et al. 2002). También se pueden usar proteínas puras alérgénicas, o fragmentos y variantes de los mismos con propiedades mejoradas no anafilácticas como nuevos reactivos en la inmunoterapia (Valenta et al., 1999); (Cromwell et al., 2006); (Saarne et al 2005.); (Jutel et al., 2005); (Cromwell et al., 2006).

La purificación y el análisis de todos los componentes alérgénicos de caballos conocidos dio como resultado la identificación de los sueros de algunos pacientes que tenían una respuesta de IgE significativamente más alta frente al extracto de caspa de caballo que podría ser colectivamente representada por la suma de los componentes individuales de los alérgenos del caballo. Se encontró que estos sueros tenían reactividad de unión de IgE a un componente alérgénico de caballo hasta ahora desconocido.

Con la ayuda de los sueros descritos anteriormente, un nuevo alérgeno importante pudo purificarse a partir de la caspa de caballo y se identificó como un miembro de la familia de proteínas secretoglobinas. La nueva proteína de caballo, en el presente documento denominada Equ c 15k, consta de una cadena de aminoácidos de 5 kDa y una cadena de aminoácidos de 10 kDa unidas entre sí por puentes disulfuro. Teniendo en cuenta el hecho de que las dos cadenas de polipéptidos están codificadas por genes separados, este estudio demuestra la presencia de una proteína heterodimérica que no ha sido anteriormente predicha por estudios bioinformáticos del genoma del caballo. Es, en todos los aspectos, distinta a los alérgenos del caballo previamente conocidos. Este alérgeno representa una importante adición al panel de los alérgenos de caballos conocidos y será útil en el diagnóstico de la alergia al caballo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un alérgeno aislado de caballo, Equ c 15k perteneciente a la familia de secretoglobina, que muestra una movilidad electroforética (peso molecular aparente) correspondiente a aproximadamente 15 kDa en condiciones no reductoras, y que comprende una primera cadena peptídica que tiene un peso molecular del orden de 5 kDa y una segunda cadena peptídica que tiene un peso molecular en el orden de 10 kDa, unidas entre sí por uno o más enlaces disulfuro. Este aspecto de la invención comprende también variantes y fragmentos de Equ c 15k, que comparten epítomos de anticuerpos con la misma, de manera que las variantes y los fragmentos presentan reacción cruzada con estos anticuerpos a al menos aproximadamente el 70%. Tales variantes y fragmentos incluyen, por ejemplo, alérgenos relacionados de la misma especie. También en los otros aspectos de la invención que se describen a continuación, el término "Equ c 15k" es, por simplicidad, el que se utiliza para incluir también tales variantes y fragmentos de los mismos.

En otro aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica el alérgeno de acuerdo con el mencionado primer aspecto, así como a un vector que contiene la molécula de ácido nucleico, y a una célula huésped que contiene el vector. Las proteínas o los péptidos recombinantes producidos por una célula huésped tal que contiene el vector pueden estar glicosiladas o no, dependiendo de la célula huésped utilizada.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de Equ c 15k para la fabricación de una composición para el diagnóstico de alergia de tipo I.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición de alérgeno "enriquecida" con Equ c 15k. Tal composición de alérgeno puede ser un extracto alérgénico o una mezcla de componentes de alérgenos purificados o

recombinantes que no tienen o tienen un bajo contenido de Equ c 15k, en el que se añade Equ c 15k con el fin de que se una a IgE de pacientes cuya IgE no se uniría, o se uniría pobremente, a los otros componentes alergénicos en la composición. Este aspecto de la invención también se refiere a un método para producir una composición de este tipo; método que comprende la etapa de añadir Equ c 15k a una composición alergénica, tal como un extracto de alérgeno (opcionalmente enriquecido con otros componentes) o una mezcla de componentes alergénicos purificados nativos o recombinantes.

En aún un aspecto adicional, la invención se refiere a un método diagnóstico in vitro para el diagnóstico de una alergia de tipo I en un paciente, en el que una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de sangre o suero del paciente, se pone en contacto con Equ c 15k o una composición de acuerdo con el aspecto anterior, mediante la cual se puede determinar si la muestra del paciente contiene anticuerpos IgE que se unan específicamente a Equ c 15k. Un método de diagnóstico de este tipo puede llevarse a cabo de cualquier manera conocida en la técnica. El Equ c 15k puede, por ejemplo, inmovilizarse sobre un soporte sólido, tal como en un inmunoensayo convencional de laboratorio, en un microarray o en un ensayo de flujo lateral, o puede utilizarse como un reactivo de fase fluida.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit diagnóstico para realizar el método de acuerdo con el aspecto anterior.

En los aspectos anteriormente mencionados, la molécula de Equ c 15k de tipo salvaje puede, como se ha mencionado anteriormente, sustituirse con fragmentos o variantes de Equ c 15k, naturales o artificiales, intercambiando epítomos de anticuerpos con la proteína de tipo salvaje, tal como se define a continuación.

La invención se refiere además a un método de tratamiento de la alergia tipo I que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento Equ c 15k o un Equ c 15k modificado, como se explica a continuación. Este aspecto de la invención también se refiere al uso de Equ c 15k en tal inmunoterapia, incluyendo por ejemplo, inmunoterapia de resolución de componentes (Valenta et al., 2007). En una realización de este aspecto, el Equ c 15k se puede usar en su forma natural o en una forma recombinante que presente propiedades bioquímicas e inmunológicas similares a las de la molécula natural. En otra realización, el Equ c 15k se puede utilizar en una forma modificada, generada químicamente o genéticamente, con el fin de suprimir o atenuar su capacidad de unión de anticuerpos IgE, mientras que sea preferiblemente capaz de provocar una respuesta de IgG en un individuo tratado. Los ejemplos de modificaciones incluyen, pero no se limitan, a la fragmentación, el truncamiento, la tandemización o la agregación de la molécula, la supresión del segmento o de los segmentos internos, la sustitución de restos de aminoácidos, el reordenamiento de dominios, o la interrupción de al menos, en parte, la estructura terciaria por la ruptura de puentes disulfuro o su unión a otra estructura macromolecular, u otros compuestos de bajo peso molecular. En aún otra realización de este aspecto, las subunidades individuales de 10 kDa y/o 5 kDa de Equ 15k c, que muestran una reducción de la actividad de unión a IgE en comparación con la molécula intacta, se utilizan como Equ c 15k modificado.

En todos los aspectos mencionados anteriormente de la invención, la proteína Equ c 15k se puede purificar a partir de su fuente natural, tal como de orina, saliva u otros fluidos corporales, o de tejido, tal como el pelo o la caspa, de caballo. Se puede también, como se mencionó anteriormente, producirse mediante tecnología de ADN recombinante o sintetizarse químicamente por métodos conocidos para cualquier experto en la técnica.

La invención también se refiere al 15k c Equ para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de la alergia Tipo 1, así como en el diagnóstico.

Definiciones

La proteína alergénica caballo que se describe en este documento, Equ c 15k, pertenece a la familia de proteínas de secretoglobina, específicamente una subfamilia que comprende proteínas tetraméricas formadas por dos subunidades heterodiméricas. El heterodímero consiste en dos cadenas derivadas de diferentes genes unidos entre sí por puentes disulfuro (Klug et al. 2000). La secretoglobina caballo que se describe en este documento es un heterodímero de 15 kDa, en el presente documento se denomina Equ c 15k, que consiste en una subunidad de 5±2 kDa y una de 10±2 kDa, respectivamente, que, para los fines de esta invención, se denominan las subunidades de 5 y 10 kDa, respectivamente. Las asignaciones de peso molecular son de acuerdo a su peso molecular aparente como se observa en SDS-PAGE, tal como se describe en el Ejemplo 4 a continuación. Se entiende que los pesos moleculares aparentes variarán dependiendo de las condiciones de separación, incluido el medio de separación electroforético y la concentración del mismo, el tampón lineal o de gradiente utilizado, etc. También, la subunidad de 10 kDa contiene un sitio de N-glicosilación, cuya ocupación por una estructura de glicano puede afectar al peso molecular aparente.

La secuencia de aminoácidos de la cadena de 5 kDa tiene la secuencia de aminoácidos predicha

ATCPAVATDIASFFLLPDSLFLKQLIKYQAPPEAKDATMQVKQCINEIS

AGDRYIITETLGKIVLQCGA (SEQ ID NO: 4)_y un peso molecular teórico de 7,5 kDa.

La secuencia de aminoácidos de la cadena de 10 kDa tiene la secuencia de aminoácidos predicha

GSGCQLLEDVVEKTITAELSPAHEYVEAVQEFIPDEATEKAAIQLKQCYLKQSNETLNDFR

TMMNSMYNSAYCALF (SEQ ID NO: 5) y un peso molecular teórico de 8,4 kDa.

5 Es de notar que se han descrito proteínas estructuralmente relacionadas en una amplia gama de especies de mamíferos, pero que sólo una proteína ha sido definida como alérgeno, es decir, el alérgeno principal Fel d 1 de gato (Acc no P30438 y P30440).

Las variantes y los fragmentos de Equ c 15k deben interpretarse en el sentido de proteínas o péptidos con una identidad de secuencia a dicho Equ c 15k de al menos 70%, 80%, 90% o 95%.

10 Un Equ c 15k modificado debería, en el contexto de la presente invención, interpretarse en el sentido de una variante Equ c 15k que ha sido modificada químicamente o genéticamente para cambiar sus propiedades inmunológicas, por ejemplo, como se ejemplifica anteriormente en relación con el aspecto de la inmunoterapia de la invención.

15 Las variantes y los fragmentos de Equ c 15k, que comparten epítomos para anticuerpos con Equ c 15k, deben interpretarse como esos fragmentos y variantes de los cuales la unión de anticuerpos, tales como IgE o IgG, de una muestra de suero de un Equ 15k c representativa de los pacientes sensibilizados, puede ser inhibida significativamente por Equ c 15k. Tal ensayo de inhibición puede, por ejemplo, ser realizado de acuerdo con los métodos que se describen por (Mattsson et al. 2009) (la descripción de la cual se incorpora por referencia en este documento).

20 Un Equ c 15k hipoalergénico modificado o variante o fragmento de Equ c 15k se deben interpretar como un Equ c 15k modificado o variante o fragmento de Equ c 15k que no es capaz de unirse a anticuerpos IgE reactivos con Equ c 15k a partir de una muestra de suero de un paciente sensibilizado con Equ c 15k representativo, como se determina por ejemplo, por el protocolo de acuerdo con el Ejemplo 7 a continuación o que no presente o tenga reducida significativamente la actividad de alérgeno biológico, tal como se determina mediante un ensayo de activación celular, tal como el ensayo de liberación de histamina de basófilos (Demoly et al 2003; Ebo et al 2004.).

Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1A muestra el fraccionamiento de las proteínas de caspa de caballo por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC). Los Picos A y B que se usaron para las etapas de purificación posteriores se indican mediante flechas.

La Figura 1B muestra la purificación de nEqu c 1 mediante cromatografía de interacción hidrófoba. Los Picos C y D se utilizaron para las etapas de purificación posteriores.

30 La Figura 1C muestra la purificación de nEqu c 2 y Equ c 4/5 mediante cromatografía de interacción hidrófoba. Los Picos E, F y G fueron utilizados para las etapas de purificación posteriores.

La Figura 1D muestra la purificación de nEqu c 2 por cromatografía de intercambio de aniones. Los Picos H e I se usaron para el análisis posterior.

35 La Figura 1E muestra el análisis de SDS-PAGE de las formas A y B de las proteínas Equ c 1 purificadas, forma de Equ c 2 y Equ c 4/5 de 14 kDa y 19 kDa. El Carril M contiene proteínas marcadoras de peso molecular con el peso molecular que se indica a la izquierda.

La figura 2A compara la unión de IgE de las dos formas, A y B, de nEqu c 1 (del pico C y pico D, respectivamente) utilizando 35 sueros reactivos de caspa de caballo. Las líneas de puntos indican el nivel de corte de 0,35 kU_A/L.

40 La Figura 2B compara la unión de IgE de las formas 19 kDa y 14 kDa de nEqu c 4/5 utilizando 38 sueros reactivos de caspa de caballo. Las líneas de puntos indican el nivel de corte de 0,35 kU_A/L.

La Figura 3 muestra la purificación de las fracciones utilizadas para buscar nuevas proteínas de unión de IgE. A: Purificación de la fracción A mediante cromatografía de intercambio aniónico. B: Purificación de las fracciones B y C mediante cromatografía de interacción hidrófoba.

45 La Figura 4 muestra la purificación de una proteína de la caspa de caballo de 15 kDa. A: Fraccionamiento del extracto de la caspa de caballo por cromatografía de exclusión de tamaño. El pico A se utilizó para las etapas de purificación posteriores. B: Fraccionamiento del pico A mediante cromatografía de interacción hidrófoba. El Pico J, combinado como se indica en la figura, se utilizó para las etapas de purificación posteriores. C: El fraccionamiento del pico J por cromatografía de intercambio de aniones. Los Picos K y L se utilizaron para el análisis posterior y/o para etapas de purificación adicionales. D: muestra el análisis de SDS-PAGE reducido (Red) y las muestras no reducidas (OX) de la proteína purificada de caspa de caballo de 15 kDa. El Carril M contiene proteínas marcadoras de peso molecular con el peso molecular que se indica a la izquierda. E: Purificación de refinación del pico K por cromatografía de fase inversa. El Pico M se utilizó para el análisis inmunológico posterior.

50

La Figura 5 muestra la secuencia predicha de las cadenas de aminoácidos de 5 kDa y 10 kDa de nEqu c 15k. Los aminoácidos identificados por secuenciación del N-terminal están subrayados y los aminoácidos identificados por análisis MS/MS se muestran en negrita.

5 La Figura 6 muestra la reactividad de IgE frente a nEqu c 15k en los sueros de dos de los pacientes alérgicos al caballo (Nos. 3 y 12), como se detectó por inmunotransferencia. Las dos primeras tiras muestran la tinción de la proteína total y las posiciones de las subunidades de 5 y 10 kDa y la proteína de 15 kDa, respectivamente, se indican con flechas. Las cuatro bandas de la derecha muestran la unión de IgE a muestras reducidas (Red) y no reducidas (Ox) de Equ c 15k.

