



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 333 951**

51 Int. Cl.:
C07K 14/415 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
C07K 1/113 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03706458 .1**
96 Fecha de presentación : **07.02.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1478662**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.11.2004**

54 Título: **Método para producir alergenios principales rBet v 1 hipoalergénicos de abedul.**

30 Prioridad: **27.02.2002 EP 02004567**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.03.2010

73 Titular/es: **Merck Patent GmbH**
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

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

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

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

DESCRIPCIÓN

Método para producir alergen principales rBet v 1 hipoalergénicos de abedul.

5 **Ámbito técnico de la invención**

La invención se refiere a un procedimiento para la preparación de alergen de polen de abedul que se caracterizan por la ausencia, o como mínimo una reducción, de la unión a inmunoglobulina E, es decir, se caracterizan por su hipoalergenicidad. Estos alergen conservan totalmente la estimulación de células T terapéuticamente relevante. Por tanto, se pueden emplear como agentes terapéuticos con pocos efectos secundarios para inmunoterapia específica.

Antecedentes de la invención

Las alergias de tipo 1 han aumentado dramáticamente en todo el mundo durante las últimas décadas. Hasta el 20% de la población de los países industrializados sufre de dolencias, como rinitis alérgica, conjuntivitis o asma bronquial, provocadas por alergen que se encuentran en el aire (aeroalergen), que son liberados por diferentes fuentes, como polen vegetal, ácaros, mamíferos (gatos, perros, caballos) y mohos. Las alergias graves también pueden desencadenarse por picaduras de insectos, como por ejemplo, abejas y avispas.

Las sustancias desencadenantes de las alergias de tipo 1 son proteínas, glicoproteínas o polipéptidos. Estos alergen reaccionan, tras la absorción a través de las mucosas o tras la picadura, con los anticuerpos IgE unidos en la superficie de los mastocitos de personas sensibilizadas. Si dos o más anticuerpos IgE se unen entre sí a través de un alérgeno, esto conduce a la producción de mediadores (p. ej., histamina, prostaglandinas) y citoquinas a través de células efectoras y por tanto conduce a la activación de los síntomas alérgicos. Entre los pólenes de árboles, el polen de abedul es el que desencadena más frecuentemente reacciones alérgicas (Jarolim E. y col., 1989, *Allergy* 44:385-95). Más del 90% de las personas que sufren de alergia al polen de abedul poseen anticuerpos IgE contra el alérgeno principal Bet v 1 (Elfman, L. y col., 1997, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 113: 249-51).

Con ayuda de las secuencias de ADNc es posible preparar alergen recombinantes que se pueden emplear en el diagnóstico y la terapia de las alergias. (Scheiner y Kraft, 1995, *Allergy* 50, 384-391). La preparación de alergen recombinantes Bet v 1 (rBet v 1) y su purificación con fines farmacéuticos ha sido descrita p. ej. por Hoffmann-Sommergruber y col. (*Protein Exp. Purif.* 9 (1), 1997: 33-39).

Además, son posibles modificaciones mediante ingeniería genética dirigidas de los alergen recombinantes, con lo que se puede alcanzar un potencial alérgico reducido (Schramm y col., 1999, *J. Immunol.* 162 (4): 2406-2414; Valenta y col., 1999, *Biol. Chem.* 380: 815-24; Singh y col., 1999, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 119: 75-85). Dichas variantes de alergen son futuros candidatos prometedores para la inmunoterapia específica de la alergia de tipo 1.

Sin embargo, un inconveniente potencial en las variantes de alergen recombinantes es que mediante la modificación de la estructura primaria se pierden los epítomos de células T necesarios para el éxito terapéutico o se reduce su actividad. Esta posibilidad sólo se puede eludir si la estructura primaria correspondiente al alérgeno natural sirve como base para la preparación de la proteína recombinante.

En el caso del alérgeno principal del polen de abedul Bet v 1, para optimizarlo con fines terapéuticos mediante métodos recombinantes, es decir, para reducir la capacidad de unión a IgE, se preparó en dos mitades (Vrtala, S., y col., 1997, *J. Clin. Invest.* 99: 1673-81) o como trímero (Vrtala, S., y col., 1999, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118:218-9). En estos enfoques también resulta un inconveniente la pérdida potencial de los epítomos de células T, así como la insolubilidad de las proteínas. Otro inconveniente a considerar aquí es la costosa técnica de preparación de estas variantes rBet v 1.

Por consiguiente, un enfoque apropiado para la preparación de un alérgeno principal recombinante rBet v 1 que se pueda emplear con fines terapéuticos sería por tanto una molécula que equivaliera al tipo salvaje en la estructura primaria, no estuviera limitada en su estimulación de células T, pero presentara una actividad IgE reducida, es decir, fuera hipoalergénica.