10 La Figura 7 muestra la correlación entre la reactividad de IgE de Equ c 15k nativa y recombinante. Los niveles de 0,35 kU_A/L y 0,1 kU_A/L se indican mediante líneas de puntos.

15 La Figura 8 muestra los niveles de anticuerpos IgE frente al extracto de caspa de caballo (HDE), Equ c 1, nEqu c 2, nEqu c 3, nEqu c 4/5 y rEqu c 15k en una cohorte de 25 sujetos alérgicos de caspa de caballo. El número de observaciones por debajo de 0,1 kU_A/L se indica en corchetes para cada componente. La línea punteada indica el nivel de 0,35 kU_A/L y la línea continua indica el nivel 0,1 kU_A/L. Las barras horizontales indican la mediana de los niveles de IgE.

La Figura 9 compara la unión de anticuerpos IgE frente a nEqu 15k cy rFel d 1. Los niveles de 0,35 kU_A/L y 0,1 kU_A/L se indican mediante líneas de puntos.

20 La figura 10 muestra la capacidad del Equ c 15k soluble y Fel d 1 de auto- y cruzado-inhibir la unión a IgE a Equ c 1 y Fel d 1 inmovilizados. Se utilizaron sueros de pacientes alérgicos a la caspa de caballo (con el marcador según la tabla 3) o sujetos sensibilizados a la caspa de caballo (A a E marcados).

Descripción detallada de la invención

Los ejemplos siguientes ilustran la presente invención con el aislamiento y el uso de secretoglobina de caballo. Los ejemplos son sólo ilustrativos y no deben ser considerados como limitativos de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

25 Ejemplo 1: Purificación y caracterización de alérgenos conocidos de la caspa de caballo y del suero

La caspa de caballo se utilizó como material de partida para la purificación de Equ c 1, Equ c 2 y Equ c 4/5 mientras que Equ c 3 se purificó a partir del suero de caballos.

30 La caspa de caballo (Allergon, Välinge, Suecia) se extrajo en MOPS 20 mM, pH 7,6, NaCl 0,5 M (MBS = MOPS solución salina tamponada), se aclaró por centrifugación y se filtró a través de un filtro de éster de celulosa mezclado de 0,45 µm (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos). Como primera etapa de purificación para los tres alérgenos de caspa de caballo, el extracto clarificado se aplicó a una columna SuperdexTM 75 (XK26/100, V_t = 505 ml, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suecia) para la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) y la elución se realizó con MBS a una velocidad de flujo de 2 ml/min.

Equ c 1

35 Con el fin de purificar Equ c 1, el pico A en la Fig. 1A se ajustó a NH₄SO₄ 2 M y se aplicó a una columna de Fenil SepharoseTM HP (HR 10/10, V_t = 9,0 ml, GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con NH₄SO₄ 2 M en Tris 20 mM pH 8,0. La elución se realizó en un gradiente lineal de NH₄SO₄ 2 M a NH₄SO₄ 0 M. Dos picos que contienen Equ c 1 se eluyeron en medio de la pendiente, los picos C y D en la Fig. 1B. Después de la desalación, cada pico en una columna fina de SephadexTM G25 (XK16/20, V_t = 34 ml, GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con 20 mM de MOPS pH 7,6 NaCl 0,5 M, cada preparación de nEqu c 1 se sometió a electroforesis con gel de dodecil sulfato de poliacrilamida sódico (SDS-PAGE) utilizando el sistema tampón NuPAGE MES (10% de gel NuPAGE, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) de una muestra reducida preparada mezclando la muestra de 1:3 con tampón de muestra NuPAGE LDS (Invitrogen) que contiene β-mercaptoetanol 100 mM. Como una indicación del peso molecular aparente se utilizó la norma Mark 12TM (Invitrogen). Ambas preparaciones nEqu c 1 eran puras como se juzga por SDS-PAGE (Fig. 1E).

45 Las preparaciones de proteínas fueron identificadas inequívocamente como Equ c 1 por huellas dactilares de masa de péptido (PMF) realizadas en un instrumento Autoflex 2 de Bruker Daltonics (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) como se describe en (Mattsson et al., 2009). Ambas formas de la proteína se inmovilizaron en fase sólida ImmunoCAPTM como se describe (Marknell DeWitt et al. 2002).

50 Equ c 2

Con el fin de purificar Equ c 2, el segundo pico de la SEC, el pico B en la Fig. 1A, se ajustó a NH₄SO₄ 1M y se sometió a cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) en una columna de fenil SepharoseTM HP (HR 10/10, V_t = 9,0 ml, GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con NH₄SO₄ 1 M en Tris 20 mM pH 8,0. La elución se realizó en un

5 gradiente lineal de NH_4SO_4 1 M a NH_4SO_4 0 M en el mismo tampón. Equ c 2 estaba contenida en el flujo a través de la fracción (pico E en la Fig. 1 C) que se agrupó y se desaló en una columna fina de SephadexTM G25 (XK26/20, V_t = 90 ml, GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con Bis-Tris propano 20 mM, pH 8,5. El agrupado desalado Equ c 2 finalmente se aplicó a una columna de intercambio aniónico SourceTM 15Q (HR16/10, V_t = 9 ml, GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con Bis-Tris propano 20 mM, pH 8,5. Tras la elución en un gradiente lineal desde 0 hasta 10 0,40 M de NaCl en el mismo tampón, la proteína se resolvió en tres picos que todos exhibieron banda pura a 17 kDa en el análisis de SDS-PAGE. Los dos picos más grandes fueron analizados por secuenciación del N-terminal (ProciseTM LC452, Applied Biosystems, Foster City CA, EE.UU.) y ambos tenían la secuencia DQDPQSEDY, identificándolos como Equ c 2.0201 (fig. 1D pico de H e I). Para el propósito de evaluar la reactividad de unión a IgE, los picos se agruparon y se inmovilizaron en la fase sólida ImmunoCAPTM como se describe (Marknell DeWitt et al. 2002).

Equ c 4/5

15 La purificación de Equ c 4/5 se realizó utilizando el segundo pico de SEC, el pico B en la Fig. 1A. Esta agrupación se ajustó a NH_4SO_4 1 M y se sometió a cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) en una columna de fenil SepharoseTM HP (HR 10/10, V_t = 9,0 mL, GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con NH_4SO_4 1 M en Tris 20 mM pH 8,0. La elución se realizó en un gradiente lineal de NH_4SO_4 de 1 M a NH_4SO_4 0 M en el mismo tampón. Equ c proteína 4/5 se eluyó en dos picos distintos en el medio del gradiente, (pico F y G en la Fig. 1C). El análisis por SDS-PAGE del primer pico reveló una proteína que migraba como una banda de 14 kDa, mientras que el segundo pico 20 contenía una banda de 19 kDa. Después de la desalación en una columna fina de SephadexTM G25 (XK26/20, V_t = 90 ml, GE Healthcare Life Sciences) se equilibró con Tris Bis-propano 20 mM, pH 8,5. Ambas proteínas fueron puras a juzgar por SDS-PAGE (Fig. 1E). Ambas dos preparaciones muestran la secuencia de N-terminal de VGPLLGPSDA, identificándolas como espuma de caballo o Equ c 4/5.

Las dos formas de nEqu c 4/5 se inmovilizaron por separado en fase sólida de ImmunoCAPTM como se describe (Marknell DeWitt et al. 2002).

25 Equ c 3

El Equ c 3 nativo fue purificado a partir de suero de caballo por cromatografía de afinidad usando Blue Sepharose FF, (GE Healthcare Life Sciences), cromatografía de intercambio de aniones (EAI) y la SEC esencialmente como se describe (van Eijk y col., 1999).

30 Ejemplo 2: Evaluación de los niveles de unión de IgE a componentes alérgicos de caspa de caballo individuales en un panel de sueros de individuos sensibilizados a caballos

La actividad de unión a IgE de las dos formas de Equ c 1, denominadas formas A y B, se evaluó utilizando un conjunto de sueros sensibilizados de caspa de caballo (recogido de un suero propio. Las dos formas de Equ c 1 muestran una equivalente actividad de unión a IgE, como se muestra en la Fig. 2A. Por lo tanto, sólo los valores obtenidos con nEqu c 1 A se utilizaron en el análisis a continuación. El uso de un conjunto similar de sueros reactivos de la caspa de caballo, la unión del anticuerpo IgE a las dos formas de Equ c 4/5 se compararon y se 35 encontró que eran muy similares, como se muestra en la Fig. 2B.

La unión del anticuerpo a IgE a extracto de caspa de caballo y a los alérgenos purificados de caballo se examinó mediante pruebas regulares y experimentales ImmunoCAPTM (Phadia, Uppsala, Suecia). Las pruebas ImmunoCAPTM experimentales se prepararon como se ha descrito anteriormente. Se utilizaron un grupo de 29 40 sueros individuos sensibilizados a la caspa de caballo. Las determinaciones de las respuestas de IgE a extracto de caspa de caballo, nEqu c 1, nEqu c 2, nEqu c 4/5, se realizaron. Los resultados se presentan en la Tabla 1, donde las concentraciones de anticuerpos de IgE en sueros de pacientes de A1 a A29 frente a HDE y los componentes y la suma de los tres componentes se muestran como kU_A/L . La cobertura del componente es la relación de la suma de los componentes y el extracto de caspa de caballo, expresado como porcentaje. Un número de sueros fueron 45 identificados como que tenían un nivel significativamente más alto que la unión de IgE al extracto de caspa de caballo, lo que podría explicarse por los componentes individuales, por ejemplo, sueros no A1, A21 y A22. Aparte de la posible reactividad de Equ c 3, que no fue evaluada en esta etapa, los sueros identificados podrían ayudar en la búsqueda de nuevas proteínas de unión a IgE de la caspa de caballo.

Ejemplo 3: Identificación de una fracción de la caspa de caballo que tiene una reactividad de unión a IgE nueva

50 Durante el proceso de purificación de los alérgenos de caspa de caballo previamente caracterizado, se identificaron varias fracciones que contenían proteínas distintas de los alérgenos de caballos previamente conocidos. Se seleccionaron tres fracciones de especial interés para el análisis de la actividad de unión a IgE utilizando los sueros identificados en el Ejemplo 2 anterior. La Fracción A contenía una banda de 10 kDa (reducción de SDS-PAGE) obtenida a partir de una etapa de purificación de intercambio aniónico de Equ c 2 indicada por una flecha (fig. 3A). 55 Las fracciones B y C, que contienen una banda de 13 kDa y 10 kDa (reducción de SDS-PAGE), respectivamente, se obtuvieron de una etapa de purificación de HIC de Equ c 1 y se indican con flechas en la Fig. 3B. Las pruebas ImmunoCAPTM Experimental (Phadia) se prepararon como se describe (Marknell DeWitt et al. 2002) y se utilizan para el análisis de suero.

Los resultados se resumen en la Tabla 2, que también incluye las determinaciones anteriores del extracto de caspa de caballo y la suma de nEqu c 1, c nEqu 2 y nEqu c 4/5, todos mostrados como kU_A/L. Los niveles más altos de unión a IgE se encontraron en la fracción C. En particular, en A1 en suero, el nivel de la unión de IgE a la fracción C fue mucho mayor que la suma de la unión de IgE a nEqu c 1, c nEqu 2 y nEqu c 4/5. El hecho de que este suero tenía una reactividad de IgE albúmina de sólo el 1,5 kU_A/L (no mostrado) sugirió que la fracción C contenía un nuevo alérgeno de caspa de caballo.

Ejemplo 4: Purificación e identificación de la proteína constituyente dominante de la fracción C

Purificación de una proteína de la caspa de caballo de la fracción C

Para purificar la proteína de 10 kDa presente en la fracción C de una manera más específica, el extracto de caspa de caballo fue sometido a SEC como se ha descrito en el Ejemplo 1. El pico que contiene Equ c 1 se agrupó de acuerdo con el análisis por SDS-PAGE como se indica en la figura (pico A en la Fig. 4A). Sólo la parte derecha del pico A contenía una banda de 10 kDa y se incluyó en la agrupación. El grupo se ajustó a NH₄SO₄ 2 M y se sometió a HIC (Fig. 4B) como se describe para Equ c 1 en el Ejemplo 1. El Pico J en la Fig. 4B se diluyó 1:3 en Tris 20 mM, pH 8,0, y se aplicó a una columna SourceTM 15Q (PE 4,6/100, V_t = 1,7 ml; GE Healthcare Life Sciences) equilibrada en el mismo tampón. La elución se realizó con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,4 M, produciendo un pico dominante en el medio del gradiente, seguido por un pico más pequeño (picos K y L, Fig. 4C). El análisis por SDS-PAGE se realizó usando el sistema de tampón NuPAGE MES como se ha descrito en el Ejemplo 1, donde se prepararon muestras mediante la dilución de la muestra de 1:3 en tampón NuPAGE LDS con o sin 4% β-mercaptoetanol para reducir y condiciones no reductoras, respectivamente. El análisis por SDS-PAGE de los dos picos (Fig. 4D) reveló una banda de aproximadamente 15 kDa en condiciones no reductoras. Tras la reducción de las muestras, la banda de 15 kDa desapareció, mientras que dos bandas de aproximadamente 5 y 10 kDa aparecieron, lo que sugiere que la banda no reducida de 15 kDa se compone de los polipéptidos que forman las bandas de 5 kDa y 10 kDa, vinculadas entre sí por uno o más puentes disulfuro. Aunque ambos picos parecían contener la misma proteína, sólo el gran pico (K) se sometió a análisis adicional bioquímico. Para el propósito de los estudios de unión de IgE, una etapa de purificación de refinación RPC se incluyó mediante la aplicación de la muestra a una columna de RPC SourceTM 5 (ST 2.1/150, V_t = 0,52 mL; GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con 0,065% de TFA en agua. La elución se realizó en un gradiente lineal de 0 a 70% de tampón B, que consiste en 0,05% de TFA en 90% de acetonitrilo. La proteína se eluyó en un pico único cerca del final del gradiente (pico M, Fig. 4E).