Este objetivo se ha alcanzado en el marco de la presente invención mediante la realización de una serie de etapas de purificación bioquímica conocidas con el uso de alergen principales recombinantes rBet v 1 solubles como producto de partida. Sorprendentemente, en las proteínas purificadas de este modo se ha comprobado una actividad IgE reducida y al mismo tiempo una estimulación de células T conservada.

Por consiguiente, el procedimiento según la invención proporciona una eficacia terapéutica mejorada y al mismo tiempo una clara reducción o ausencia de efectos secundarios.

Así, es de especial importancia el diseño del procedimiento de preparación de los alergen recombinantes, ya que como consecuencia de este procedimiento las proteínas adquieren una conformación que no presenta ninguna afinidad con IgE o la presenta muy reducida, manteniéndose la estimulación de células T.

Figuras

Figura 1A: SDS-PAGE para la caracterización de rBet v 1 hipoalergénica

Rastro 1: Patrón de proteína para la estimación del peso molecular

Rastro 2: nBet v 1 natural

Rastro 3: rBet v 1 purificada según la invención

Rastro 4: rBet v 1 purificada de forma convencional

Figura 1B: Transferencia a nitrocelulosa del SDS-PAGE de la Fig. 1A

Figura 2A: Transferencia a nitrocelulosa para la determinación de la actividad IgE con 20 sueros de pacientes individuales

Posición 3: nBet v 1 natural

Posición 4: rBet v 1 purificada según la invención

Posición 5: rBet v 1 purificada de forma convencional

Figura 2B: Transferencia a nitrocelulosa para la determinación de la identidad de las muestras Bet v 1

Manchas 21-26: Diferentes anticuerpos policlonales anti-Bet v 1 de conejo

Mancha 27: Anticuerpo 6B6 monoclonal anti-Bet v 1 de ratón

Figura 3: Enzym-Allergo-Sorbent-Test (EAST) para la cuantificación de la unión a IgE

En el eje vertical se indica la concentración de un inhibidor de la unión IgE-Bet v 1 en ng/ml, en el eje horizontal se indica el grado de la inhibición en [%].

Figura 4: Determinación de la estimulación de células T por parte de variantes Bet v 1. Se comparan las concentraciones de nBet v 1 natural, de rBet v 1 recombinante purificada de forma convencional, así como de rBet v 1 recombinante purificada según la invención y los correspondientes índices de estimulación (SI) obtenidos con diferentes líneas de células T (TCL) y clones de células T (TCC).

Descripción detallada de la invención

La presente invención trata de un procedimiento de purificación bioquímica que a través de una purificación eficaz de, por ejemplo, alergenios producidos con métodos recombinantes, mediante el uso de eluyentes especiales, conduce a la obtención de proteínas con las propiedades modificadas según la invención.

Estas propiedades consisten en una ausencia de actividad IgE, como mínimo una actividad IgE fuertemente reducida, manteniendo al mismo tiempo la estimulación de células T.

Por tanto, es objeto de la presente invención un procedimiento para la reducción de la actividad IgE del alérgeno principal del polen de abedul rBet v 1, que consiste en el uso de alergenios principales del polen de abedul recombinantes rBet v 1 solubles, así como en la realización de las siguientes etapas de cromatografía descritas para su purificación y de la posterior etapa de neutralización.

Además, es objeto de la invención un procedimiento para la preparación de alergenios principales del polen de abedul rBet v 1 hipoalergénicos mediante varias etapas de purificación cromatográfica con el uso como eluyente de bases acuosas esencialmente no tamponadas y una neutralización posterior, empleándose como producto de partida una proteína cruda rBet v 1 soluble preparada mediante métodos recombinantes.

Las etapas de purificación cromatográfica comprenden preferiblemente cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, así como filtración en gel y se pueden realizar una vez, varias veces sucesivamente o varias veces alternativamente. Sin embargo, las etapas de purificación cromatográfica se realizan preferiblemente en el orden siguiente: primera filtración en gel, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, segunda filtración en gel.

ES 2 333 951 T3

Normalmente la purificación cromatográfica se realiza con una concentración de base de 5 a 100 mM, aunque preferiblemente con 5 a 40 mM y de forma especialmente preferible con 10 a 30 mM, empleándose preferiblemente NaOH como sustancia básica. En lugar de un sistema acuoso puro se puede emplear también un sistema mixto, que contiene por ejemplo agua y metanol. También se puede pensar en un sistema no acuoso, p. ej. metanol. Sin embargo, se trabaja preferiblemente con un sistema acuoso.

Dependiendo de la etapa de cromatografía correspondiente se pueden adicionar al eluyente diferentes concentraciones de una sal neutra -preferiblemente NaCl- hasta aproximadamente 5 M.

Para una eventual reducción necesaria del valor de pH que sea tolerada por proteínas sensibles, se puede adicionar hidrogenocarbonato sódico.

También el propósito de establecer unas condiciones fisiológicas al final de la purificación puede ser un motivo para la presencia de hidrogenocarbonato sódico durante las etapas de cromatografía. Así, fundamentalmente son posibles concentraciones de hasta 100 mM. Sin embargo, en el entorno fisiológico se trabaja preferiblemente por debajo de 20 mM, con especial preferencia por debajo de 11 mM.

En el caso de rBet v 1 no es necesaria una reducción del valor de pH. Sin embargo, para la aplicación del procedimiento según la invención en rBet v 1 se añade por regla general hidrogenocarbonato sódico, para poder establecer de forma sencilla concentraciones fisiológicas al final de la purificación.

Así, la invención trata de un procedimiento para la preparación de alergenios principales del polen de abedul rBet v 1 hipoalergénicos, en que un eluyente básico esencialmente no tamponado mantiene las proteínas a purificar en solución en condiciones suaves y por tanto en un estado cromatografiable.

En una forma de realización preferible del procedimiento, la proteína cruda rBet v 1 se pre-purifica antes de la purificación real mediante una cromatografía, por ejemplo una cromatografía de interacción hidrofóbica o una cromatografía de intercambio iónico, y/o mediante precipitación de la sal, en la que se trabaja con un eluyente tamponado o una solución tamponada, en contraposición a la posterior purificación principal.

Los productos de partida para el procedimiento son alergenios recombinantes solubles expresados en bacterias u otras células huésped apropiadas (como levaduras). Puesto que el procedimiento representa una aplicación general para estos productos de expresión, según el procedimiento de la invención también se pueden formular, renaturalizar y purificar alergenios solubles de otra procedencia. En particular, para la correspondiente similitud de estos alergenios de otra procedencia con los alergenios principales del polen de abedul Bet v 1, se cuenta con obtener las propiedades según la invención.

Se tienen en consideración las proteínas o sus fragmentos con otras proteínas o péptidos. Sin embargo, las modificaciones pueden ser de naturaleza química y se pueden realizar a nivel de proteína.

Por tanto, es objeto de la invención el uso del alérgeno principal del polen de abedul rBet v 1 hipoalergénico según la invención para la preparación de un medicamento para la inmunoterapia específica de alergias, en cuya activación participa el alérgeno principal del polen de abedul Bet v 1.

Finalmente, es objeto de la invención una preparación farmacéutica que contiene el alérgeno principal del polen de abedul rBet v 1 hipoalergénico según la invención. De este modo los principios activos según la invención se pueden aplicar junto con al menos un excipiente o coadyuvante sólido, líquido y/o semilíquido y dado el caso en combinación con uno o varios principios activos diferentes en una forma de dosificación apropiada.

Estas preparaciones pueden utilizarse como agentes terapéuticos en medicina humana o veterinaria. Se tienen en consideración como excipientes sustancias orgánicas o inorgánicas que son apropiadas para la aplicación parenteral y que no reaccionan con el alérgeno principal del polen de abedul rBet v 1 hipoalergénico. Para la aplicación parenteral se emplean en particular soluciones, preferiblemente soluciones oleosas o acuosas, otras suspensiones, emulsiones o implantes. El alérgeno principal del polen de abedul rBet v 1 hipoalergénico según la invención también pueden someterse a liofilización y el producto liofilizado obtenido puede emplearse p. ej. para la elaboración de preparaciones inyectables. Las preparaciones indicadas se pueden esterilizar y/o contener coadyuvantes, como lubricantes, conservantes para conseguir una reducción de la actividad IgE o un aumento adicional de la estimulación de células T se preparan modificaciones farmacéuticamente aceptables y con ello se pueden producir derivados de la proteína. Por un lado estas modificaciones se pueden realizar por ingeniería genética a nivel de ADN, entrando en consideración p. ej. inserciones, deleciones e intercambios de aminoácidos, roturas de la proteína en fragmentos, así como fusiones de la proteína o sus fragmentos con otras proteínas o péptidos. Sin embargo, las modificaciones pueden ser de naturaleza química y se pueden realizar a nivel de proteína.

Por tanto, es objeto de la invención el uso del alérgeno principal del polen de abedul rBet v 1 hipoalergénico y/o sus derivados farmacéuticamente aplicables, incluidas sus mezclas en todas las proporciones para la preparación de un medicamento para la inmunoterapia específica de alergias, en cuya activación participa el alérgeno principal del polen de abedul Bet v 1.

Finalmente es objeto de la invención una preparación farmacéutica que contiene el alérgeno principal del polen de abedul rBet v 1 hipoalergénico según la invención y/o sus derivados farmacéuticamente aplicables, incluidas sus mezclas en todas las proporciones. Para ello los principios activos según la invención pueden mezclarse con al menos un excipiente o co-adyuvante sólido, líquido y/o semilíquido y, en su caso, combinarse con uno o varios principios

activos diferentes en una forma de dosificación adecuada.