Identificación de la proteína de 15 kDa de caspa de caballo como una secretoglobina

Las bandas de proteínas reducidas de 5 kDa y 10 kDa, extirpadas y extraídas de un gel de SDS-PAGE, se analizaron por secuenciación del extremo N-terminal. El análisis de la banda de 5 kDa reveló la secuencia de aminoácidos ATxPAVATDIASFFLLPDSL (x: resto sin resolver), restos coincidentes 22-41 de la secuencia de *Equus caballus* predicha denotada "similar a LppAB" (GenBank Acc no XP_001502544) (SEQ ID NO: 1). El análisis de la banda de 10 kDa reveló la secuencia GSGxQLLEDVVEKTITAELS (x: restos sin resolver), restos coincidentes 19-38 de una secuencia predicha denotada "similar a lipophilin CL2" de *Equus caballus* (GenBank Acc no XP_001494564) (SEQ ID NO: 2).

El análisis de las huellas dactilares de la masa de péptido (PMF) de la proteína purificada de 15 kDa por MALDI-TOF MS de una digestión de tripsina en solución no dio lugar a ninguna coincidencia significativa (p <0,05) frente a las entradas de bases de datos conocidos. Sin embargo, el análisis de MS-MS de los péptidos m/z = 2281 y m/z = 1262,5 identificaron la secuencia QCINEISAGDRYIITETLGG (SEQ ID NO: 3) a partir de la secuencia predicha "similar a LppAB" (*Equus caballus*) (GenBank Acc no XP_001502544).

El análisis de las huellas dactilares de la masa de péptido (PMF) por MALDI-TOF MS del fragmento de 5 kDa digerido por tripsina en gel no dio lugar a ninguna coincidencia significativa (p <0,05) respecto a las entradas de bases de datos conocidas. Sin embargo, los cinco péptidos dominantes detectados todo correspondieron realmente con los fragmentos de tripsina anticipados de la SEQ ID NO: 4 donde m/z = 903,47 (correspondiente al resto 28-35), m/z = 1037,6 (restos 43-53), m/z = 1262,6 (resto 43-53), m/z = 2281,1 (restos 43-62) y m/z = 2384,2 (restos 1-22), que en la cobertura total de 50 (72%) de los restos de aminoácidos predichos de SEQ ID NO: 4.

El análisis de las huellas dactilares de la masa de péptido (PMF) por MALDI-TOF MS de la banda de 10 kDa digerida con tripsina en gel no dio lugar a ninguna coincidencia significativa (p <0,05) respecto a las entradas de las bases de datos conocidas. Sin embargo, los dos péptidos dominantes detectados fueron m/z = 1433,6 y m/z = 2880,4, lo que es consistente con la masa de los péptidos GSGCQLLEDVVEK y TITAE LSPA EYVEAVQEFIPDEATEK, respectivamente, correspondiente a los restos 1-13 y 14-39 de la SEQ ID NO: 5.

Las secuencias de aminoácidos de las dos entradas de la base de datos identificadas, XP_001502544 (SEQ ID NO: 6) y XP_001494564 (SEQ ID NO: 7), contenían rasgos característicos de la familia de proteínas de secretoglobina. Por lo tanto, en conjunto, los resultados identifican la proteína de la caspa de caballo de 15 kDa como una secretoglobina. Esta proteína se denomina en lo sucesivo Equ c 15k. Las secuencias precursoras de las secuencias de longitud completa predichas de las dos cadenas de Equ c 15k se muestran en la Fig. 5 (5 kDa fragmento - SEQ

ID NO: 6; fragmento de 10 kDa - SEQ ID N° 7), donde los aminoácidos identificados por secuenciación del extremo N-terminal están subrayados y los identificados por análisis de MS-MS se muestran en negrita. La secuencia del precursor para el fragmento de 5 kDa incluye un péptido señal N-terminal de 21 aminoácidos, y la secuencia del precursor para el fragmento de 10 kDa incluye un péptido señal N-terminal de 18 aminoácidos. Es de señalar que la predicción del péptido señal de la secuencia del precursor utilizando SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) da como resultado las mismas secuencias maduras que las obtenidas experimentalmente tanto para las cadenas de 5 kDa como de 10 kDa.

El análisis SDS-PAGE en la Fig. 4D proporciona evidencias de que las cadenas de aminoácidos de 5 y 10 kDa se mantienen unidas por uno o más puentes disulfuro en condiciones no reductoras, formando de este modo una proteína heterodimérica. Por lo tanto, los análisis vinculan en conjunto un gen que codifica una secuencia de la SEQ ID No 4 con un gen diferente que codifica la SEQ ID N° 5 que juntos forman una proteína heterodimérica de secretoglobina previamente desconocida.

Ejemplo 5: Evaluación de la unión de IgE a Equ c 15k mediante análisis de inmunotransferencia

Con el fin de determinar a qué subunidad de Equ c 15k fue dirigida la reactividad de IgE frente a la proteína, se realizó un análisis de inmunotransferencia utilizando tanto condiciones reductoras como no reductoras.

El análisis por inmunotransferencia se realizó en muestras reducidas y no reducidas de Equ c 15k purificado separado por SDS-PAGE usando un gel NuPAGE al 4-20% (Invitrogen) y se electrotransferieron sobre una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (GE Healthcare Life Sciences). Las transferencias de proteínas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente usando tampón de bloqueo (50 mM de fosfato a pH 7,4, 0,1% (v/v) TWEEN™ 20, 0,9% (p/v) de NaCl, 0,3% (p/v) de dextrano T10) y después se incubaron durante la noche con suero de los pacientes 3 y 12, diluidos 1:4,8 y 1:13,5, respectivamente, en tampón de bloqueo. Después de lavar con 0,15 M de NaCl que contiene 0,5% (v/v) de Tween-20, la membrana se incubó 3 horas con un anticuerpo anti-IgE humano marcado con HRP en tampón de bloqueo y, después del lavado, la IgE unida se detectó fluorométricamente utilizando un Kit de Detección Advanced Western Blot ECL (GE Healthcare Life Sciences) y una cámara CCD Mini LAS 4000 (Fujifilm, Tokio, Japón).

Los dos sueros utilizados en el análisis (pacientes No. 3 y 12) ambos tenían una reactividad dominante para Equ c 15k de acuerdo con el análisis ImmunoCAP™ (véase el ejemplo 7 a continuación). Ambos sueros reaccionaron débilmente con las subunidades de Equ c 15k, se disociaron en condiciones reductoras, visibles como bandas débiles correspondientes a la reducción de las subunidades 5 kDa y 10 kDa (Fig. 6). En condiciones no reductoras, se observó una reactividad mucho más fuerte con una banda que coincide con la banda no reducida 15 kDa de Equ c 15k. No se observó reactividad significativa frente a otras bandas en este análisis. Este análisis de inmunotransferencia muestra que la reactividad de unión a IgE está, en efecto, dirigida a las principales bandas de proteínas en la preparación de Equ c 15k.

Ejemplo 6: Producción y caracterización inmunológica recombinante de Equ c 15k

Clonación y purificación de Equ c 15k recombinante

Un gen de una sola cadena Equ c 15k sintético se diseñó mediante la combinación de secuencias de nucleótidos que codificaban las secuencias de aminoácidos de subunidades de 5 kDa y 10 kDa con una secuencia que codificaba un péptido enlazador que comprendía 3x (Gly-Gly-Gly- Gly- Ser). El gen sintético de longitud completa se clonó en los sitios NdeI y XhoI del vector pET23a(+) (Novagen, Madison, WI, EE.UU.), añadiendo un marcador de hexahistidina del extremo C-terminal para permitir la purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC).

La secuencia de aminoácidos de toda la proteína recombinante se muestra en la SEQ ID NO: 8. La secuencia de nucleótidos fue diseñada para el uso óptimo de codones en E. coli (DNA2.0, Menlo Park, CA, EE.UU.). La secuencia de ácido nucleico que codificaba toda la proteína recombinante se muestra en la SEQ ID NO: 9.

La construcción del plásmido de ADN se transformó en la cepa de E. coli BL21-AI (Invitrogen) y la proteína de la única cadena de Equ c L5K recombinante fue producida usando un bioreactor de 3 litros (Belach Bioteknik, Solna, Suecia).

Para la purificación del Equ c 15k recombinante, las células cosechadas se resuspendieron en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, y se lisaron haciendo pasar la suspensión a través de un homogeneizador Emulsiflex C5 (Avestin, Ottawa, Ontario, Canadá) a 10000 a 15000 kPa. Después de la centrifugación de la suspensión, los cuerpos de inclusión sedimentados se disolvieron en 6 M de guanidina-HCl, Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 0,5 M, imidazol 5 mM y se filtraron a través de filtros de celulosa mezclados de 0,45 µm (Millipore). El sobrenadante filtrado se aplicó a una columna de Sepharose quelante FF (GE Healthcare Life Sciences), cargada con NiSO₄. El lavado en la columna se realizó con urea 6 M en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 0,15 M, 20 mM de imidazol seguido de una renaturalización in situ por un gradiente lineal de 6 M a 2 M de urea en el mismo tampón. Después de la renaturalización, la proteína recombinante se eluyó en un gradiente lineal desde 20 hasta 500 mM de imidazol en el mismo tampón. La purificación adicional de la proteína recombinante se realizó por AIEC en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 usando una columna de Q Sepharose™

FF (GE Healthcare Life Sciences). La proteína se eluyó usando un gradiente lineal desde 0 hasta 0,5 M de NaCl y las fracciones se agruparon de acuerdo a los resultados de SDS-PAGE. La concentración de proteína de la preparación final se determinó a partir de la absorbancia a 280 nm, usando un coeficiente de extinción calculado de 0,44 por mg/mL

5 Evaluación de la unión de IgE a Equ c 15k recombinante

Se inmovilizó el Equ c 15k recombinante a ImmunoCAPTM experimental y la reactividad de IgE frente a los sueros de 36 sujetos sensibilizados a la caspa de caballos se determinó como se describe (Marknell DeWitt et al. 2002).

10 Hubo un buen acuerdo ($r = 0,98$) entre la unión de IgE a Equ c 15k nativo purificado y el Equ c 15k recombinante (Fig. 7), lo que demuestra que la proteína recombinante era inmunológicamente activa y estructuralmente similar a la proteína nativa. Estos datos proporcionan una fuerte evidencia de que la secuencia de aminoácidos de los fragmentos de Equ c 15k de 5 kDa (SEQ ID NO: 4) y 10 kDa (SEQ ID NO: 5), como se predijo a partir de la información de la secuencia genómica identificada, son correctos y representan la secuencia de aminoácidos del alérgeno Equ c 15k de caspa de caballo purificado.

15 Ejemplo 7: Evaluación de la actividad de unión a IgE de nEqu c 1, nEqu c 2, nEqu 3 c, nEqu 4/5 c y Equ c 15k en una cohorte de pacientes alérgicos al caballo

20 Se utilizaron en el estudio sueros de 25 sujetos alérgicos al caballo de España ($n = 20$) y Suecia ($n = 5$). Todos los pacientes tenían un diagnóstico médico de alergia a caballo con síntomas tales como el asma, rinoconjuntivitis y urticaria, y presentaban una prueba cutánea positiva frente al extracto de caspa de caballo. Todas las muestras y los datos clínicos fueron recogidos bajo la aprobación del comité de ética local en cada centro contribuyendo al banco biológico en el que se habían depositado las muestras y los datos.

25 Los niveles de anticuerpos IgE específicos frente al extrato de caspa de caballo, nEqu c 1, nEqu c 2, nEqu c 3 y nEqu c 4/5 y rEqu c 15k entre los 25 sujetos alérgicos al caballo se determinaron utilizando ImmunoCAPTM (fig. 8, Tabla 3). En la Tabla 3, todos los niveles de ImmunoCAPTM se muestran como kU_A/L y el origen de cada paciente se indica mediante ES (España) o SE (Suecia). Los síntomas alérgicos grabados bajo la exposición a caballo son la rinitis (Rin), el asma (ASTM), la urticaria (URT) o la anafilaxia (anaph).

30 De los 25 sueros analizados, 12 (48%) mostraron una respuesta $IgE \geq 0,35$ kU_A/L frente a rEqu c 15k, 16 (64%) frente a nEqu c 2 y 19 (76%) frente a nEqu c 1. Tanto nEqu c 3 como nEqu c 4/5 aparecieron como alérgenos menores entre los sujetos estudiados, uniéndose a IgE ab solamente a 5 (20%) y 7 (28%) de los sueros ensayados, respectivamente. Cuatro de los 25 sueros (16%) reaccionaron exclusivamente frente a Equ c 15k. En promedio entre todos los sueros Equ c 15k reactivos, la concentración de anticuerpo IgE frente a Equ c 15k ascendió a 37% respecto a los de la caspa de caballo. La concentración relativa correspondiente de anticuerpo IgE frente a nEqu c 1 fue del 52%, mientras que para nEqu c 2, nEqu c 3 y nEqu c 4/5 las concentraciones relativas fueron 35%, 69% y 9%, respectivamente, entre los sueros específicamente reactivos a esos alérgenos. Veinticuatro de los 25 sueros mostraron anticuerpos IgE de unión al extracto de caspa de caballo. Todos los sueros mostraron unirse a al menos uno de los cinco alérgenos del caballo individuales ensayados. La suma de los niveles de unión a IgE para el componente individual igualó o superó la del extracto de caspa de caballo.

35 Ejemplo 8: Sensibilización independiente frente a Equ c 15k y secretoglobina de gato, el principal alérgeno de gato Fel d 1

40 Ya que Equ c 15k pertenece a la familia de proteínas de secretoglobina, se investigó la relación inmunológica frente al alérgeno principal del gato, el Fel d 1, que pertenece a la misma familia de proteínas. Los niveles de IgE que se unen a Fel d 1 se evaluaron en el suero de 36 sujetos sensibilizados a la caspa de caballo, incluidos los 25 pacientes alérgicos al caballo descritos en el Ejemplo 7. No hay correlación significativa ($r = 0,36$) entre los niveles de IgE frente a Equ c 15k recombinante y d rFel 1 podría ser detectado (Fig. 9), lo que sugiere que la respuesta de los anticuerpos IgE frente a Equ c 15k no era predominantemente el resultado de una reactividad cruzada entre equ c 15k y Fel d 1, y viceversa.