Estas preparaciones pueden utilizarse como agentes terapéuticos en medicina humana o veterinaria. Se tienen en consideración como excipientes sustancias orgánicas o inorgánicas que son apropiadas para la aplicación parenteral y que no reaccionan con el alérgeno principal del polen de abedul rBet v 1 hipoalergénico. Para la aplicación parenteral se emplean en particular soluciones, preferiblemente soluciones oleosas o acuosas, otras suspensiones, emulsiones o implantes. El alérgeno principal del polen de abedul rBet v 1 hipoalergénico según la invención también pueden someterse a liofilización y el producto liofilizado obtenido puede emplearse p. ej. para la elaboración de preparaciones inyectables. Las preparaciones mencionadas pueden esterilizarse y/o contener coadyuvantes, como lubricantes, conservantes, estabilizadores y/o humectantes, sales para influir sobre la presión osmótica, tampones y/o

varios principios activos diferentes.

Además, mediante la formulación correspondiente del alérgeno principal del polen de abedul rBet v 1 hipoalergénico según la invención se pueden obtener preparados depot, por ejemplo mediante adsorción en hidróxido de aluminio.

A continuación se describe de forma general el procedimiento de preparación según la invención. Así, todos los materiales de cromatografía mencionados a modo de ejemplo proceden de la empresa Amersham Biosciences (Freiburg, Alemania).

Una primera etapa de pre-purificación para la eliminación de ácidos nucleicos puede consistir en una cromatografía de interacción hidrofóbica realizada bajo condiciones fisiológicas (a un pH de 6-8, no desnaturizante), concentrándose al mismo tiempo la proteína objetivo. Alternativamente a esto también se puede realizar una precipitación de sal o una cromatografía de intercambio iónico. Sin embargo, la realización de esta primera etapa de pre-purificación no es obligatoriamente necesaria para la obtención del efecto según la invención.

La siguiente etapa de purificación sirve para la transferencia de la proteína en un eluyente débilmente salino en un intervalo de concentración de 10-100 mM, p. ej. NaCl 20 mM, por ejemplo mediante filtración en gel en una columna Sephadex G-25. Así se consiguen condiciones que permiten la realización de una cromatografía de intercambio iónico con eluyentes alcalinos. La solución de proteína así preparada se emplea a continuación para la cromatografía de intercambio aniónico, por ejemplo con una columna Source Q. Así la mayoría de alérgenos se unen al soporte. El eluyente alcalino provoca que permanezcan en solución las proteínas anteriormente poco solubles o insolubles. Mediante la elución en gradiente de NaCl se realiza una separación parcial de impurezas bacterianas y fragmentos de principios activos.

En dos etapas de purificación posteriores, una cromatografía de interacción hidrofóbica y una filtración en gel, se separan esencialmente los alérgenos pre-purificados y equilibrados de las impurezas bacterianas restantes. Para ello se emplean fundamentalmente las mismas sustancias eluyentes, compuestas de una base de baja molaridad y una proporción variable de una sal neutra inorgánica. Así, los alérgenos se pueden unir a la columna en cromatografía de interacción hidrofóbica con p. ej. hasta NaCl 5 M, NaOH 20 mM y NaHCO₃ 11 mM y a continuación se pueden eluir con una solución pobre en sales o exenta de ellas, p. ej. NaOH 20 mM.

En la última etapa cromatográfica se realiza un cambio de eluyente de manera que las proteínas recombinantes purificadas se obtienen en forma soluble listas para el uso mediante una sencilla neutralización de la base presente en el eluyente con un ácido correspondiente. Para la selección adecuada de las concentraciones de los aditivos del eluyente se emplea una solución fisiológica adecuada para parenterales.

La identificación de los alérgenos purificados se realiza a través de sus propiedades físicas, químicas o biológicas conocidas, en particular mediante SDS-PAGE y anticuerpos monoclonales específicos. Para la caracterización posterior se puede realizar por ejemplo un ensayo de inhibición EAST (EAST significa Enzym-Allergo-Sorbent-Test), con el que se puede determinar la unión IgE específica de una proteína en comparación con una referencia, y/o se puede realizar un ensayo de proliferación de células T. El análisis del disolvente se realiza por medición del valor de pH y cuantificación de la concentración de Na⁺ y Cl⁻, así como dado el caso de CO₃²⁻. Estos procedimientos son conocidos y descritos de forma general.

El rendimiento de los alérgenos preparados según la invención asciende en general al 75-95% referido a la proteína de partida.

Así, el procedimiento incluye tratamientos de muestra mínimos, tiempos de residencia cortos de las muestras, preferiblemente el uso exclusivo de sustancias farmacológicamente compatibles, la compatibilidad de un único eluyente con diversos principios de separación y evitar procedimientos largos y no validables en ciertas condiciones, como la diálisis. Además, el hidróxido sódico empleado preferiblemente como base, conocido como bacteriostático eficaz, impide que las proteínas presentes en este producto se degraden o impurifiquen por microorganismos. Incluso se eliminan o degradan de forma eficaz las endotoxinas, que pueden ser problemáticas en las expresiones bacterianas, otras proteínas extrañas y ADN.

ES 2 333 951 T3

El orden y la cantidad de las etapas de cromatografía descritas arriba puede ser modificada. Para ello se pueden tener en cuenta, entre otras cosas, las propiedades fisicoquímicas específicas de la proteína objetivo. Por eso, incluso sin otras explicaciones, se asume que un especialista puede utilizar la descripción anterior en el alcance más amplio. Por eso, las formas de realización preferibles descritas a continuación se deben interpretar solamente como una revelación descriptiva, en ningún caso limitante de cualquiera de las maneras.

Una forma de realización especialmente preferible del procedimiento se presenta en el esquema (Tab. 1):

TABLA 1

Resumen del procedimiento de preparación según la invención

1. Pre-purificación (opcional) Cromatografía de interacción hidrofóbica (fenil-Sefarosa)
Eluyente 1: Tris/HCl 20 mM, Sulfato amónico 1 M, pH 8,0
Eluyente 2: Agua destilada
2. Cambio de eluyente para la purificación principal filtración en gel (Sephadex 25)
Eluyente: NaCl 20 mM
3. Cromatografía de intercambio aniónico (Source 15Q)
Eluyente 1: NaOH 20 mM, NaHCO ₃ 11 mM y NaCl 20 mM
Eluyente 2: Gradientes NaCl (de NaOH 20mM; NaHCO ₃ 11 mM; NaCl 20 mM a NaOH 20mM; NaHCO ₃ 11 mM; NaCl 0,5 M)
4. Cromatografía de interacción hidrofóbica (Source PHE)
Eluyente 1: NaCl 3 M, NaOH 20 mM, NaHCO ₃ 11 mM
Eluyente 2: NaOH 20 mM
5. Filtración en gel (Superdex 75)
Eluyente: NaOH 10 mM, NaHCO ₃ 11 mM y NaCl 148,4 mM I
6. Neutralización con 1/10 (v/v) HCl 100 mM

La invención se presenta a continuación con el ejemplo de la purificación de Bet v 1 recombinante (rBet v1) terapéuticamente eficaz. Todos los materiales de cromatografía son distribuidos comercialmente por la empresa Amersham Biosciences (Freiburg, Alemania).

Ejemplo 1

Obtención de rBet v 1 hipoadérgico

En primer lugar se prepara un lisado de *E. coli* que contiene un alérgeno rBet v 1 soluble según el procedimiento estándar (Breiteneder H., y col., EMBO J. 1989, 8: 1935-8; Hoffmann-Sommergruber y col., Protein Exp. Purif. 9 (1), 1997: 33-39).

Después, para la eliminación de ácidos nucleicos se lleva a cabo una cromatografía de interacción hidrofóbica con fenil-sefarosa en un tampón tris-amoniosulfato (Tris/HCl 20 mM, sulfato amónico 1 M, pH 8,0). La elución se realiza con agua destilada. Para la preparación de la siguiente etapa de purificación que se realiza con eluyentes débilmente alcalinos, se intercambia el sulfato amónico restante por NaCl 20 mM mediante filtración en gel a través de Sephadex G-25.

La solución de proteínas pre-purificada de este modo se emplea para la cromatografía de intercambio aniónico con Source 15Q, equilibrándose el material de soporte con una solución alcalina (NaOH 20 mM, NaHCO₃ 11 mM y NaCl

20 mM). El valor de pH relativamente elevado de la solución inicial provoca que casi todas las proteínas objetivo se unan al intercambiador de aniones. La elución siguiente se realiza con un gradiente creciente de NaCl (de NaOH 20 mM; NaHCO₃ 11 mM; NaCl 20 mM a NaOH 20 mM; NaHCO₃ 11 mM; NaCl 0,5 M) y provoca una separación de impurezas (proteínas de células huésped) y fragmentos de principios activos.

La siguiente etapa de cromatografía representa una cromatografía de interacción hidrofóbica mediante Source PHE. Para ello el eluato de la cromatografía de intercambio iónico se ajusta a NaCl 3 M, NaOH 20 mM, NaHCO₃ 11 mM mediante adición de las cantidades correspondientes de una solución madre de NaCl 5 M, una solución madre de NaOH 2 M e hidrogenocarbonato sódico. Bajo estas condiciones rBet v 1 se une al material de las columnas. La elución de la proteína objetivo unida se realiza con NaOH 20 mM.

Como etapa final se realiza una filtración en gel mediante Superdex 75, bajo condiciones alcalinas. La solución de cromatografía se selecciona de manera que se realiza una neutralización de la base añadida al eluyente hasta la formulación final deseada: NaOH 10 mM, NaHCO₃ 11 mM y NaCl 148,4 mM, lo que corresponde a las concentraciones de una solución fisiológica salina.