45 Con el fin de investigar más a fondo la reactividad cruzada potencial entre Equ c 15k y Fel d 1, ocho sueros que presentaban una reactividad significativa de unión de anticuerpos a IgE a ambos Fel d 1 y Equ c 15k se ensayaron para determinar la inhibición cruzada, utilizando tanto rEqu c 15k como rFel d 1 en fase sólida, así como nEqu c 15k y rFel d 1 como inhibidores a una concentración final de 100 g/ml (Fig. 10). Como un control de inhibición, se utilizó diluyente de IgE (Phadia). Los medios de las determinaciones duplicadas de cada inhibición se calcularon y la fracción de inhibición se calculó como la fracción de la unión usando el inhibidor del diluyente que podía ser inactivado con cada inhibidor. En estos sueros seleccionados, la inhibición por Fel d 1 podía sólo lograrse con la unión a Fel d 1 en fase sólida. Del mismo modo, la inhibición usando Equ c 15k sólo era posible en Equ c 15k en fase sólida lo que indica que en estos sujetos la sensibilización a estos frente a moléculas ocurría independientemente entre sí y no era consecuencia del resultado de la reactividad cruzada. Sin embargo, la presencia de una reactividad cruzada débil entre las dos proteínas no se puede descartar por completo.

Tabla 1

No	Caspa de caballo	nEqu c 1 A	nEqu c 4/5	nEqu c 2	Suma de componentes	Covertura de componentes (%)
A1	44,25	4,39	0,18	0,63	5,21	12%
A2	17,08	7,96	0,83	1,40	10,20	60%
A3	136,97	58,75	14,99	30,51	104,24	76%
A4	11,57	1,82	0,14	0,13	2,09	18%
A5	10,43	6,47	0,20	0,54	7,21	69%
A6	12,86	2,34	0,12	4,96	7,42	58%
A7	9,19	5,60	1,15	1,12	7,87	86%
A8	7,26	3,37	0,17	2,07	5,60	77%
A9	11,34	4,69	1,11	1,90	7,70	68%
A10	33,75	3,65	0,26	20,01	23,92	71%
A11	7,39	1,09	5,34	0,85	7,28	99%
A12	42,79	26,87	1,06	6,34	34,27	80%
A13	0,45	0,06	0,07	0,26	0,39	87%
A14	36,70	13,32	4,25	9,41	26,98	74%
A15	16,94	3,73	0,11	2,78	6,63	39%
A16	1,01	3,05	0,07	0,10	3,22	319%
A17	4,97	1,36	0,42	2,03	3,81	77%
A18	13,40	6,10	0,15	0,91	7,16	53%
A19	7,14	2,36	0,08	0,10	2,54	36%
A20	5,20	0,24	0,50	0,20	0,94	18%
A21	32,75	16,16	0,24	0,87	17,27	53%
A22	13,46	3,49	0,15	0,74	4,38	33%
A23	15,28	5,09	0,16	4,30	9,55	62%
A24	198,77	130,15	94,19	87,00	311,33	157%
A25	42,70	11,66	7,05	13,30	32,01	75%
A26	6,55	3,23	0,36	1,77	5,36	82%
A27	27,61	8,55	0,24	5,86	14,65	53%
A28	8,43	4,85	0,14	0,13	5,11	61%
A29	27,12	12,81	0,67	3,29	16,77	62%

Tabla 2

No	Fracción A	Fracción B	Fracción C	Caspa de caballo	Suma de componentes
A1	0,16	3,54	17,82	44,25	5,21
A4	0,10	1,28	1,09	11,57	2,09
A6	0,00	4,94	6,80	12,86	7,42
A15	0,25	2,64	3,73	16,94	6,63
A18	0,06	4,01	6,06	13,40	7,16
A19	0,05	1,08	1,97	7,14	2,54
A20	0,00	1,93	1,67	5,20	0,94
A21	0,09	21,23	25,99	32,75	17,27
A22	0,05	8,45	11,75	13,46	4,38
A27	0,50	14,11	15,39	27,61	14,65

Tabla 3

Paciente Nº	sintomas	País	e3	nEqu c 1	nEqu c 2	nEqu c 3	nEqu c 4/5	rEqu c 15k
1	Rhin	SE	1,55	0,06	0,21	0,12	0,30	1,31
2	Rhin, astm	SE	1,28	1,24	0,56	0,00	0,16	0,03
3	Rhin	ES	4,79	1,42	0,13	0,00	0,04	1,89
4	Rhin, astm	ES	5,87	4,96	2,32	0,07	0,53	0,16
5	Rhin, astm	ES	1,79	1,28	0,26	0,01	0,15	0,04
6	Rhin, astm	ES	8,74	5,41	5,56	0,00	0,34	0,02
7	Rhin, astm	ES	0,21	0,00	0,02	0,00	0,02	0,20
8	Rhin, astm	ES	4,55	1,41	2,02	0,00	0,53	0,86
9	Rhin	ES	0,55	0,00	0,01	0,00	0,02	0,63
10	Rhin, astm, urt, anaph	ES	17,31	6,20	2,67	11,90	3,11	6,07
11	Rhin	ES	16,62	1,30	15,15	5,04	0,86	0,10
12	Rhin, urt	ES	13,49	2,91	1,19	0,03	0,30	12,96
13	Rhin, astm, urt	SE	26,19	11,04	7,48	0,05	2,94	5,68
14	Rhin	SE	6,58	3,42	1,08	0,01	0,48	1,16
15	Rhin, astm	SE	7,01	0,03	0,04	0,04	0,20	7,45
16	Rhin	ES	6,78	5,77	0,95	9,43	0,28	0,02
17	Rhin	ES	28,73	21,92	5,89	33,75	1,19	0,24
18	Rhin, urt	ES	13,81	5,44	14,10	0,05	0,13	0,07
19	Rhin, astm	ES	5,18	0,06	0,08	0,06	0,18	5,81
20	Rhin, astm	ES	0,78	0,76	0,09	0,01	0,02	0,02
21	Rhin, astm	ES	1,96	1,63	0,58	0,01	0,16	0,04
22	Rhin, urt	ES	1,28	0,24	1,75	0,01	0,02	0,06
23	Rhin, astm	ES	6,94	2,49	0,30	0,00	0,10	1,36
24	Rhin, astm	ES	3,18	1,46	1,31	0,00	0,13	0,60
25	Rhin	ES	7,78	5,46	1,32	4,61	0,08	0,03

- Dandeu, J. P., J. Rabillon, et al. (1993). "Hydrophobic Interaction Chromatography for Isolation and Purification of Equ.Cl, the Horse Major Allergen." *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* 621(1): 23-31.
- Demoly, P., B. Lebel, et al. (2003). "Allergen-induced mediator release tests." *Allergy* 58(7): 553-558.
- 5 Ebo, D. G., M. M. Hagendorens, et al. (2004). "In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow [Review]." *Clinical & Experimental Allergy* 34(3): 332-339.
- Goubran Botros, H., C. Gregoire, et al. (1996). "Cross-antigenicity of horse serum albumin with dog and cat albumins: study of three short peptides with significant inhibitory activity towards specific human IgE and IgG antibodies." *Immunology* 88(3): 340-347.
- 10 Goubran Botros, H., P. Poncet, et al. (2001). "Biochemical characterization and surfactant properties of horse allergens." *Eur J Biochem* 268(10): 3126-3136.
- Goubran Botros, H., J. Rabillon, et al. (1998). "Thiophilic adsorption chromatography: purification of Equ c2 and Equ c3, two horse allergens from horse sweat." *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences & Applications* 710(1-2): 57-65.
- 15 Gregoire, C., I. Rosinski-Chupin, et al. (1996). "cDNA cloning and sequencing reveal the major horse allergen Equ cl to be a glycoprotein member of the lipocalin superfamily." *Journal of Biological Chemistry* 271(51): 32951-32959.
- Gronlund, H., T. Saarne, et al. (2009). "The Major Cat Allergen, Fel d 1, in Diagnosis and Therapy." *Int Arch Allergy Immunol* 151(4): 265-274.
- Hiller, R., S. Laffer, et al. (2002). "Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment." *FASEB Journal* 16(3): 414-416.
- 20 Jutel, M., L. Jaeger, et al. (2005). "Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens." *J Allergy Clin Immunol* 116(3): 608-613.
- Kim, J. L., L. Elfman, et al. (2005). "Current asthma and respiratory symptoms among pupils in relation to dietary factors and allergens in the school environment." *Indoor Air* 15(3): 170-182.
- 25 Klug, J., H. M. Beier, et al. (2000). "Uteroglobin/Clara cell 10-kDa family of proteins: nomenclature committee report." *Ann N Y Acad Sci* 923: 348-354.
- Liccardi, G., G. D'Amato, et al. (2011). "Sensitization to Horse Allergens in Italy: A Multicentre Study in Urban Atopic Subjects without Occupational Exposure." *Int Arch Allergy Immunol* 155(4): 412-417.
- Marknell DeWitt, A., V. Niederberger, et al. (2002). "Molecular and immunological characterization of a novel timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen, Phi p 11." *Clinical & Experimental Allergy* 32(9): 1329-1340.
- 30 Mattsson, L., T. Lundgren, et al. (2009). "Prostatic kallikrein: A new major dog allergen." *J Allergy Clin Immunol* 123(2): 362-368.
- McDonald, R. E., R. I. Fleming, et al. (2009). "Latherin: a surfactant protein of horse sweat and saliva." *PLoS One* 4(5):e5726.
- 35 Ronmark, E., M. Perzanowski, et al. (2003). "Different sensitization profile for asthma, rhinitis, and eczema among 7-8-year-old children: report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden studies." *Pediatr Allergy Immunol* 14(2): 91-99.
- Saarelainen, S., M. Rytönen-Nissinen, et al. (2008). "Animal-derived lipocalin allergens exhibit immunoglobulin E cross-reactivity." *Clin Exp Allergy* 38(2):374-381.
- 40 Saarne, T., L. Kaiser, et al. (2005). "Rational design of hypoallergens applied to the major cat allergen Fel d 1." *Clin Exp Allergy* 35(5): 657-663.
- Smith, W., A. J. Butler, et al. (2004). "Fel d 4, a cat lipocalin allergen." *Clinical & Experimental Allergy* 34(11): 1732-1738.
- 45 Spitzauer, S., C. Schweiger, et al. (1993). "Characterisation of dog allergens by means of immunoblotting." *International Archives of Allergy and Immunology* 100: 60-67.
- Stumvoll, S., K. Westritschnig, et al. (2003). "Identification of cross-reactive and genuine *Parietaria judaica* pollen allergens." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111(5): 974-979.
- Tutluoglu, B., S. Atis, et al. (2002). "Sensitization to horse hair, symptoms and lung function in grooms." *Clin Exp Allergy* 32(8): 1170-1173.

Wainstein, B. K., A. Yee, et al. (2007). "Combining skin prick, immediate skin application and specific-IgE testing in the diagnosis of peanut allergy in children." *Pediatr Allergy Immunol* 18(3): 231-239.

Valenta, R., J. Lidholm, et al. (1999). "The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT)." *Clinical and Experimental Allergy* 29(7): 896-904.

5 Valenta, R. and V. Niederberger (2007). "Recombinant allergens for immunotherapy." *J Allergy Clin Immunol* 119(4): 826-830.

Valenta, R., T. Twaroch, et al. (2007). "Component-resolved diagnosis to optimize allergen-specific immunotherapy in the Mediterranean area." *J Investig Allergol Clin Immunol* 17 Suppl 1: 36-40.

10 van Eijk, H. M., D. R. Rooyackers, et al. (1999). "Automated isolation of high- purity plasma albumin for isotope ratio measurements." *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications* 731(2): 199-205.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Phadia AB
 <120> Nuevo alérgeno
 <130> P9114PC00
- 10 <150> SE 1050406-6
 <151> 23-04-2010
 <160> 9
- 15 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 20
 <212> PRT
 20 <213> Equus caballus
 <400> 1
- Ala Thr Cys Pro Ala Val Ala Thr Asp Ile Ala Ser Phe Phe Leu Leu
 1 5 10 15
- Pro Asp Ser Leu
 20
- 25 <210> 2
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
- 30 <400> 2
 Gly Ser Gly Cys Gln Leu Leu Glu Asp Val Val Glu Lys Thr Ile Thr
 1 5 10 15
- Ala Glu Leu Ser
 20
- 35 <210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
- <400> 3
 Gln Cys Ile Asn Glu Ile Ser Ala Gly Asp Arg Tyr Ile Ile Thr Glu
 1 5 10 15
- 40 Thr Leu Gly Lys
 20
- <210> 4
 <211> 69
 <212> PRT
 45 <213> Equus caballus
 <400> 4

ES 2 592 956 T3

Ala Thr Cys Pro Ala Val Ala Thr Asp Ile Ala Ser Phe Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Pro Asp Ser Leu Phe Lys Leu Gln Leu Ile Lys Tyr Gln Ala Pro Pro
 20 25 30

Glu Ala Lys Asp Ala Thr Met Gln Val Lys Gln Cys Ile Asn Glu Ile
 35 40 45

Ser Ala Gly Asp Arg Tyr Ile Ile Thr Glu Thr Leu Gly Lys Ile Val
 50 55 60

Leu Gln Cys Gly Ala
 65

5 <210> 5
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> Equus caballus

<400> 5
 Gly Ser Gly Cys Gln Leu Leu Glu Asp Val Val Glu Lys Thr Ile Thr
 1 5 10 15

Ala Glu Leu Ser Pro Ala Glu Tyr Val Glu Ala Val Gln Glu Phe Ile
 20 25 30

Pro Asp Glu Ala Thr Glu Lys Ala Ala Ile Gln Leu Lys Gln Cys Tyr
 35 40 45

Leu Lys Gln Ser Asn Glu Thr Leu Asn Asp Phe Arg Thr Met Met Asn
 50 55 60

10 Ser Met Tyr Asn Ser Ala Tyr Cys Ala Leu Phe
 65 70 75

15 <210> 6
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Equus caballus

<400> 6
 Met Arg Leu Phe Leu Pro Val Leu Leu Val Thr Leu Ala Leu Cys Cys
 1 5 10 15