Para acabar, el eluato de la filtración en gel se neutraliza con el ácido HCl correspondiente a la base NaOH utilizada, de modo que se ajusta un valor de pH neutro y al mismo tiempo se obtiene el contenido de sal deseado de una solución fisiológica salina. Esto se consigue mediante la adición de 1/10 (v/v) HCl 100 mM.

Ejemplo 2

Caracterización por SDS-PAGE

Para la caracterización de rBet v 1 hipoalergénico del ejemplo 1 se realiza un SDS-PAGE (15%). Como resulta evidente en la Fig. 1A, el nBet v 1 natural (rastro 2), el rBet v 1 recombinante, purificado de forma convencional según Hoffmann-Sommergruber y col. (Protein Exp. Purif. 9 (1), 1997: 33-39) (rastro 4) y el rBet v 1 purificado según la invención (rastro 3) presentan el mismo peso molecular en SDS-PAGE.

Ejemplo 3

Determinación de la actividad IgE con una mezcla de suero

Para la determinación de la actividad IgE se transfiere el SDS-PAGE del ejemplo 2 a nitrocelulosa. Tras la transferencia de las manchas con una mezcla de suero de alérgicos al polen de abedul se incuba con un conjugado compuesto de un anticuerpo anti-IgE y fosfatasa alcalina. La reacción de coloración provocada por la fosfatasa alcalina (Fig. 1B) muestra una actividad IgE del nBet v 1 natural, así como del rBet v 1 recombinante purificado de forma convencional, pero no del rBet v 1-MF purificado según la invención.

Ejemplo 4

Determinación de la actividad IgE con sueros individuales

Para la determinación de la actividad IgE con sueros sanguíneos de alérgicos al polen de abedul individuales se transfieren a una membrana de nitrocelulosa según la figura 2A nBet v 1 (posición 3), rBet v 1 recombinante purificado de forma convencional (posición 5), así como rBet v 1 purificado según la invención (posición 4) y se ensaya de forma análoga al ejemplo 3. La Fig. 2A muestra que con la excepción del suero 5, donde rBet v 1 purificado según la invención presenta una débil actividad IgE, sólo tienen actividad IgE el nBet v 1 natural y rBet v 1 recombinante, purificado de forma convencional, pero no rBet v 1 purificado según la invención.

Para demostrar la identidad de los alergenios estudiados, la membrana de nitrocelulosa se incubó con diferentes anticuerpos policlonales anti-Bet v 1 de conejo (muestras 21 a 26), así como con anticuerpos 6B6 monoclonales anti-Bet v 1 de ratón (muestra 27) y finalmente se trató de forma análoga al ejemplo 3 (Fig. 2B).

Ejemplo 5

Cuantificación de la unión a IgE

En un ensayo de inhibición EAST realizado según Suck y col. (Int. Arch. Allergy Immunol. 2000; 121: 284-291) con una mezcla de suero de alérgicos se comparan entre sí nBet v 1 natural, rBet v 1 recombinante purificado de forma convencional y rBet v 1 purificado según la invención en relación a la intensidad de su unión a IgE (Fig. 3). Se muestra que rBet v 1 purificado según la invención tiene una actividad IgE 100 veces inferior a las otras proteínas Bet v 1.

ES 2 333 951 T3

Ejemplo 6

Determinación de la estimulación de células T

5 Para la determinación de la influencia del alérgeno rBet v 1 según la invención en el crecimiento de las células T se realiza un ensayo de proliferación con líneas de células T (TCL) y clones de células T (TCC) según Schramm y col. (1999, J. Immunol. 162 (4): 2406-2414) (Fig. 4). A partir de la comparación del índice de estimulación (SI) se deduce que las células T de los donantes estudiados con rBet v 1 reaccionan al menos tan intensamente como con nBet v 1 natural o rBet v 1 recombinante purificado de forma convencional. Dependiendo de las condiciones seleccionadas, la
10 reacción con rBet v 1 supera incluso en un tercio la reacción con nBet v 1 o rBet v 1.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de alérgenos principales del polen de abedul rBet v 1 hipoalérgenicos mediante una o varias etapas de purificación cromatográfica con el uso como eluyentes de bases acuosas esencialmente no tamponadas y a continuación neutralización, **caracterizado** por que se emplea como producto de partida una proteína cruda rBet v 1 soluble preparada con métodos recombinantes.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por que la proteína cruda rBet v 1 soluble preparada con métodos recombinantes se expresa en *E. coli*.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado** por que las etapas de purificación cromatográfica comprenden cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrofóbica y filtración en gel.

4. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por que las etapas de purificación cromatográfica se realizan en el orden siguiente: primera filtración en gel, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, segunda filtración en gel.

5. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** por que la base utilizada como eluyente se emplea en un intervalo de concentración de 5 mM a 100 mM, preferiblemente 5 mM a 40 mM.

6. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** por que la base utilizada como eluyente es NaOH.

7. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** por que al eluyente se le añade una sal neutra inorgánica y dado el caso NaHCO_3 .

8. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** por que la sal neutra inorgánica añadida al eluyente es NaCl.

9. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 6 a 8, **caracterizado** por que las concentraciones de las sustancias NaOH, NaCl y NaHCO_3 contenidas en el eluyente se selecciona de manera que en la etapa de neutralización incluida en la purificación se pueden ajustar las concentraciones típicas de una solución fisiológica salina.

10. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** por que la proteína cruda rBet v 1 se pre-purifica cromatográficamente en una solución tamponada y/o mediante precipitación de sal.

11. Procedimiento para la reducción de la actividad IgE del alérgeno principal del polen de abedul rBet v 1, **caracterizado** por que un alérgeno principal del polen de abedul rBet v 1 soluble preparado con métodos recombinantes se somete a uno de los procedimientos descritos en las reivindicaciones 1 a 10.

12. Alérgeno principal del polen de abedul rBet v 1 hipoalérgénico, que se puede obtener según uno de los procedimientos descritos en las reivindicaciones 1 a 10.

13. Alérgeno principal del polen de abedul rBet v 1 hipoalérgénico, según la reivindicación 12, como medicamento.

14. Uso del alérgeno principal del polen de abedul rBet v 1 hipoalérgénico según la reivindicación 12 para la preparación de un medicamento para la inmunoterapia específica de alergias en cuya activación está implicado el alérgeno principal del polen de abedul Bet v 1.

15. Preparación farmacéutica que contiene un alérgeno principal del polen de abedul rBet v 1 hipoalérgénico según la reivindicación 12, así como dado el caso excipientes y/o coadyuvantes.