Cys Glu Thr Asn Ala Ala Thr Cys Pro Ala Val Ala Thr Asp Ile Ala
 20 25 30

20 Ser Phe Phe Leu Leu Pro Asp Ser Leu Phe Lys Leu Gln Leu Ile Lys

REIVINDICACIONES

1. Un alérgeno aislado de caballo que es una secretoglobina que tiene un peso molecular de 15 kDa en condiciones no reductoras y que comprende una primera cadena peptídica que tiene un peso molecular de 5 kD, que comprende la secuencia de aminoácidos
- 5 ATCPAVATDIASFFLLPDSLFLQLIKYQAPPEAKDATMQVKQCINEISAGDRYIITETLGKIVLQCGA (SEQ ID NO: 4), y una segunda cadena peptídica que tiene un peso molecular de 10 kDa, que comprende la secuencia de aminoácidos
- 10 GSGCQLLEDVVEKTITAELSPA EYVEAVQE FIPDEATEKAAIQLKQCYLKQSNETL NDFRTMMNSMYNSAYCALF (SEQ ID NO: 5), unidas juntas, o una variante o el fragmento del mismo que comparte epítopos para anticuerpos IgE con la misma, cuya variante o el fragmento del mismo tiene una identidad de secuencia frente a dicho alérgeno de caballo de al menos el 70%.
2. El alérgeno de caballo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la variante o el fragmento del mismo tiene una longitud de al menos 40, 50 ó 60 restos de aminoácidos de cada cadena en el heterodímero.
3. El alérgeno de caballo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que la variante o el fragmento del mismo tiene una identidad de secuencia frente a dicho alérgeno de caballo de al menos 80%, 90% o 95%.
- 15 4. El alérgeno de caballo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se purifica a partir de caballo o se produce recombinantemente.
5. Una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica el alérgeno de caballo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5.
7. Una célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 6.
8. El uso de un alérgeno de caballo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el diagnóstico in vitro de alergia Tipo 1.
9. Un método para producir una composición alergénica, que comprende la etapa de añadir un alérgeno de caballo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 a una composición que comprende un extracto de alérgeno y/o al menos un componente alérgeno purificado.
- 25 10. Una composición alergénica obtenible por el método según la reivindicación 9.
11. Un método para el diagnóstico in vitro de la alergia de tipo 1 que comprende las etapas de:
- 30 poner en contacto una muestra de fluido corporal que contiene inmunoglobulina de un paciente sospechoso de tener alergia Tipo 1 con un alérgeno de caballo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o con una composición alergénica según la reivindicación 12, y
- detectar la presencia, en la muestra, de anticuerpos de IgE que se unen específicamente al alérgeno de caballo, en el que la presencia de tales anticuerpos de IgE que se unen específicamente al alérgeno de caballo es indicativa de alergia Tipo 1.
- 35 12. Un kit diagnóstico para realizar el método según la reivindicación 11, que comprende un alérgeno de caballo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una composición según la reivindicación 10.
13. Un alérgeno de caballo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de alergia Tipo 1.
- 40 14. Una composición farmacéutica que comprende un alérgeno de caballo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y opcionalmente al menos uno de vehículos, excipientes, tampones y diluyentes.

Fig 1A

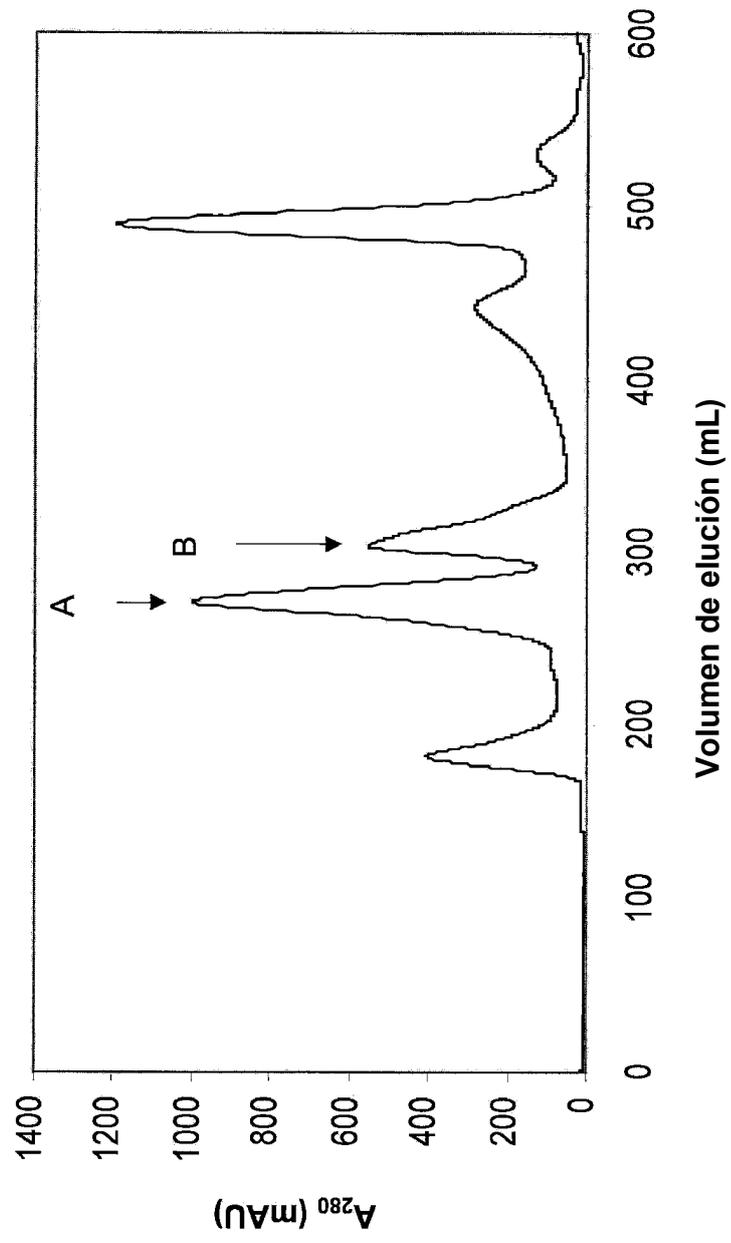


Fig 1B

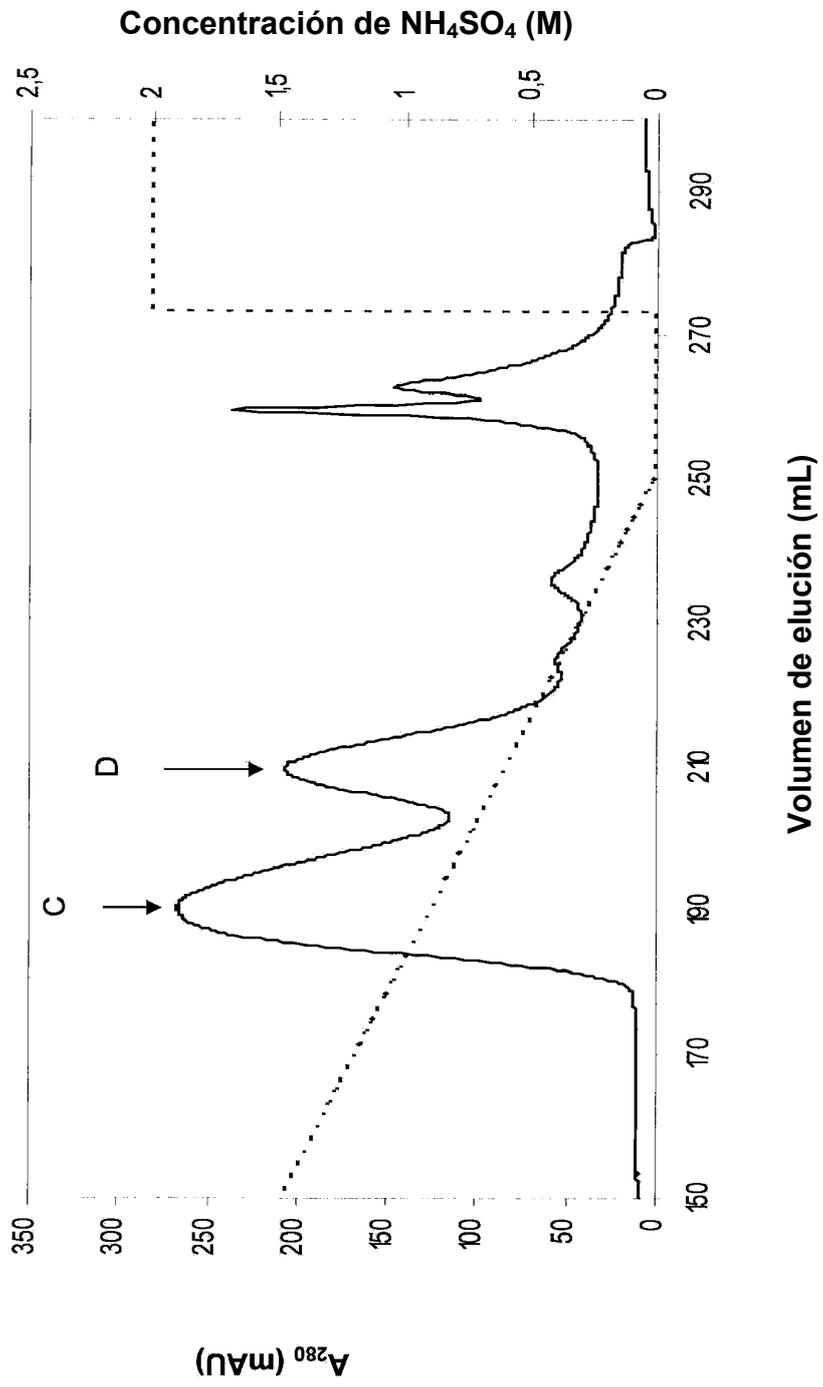


Fig 1C

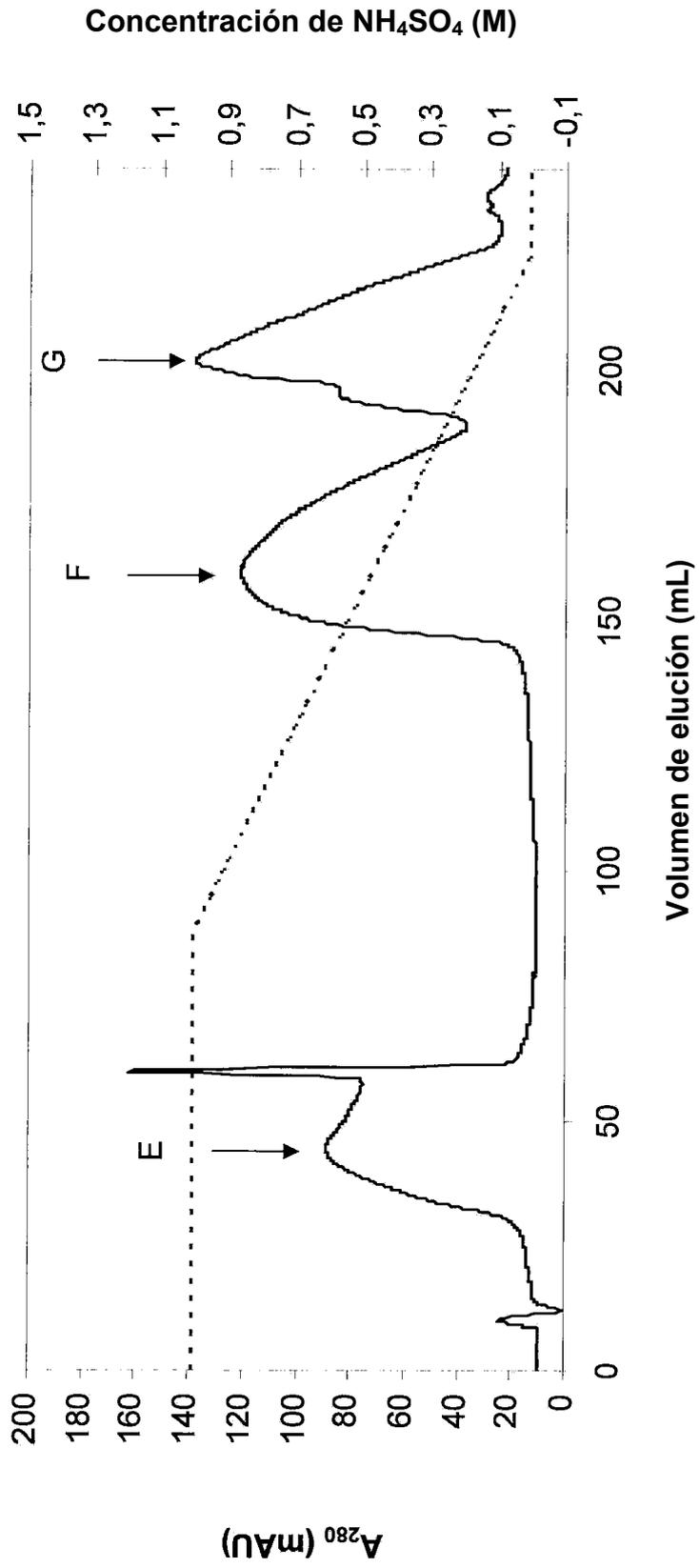


Fig 1D

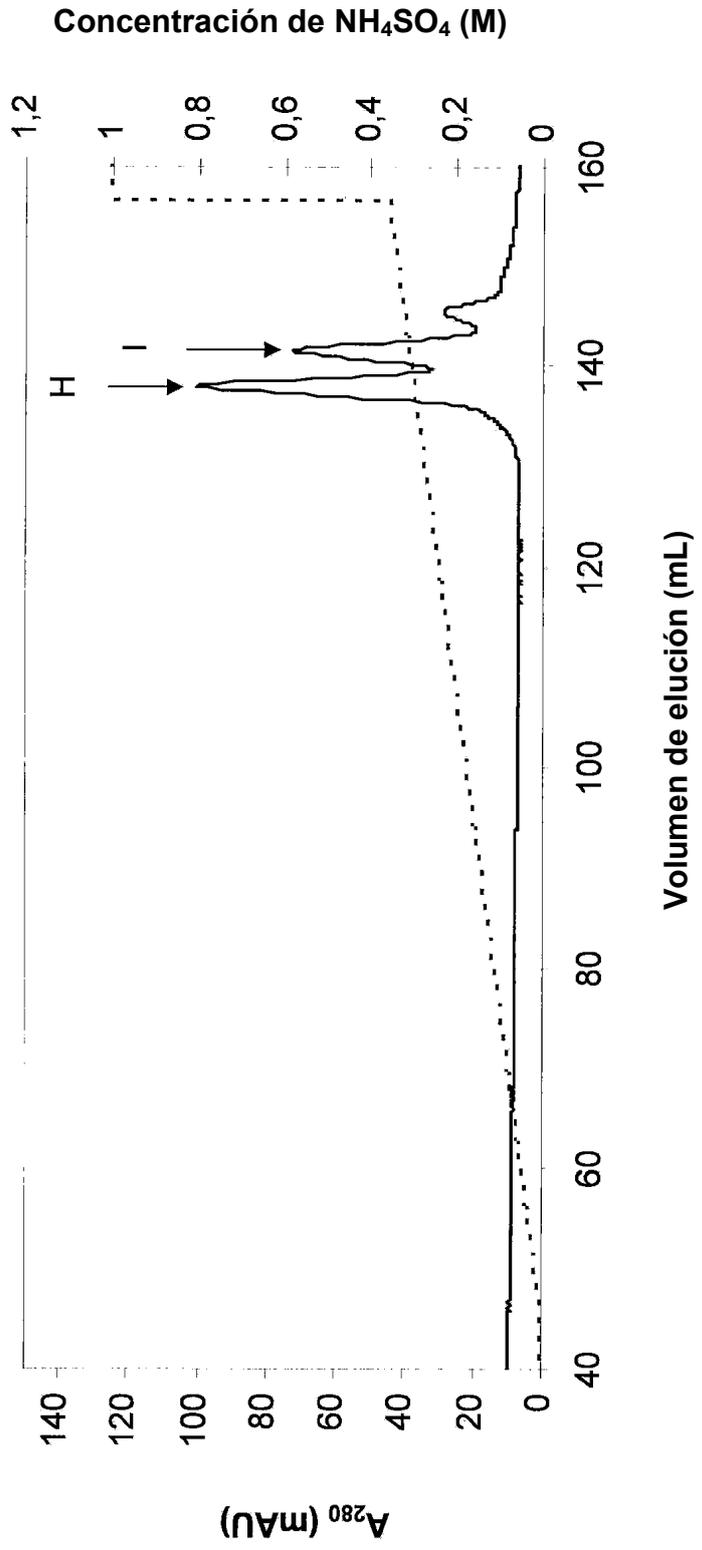
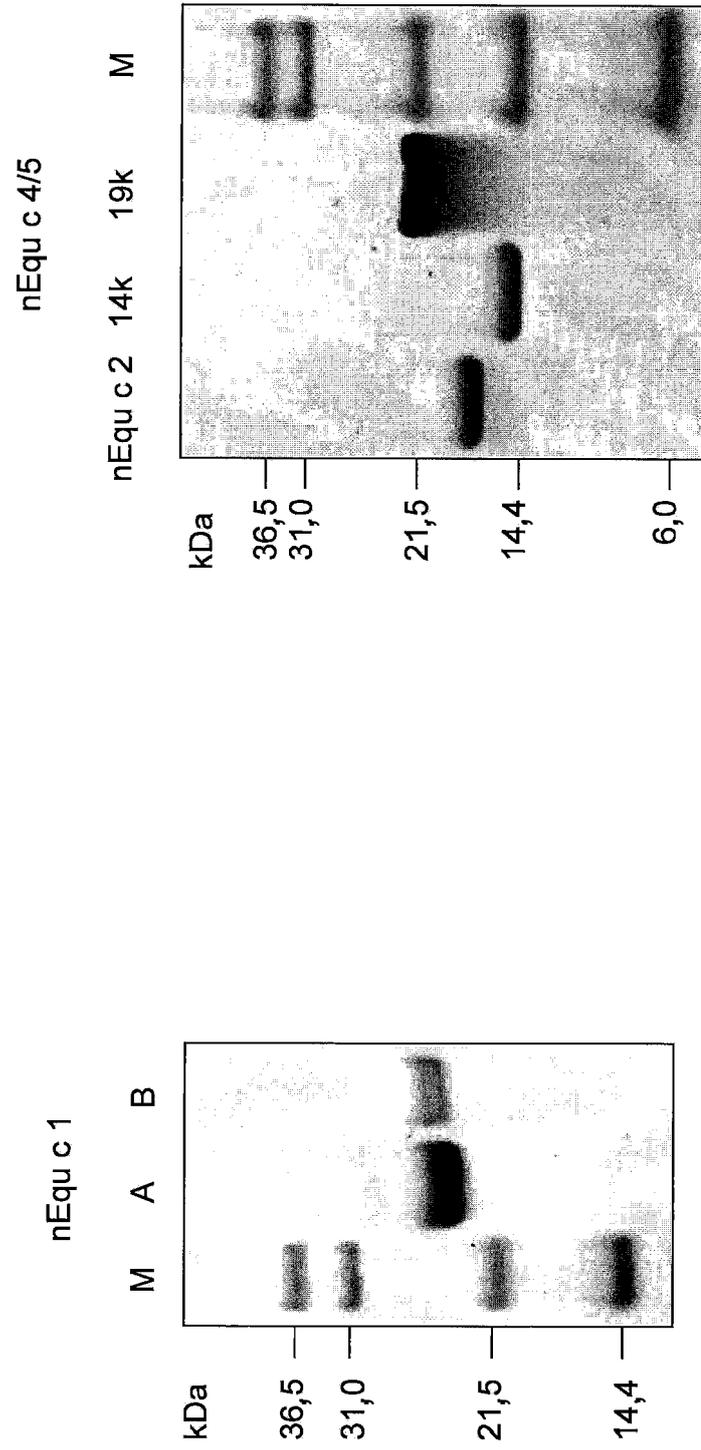


Fig 1E



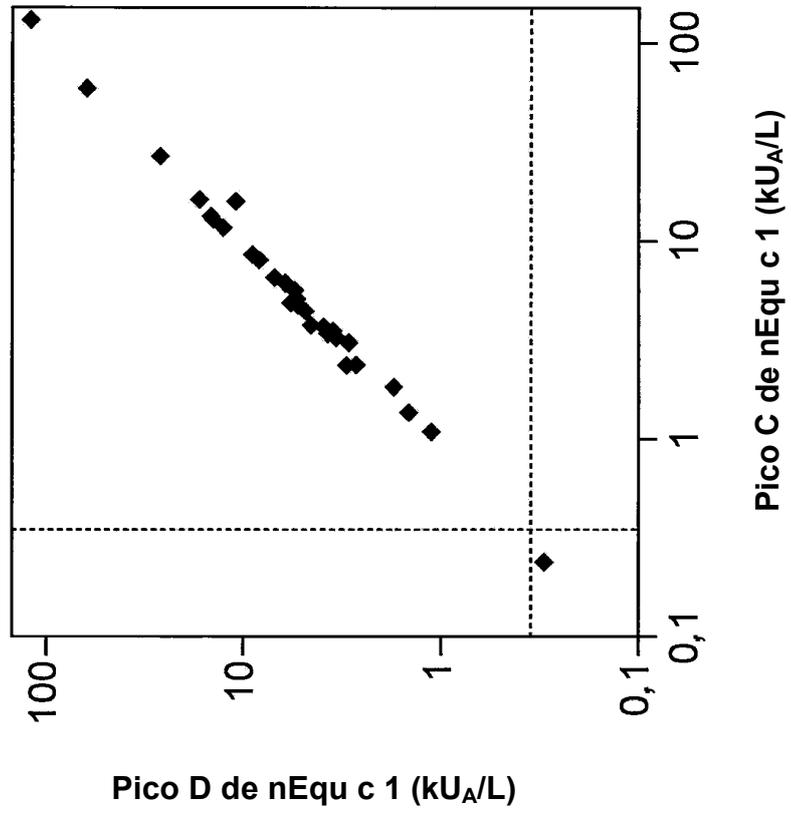


Fig 2A

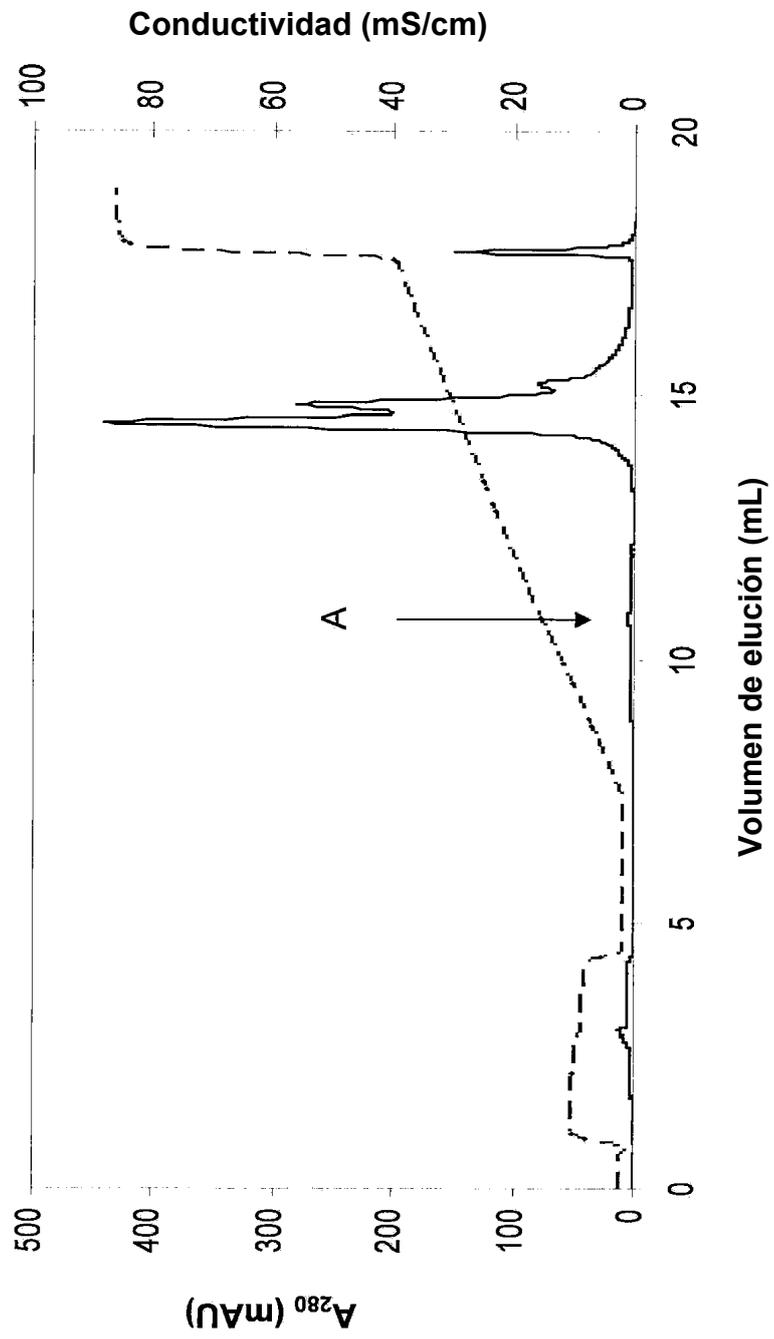


Fig 3A

Fig 3B

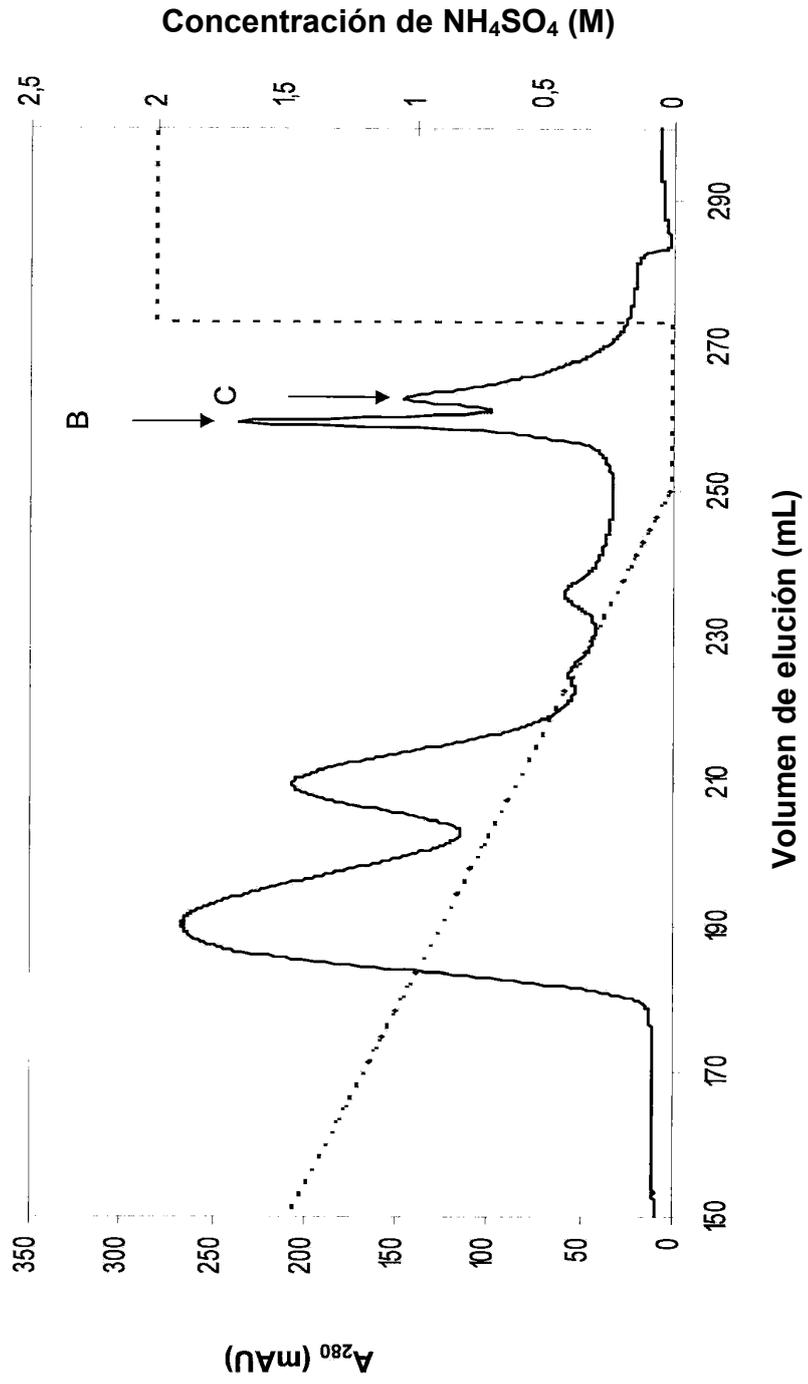


Fig 4A

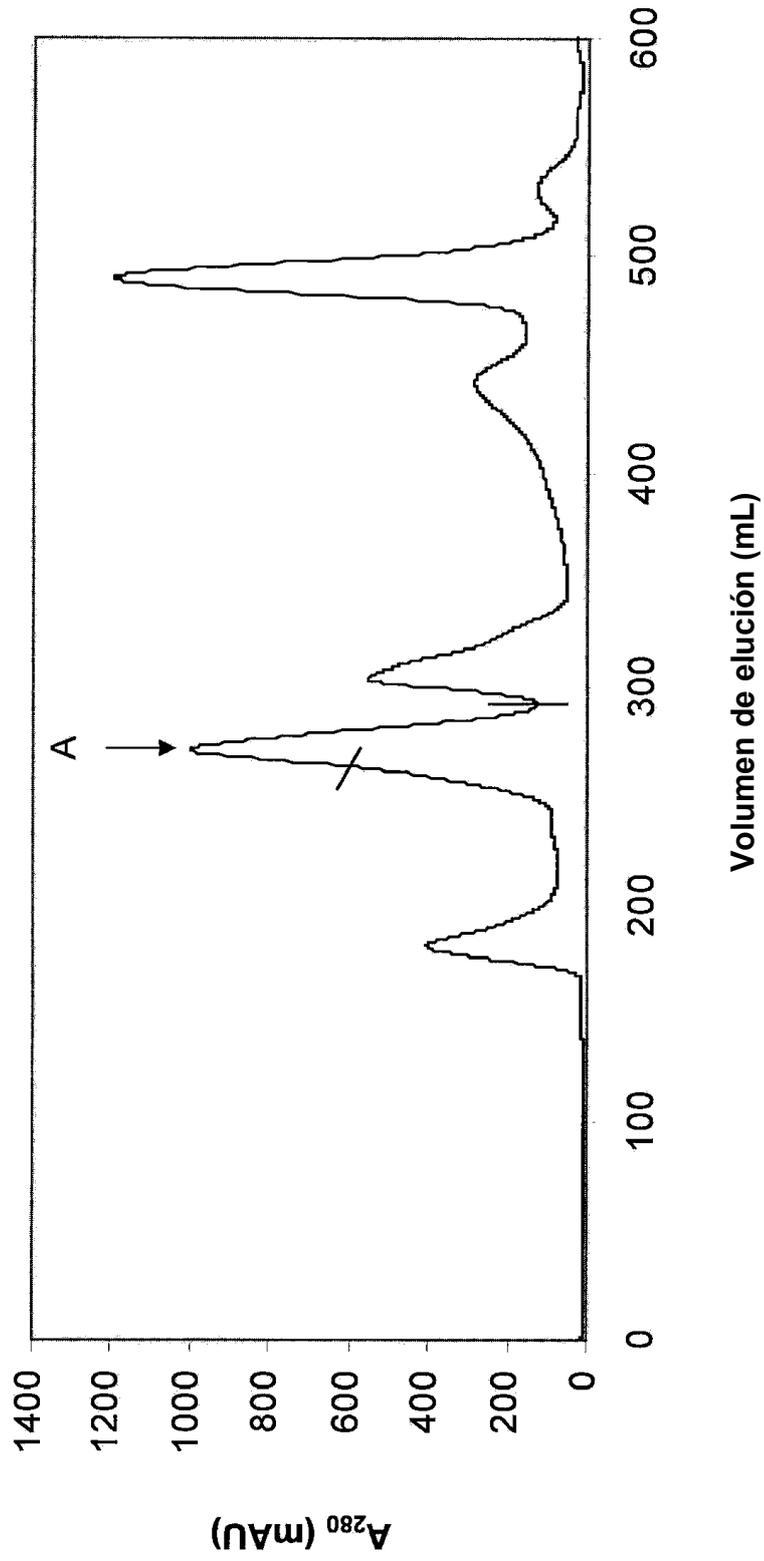
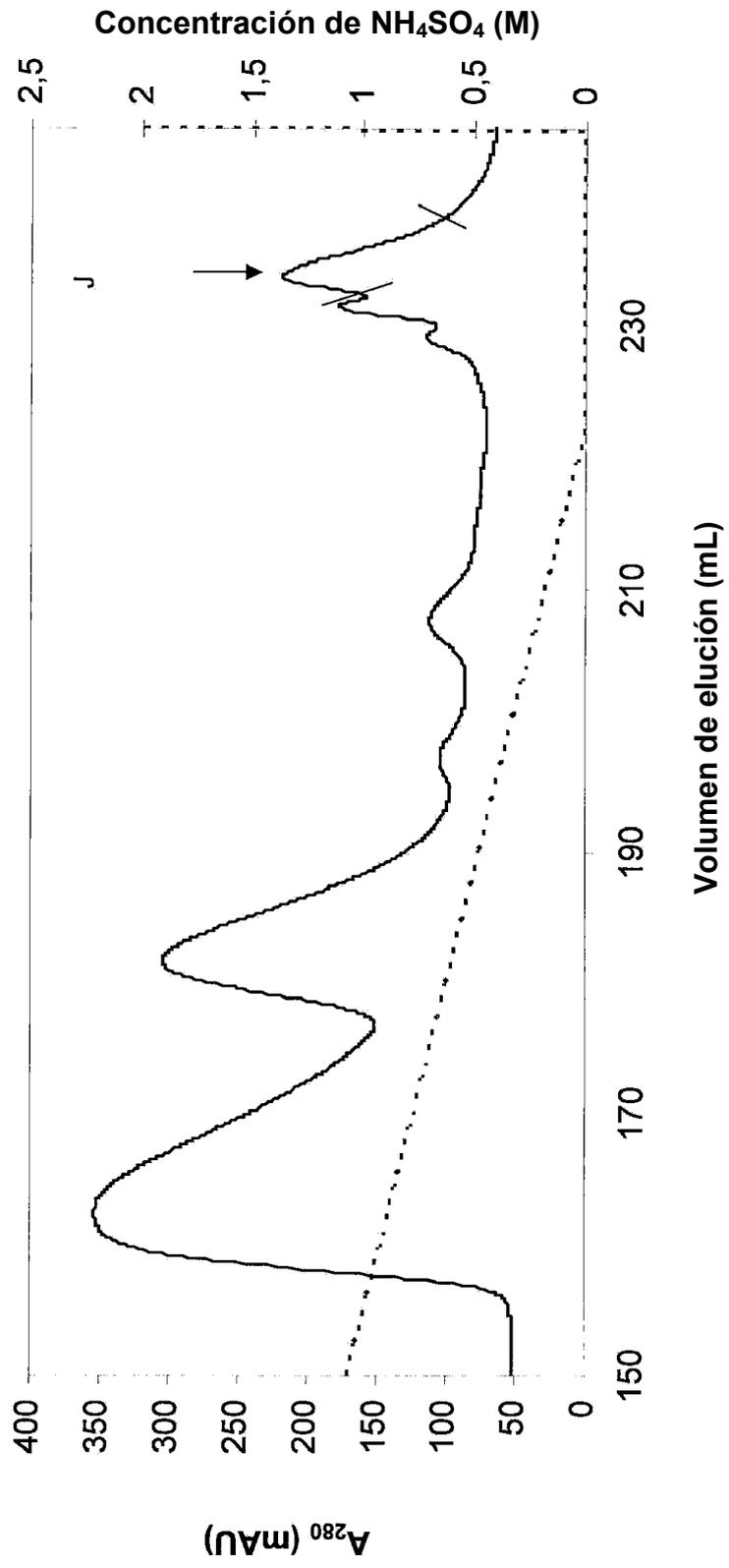


Fig 4B



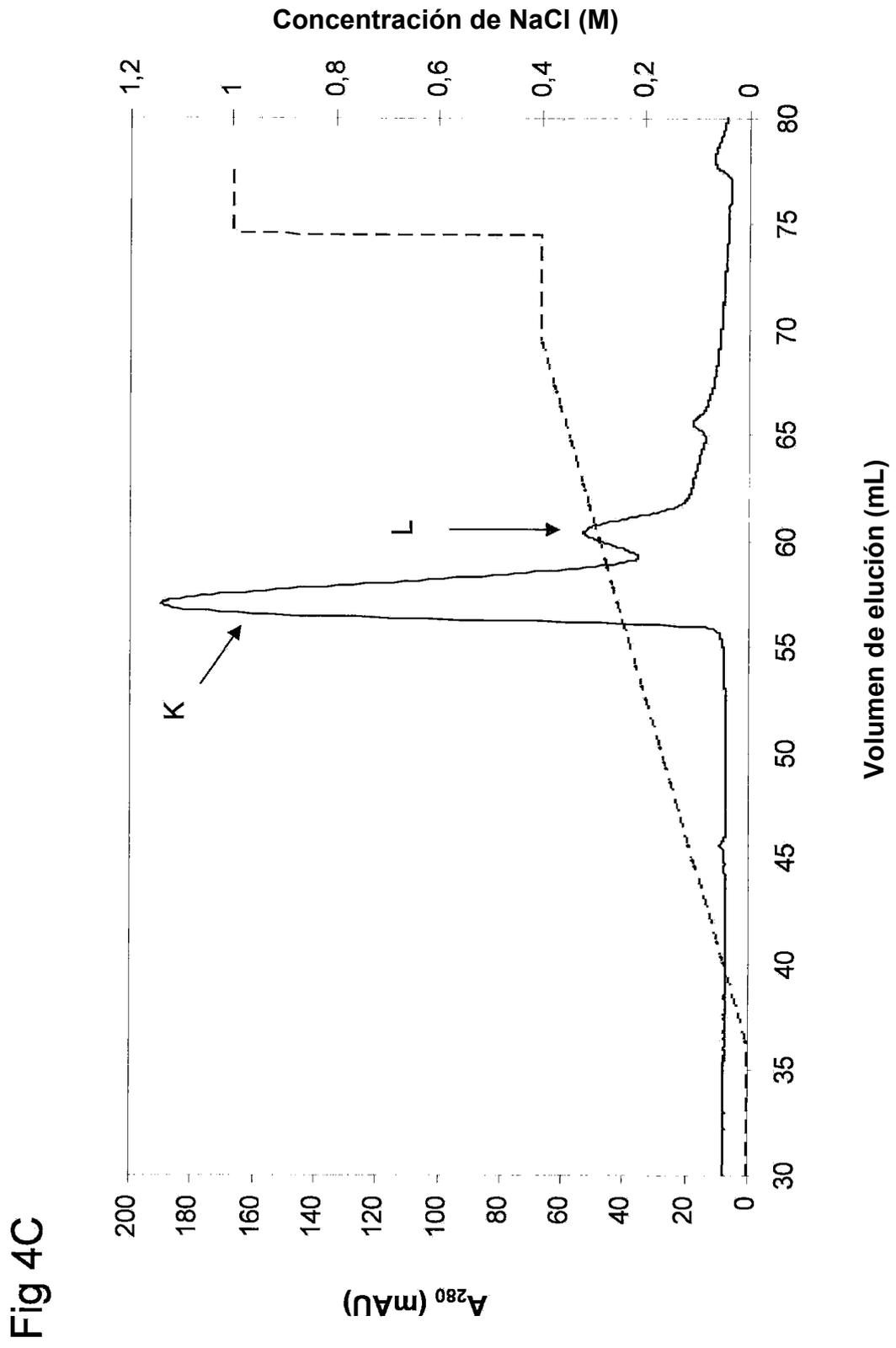
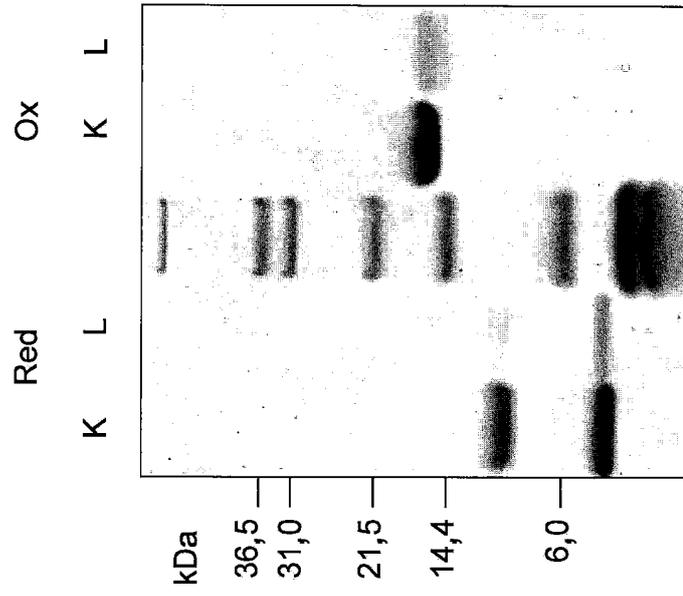


Fig 4D



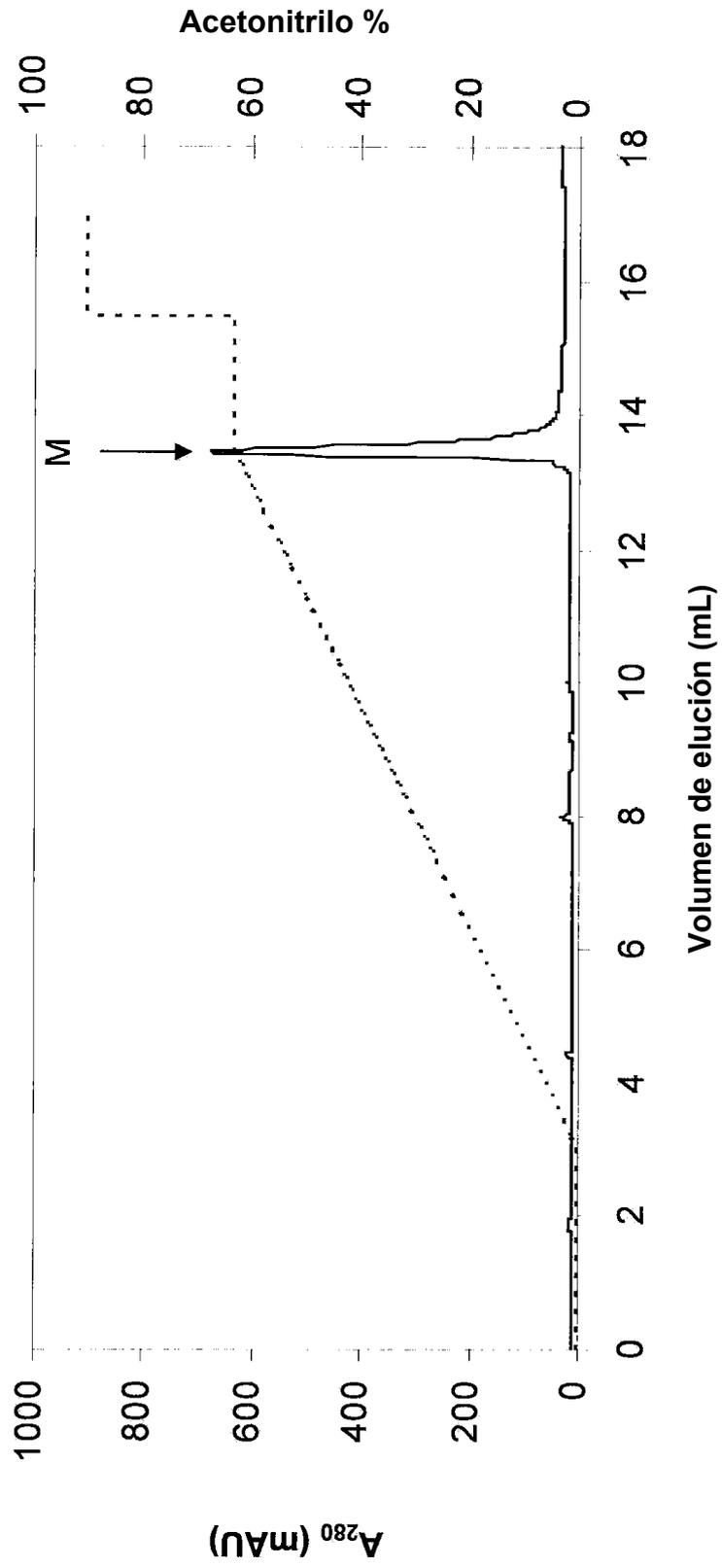


Fig 4E

Fig 5

Fragmento Equ c de 15 – 5 kDa

Secuencia del precursor de longitud completa predicha

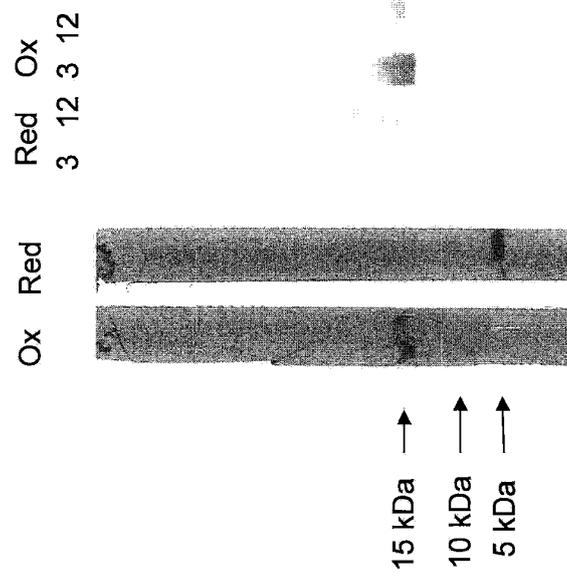
MRLFLPVLLVTLALCCCEETNAATCPAVATDIASFFLLPDSLFKQLIKYQAPPEAKDA
TMQVKQCINEISAGDRYIITETLGKIVLQCGA

Fragmento Equ c de 15 – 10 kDa

Secuencia del precursor de longitud completa predicha

MKLVTVLMLVAFPLYCYAGSGCQLLEDVVEKTTITAEELSPAEEYVEAVQEFIPDEATEK
AAIQLKQCYLKQSNETLNDFRMTMMNSMYNSAYCALF

Fig 6



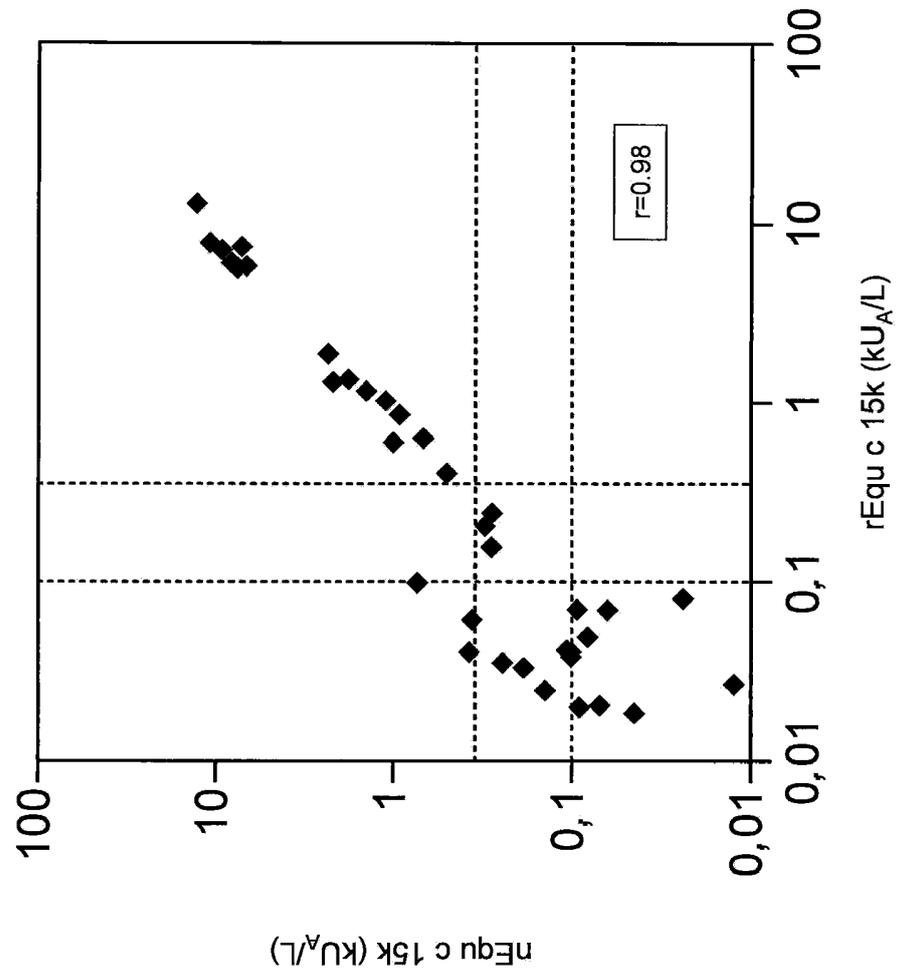


Fig 7

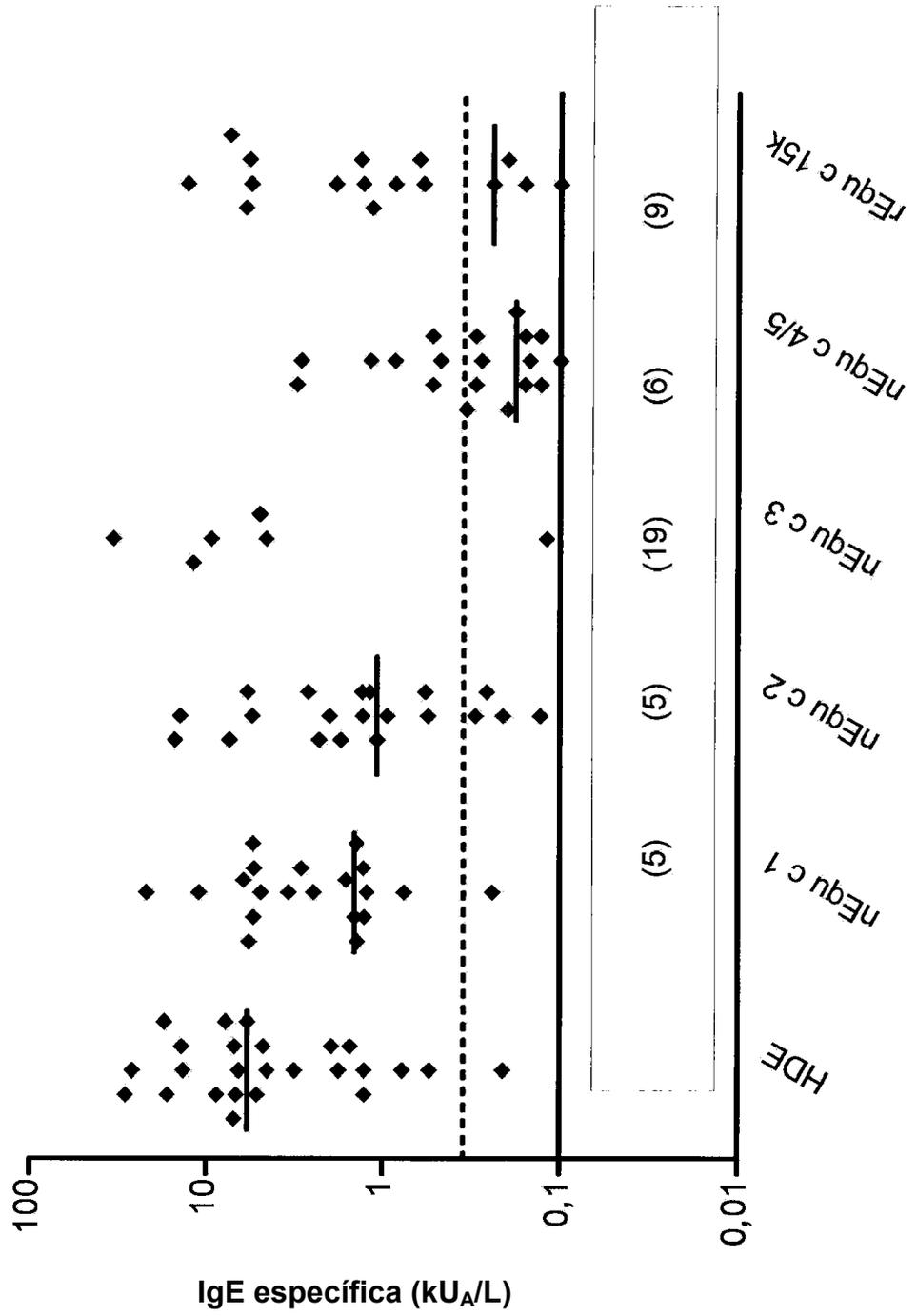


Fig 8

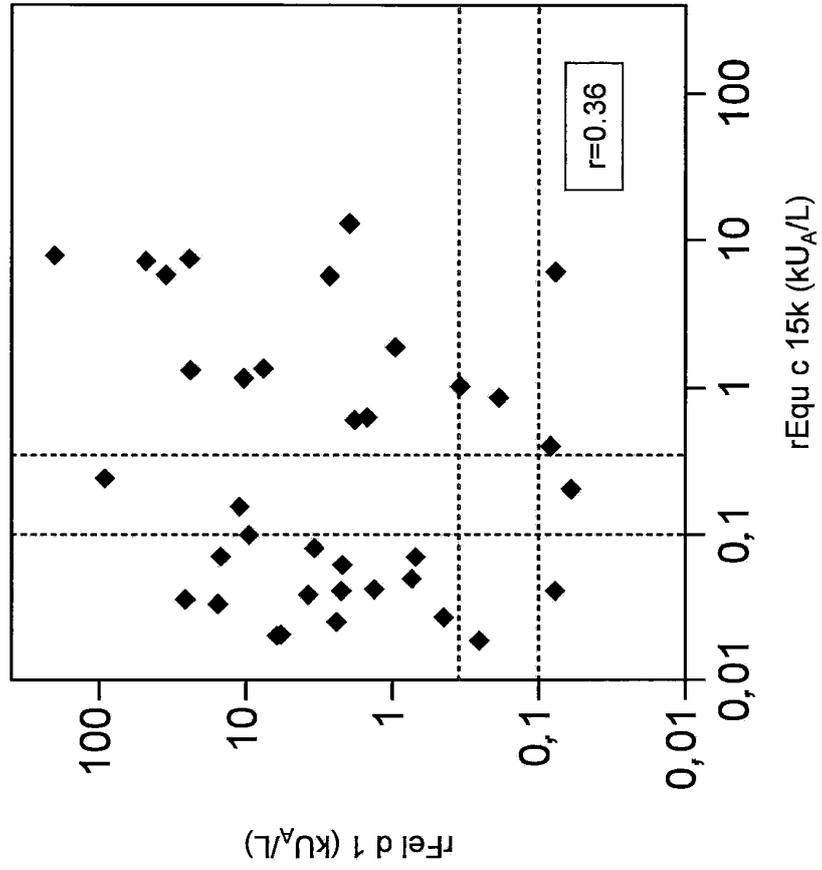


Fig 9