Fig. 1A

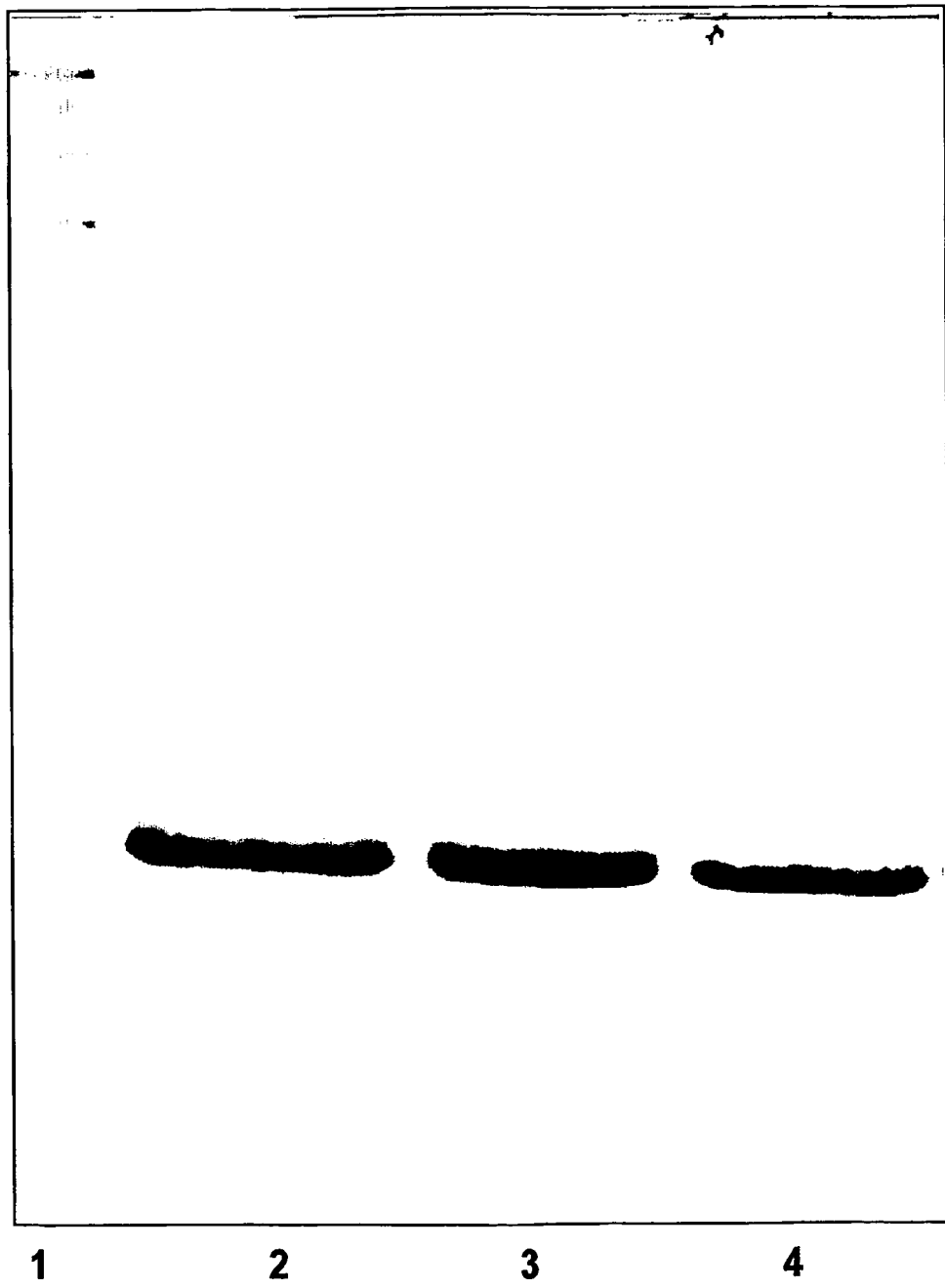


Fig. 1B

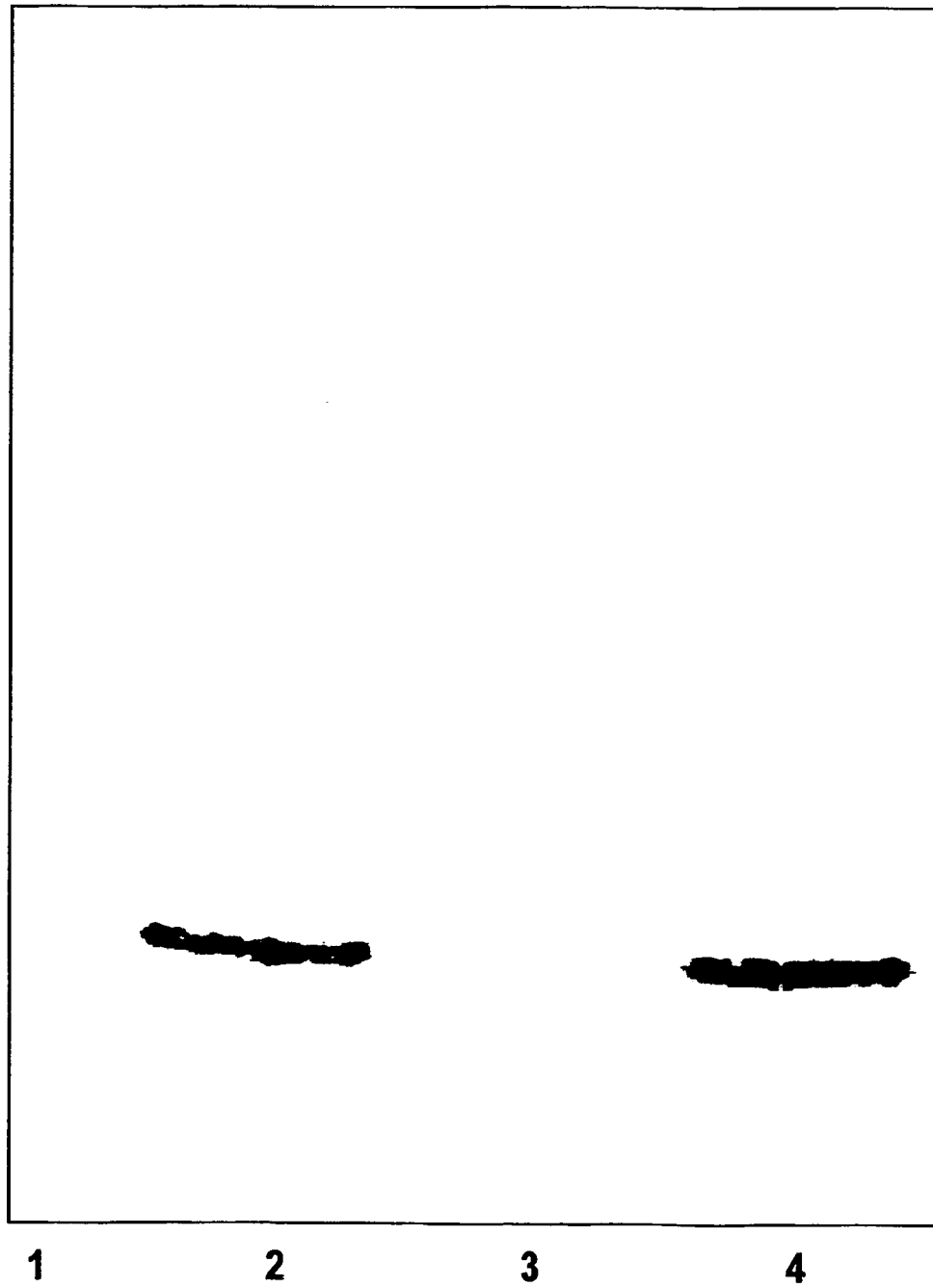
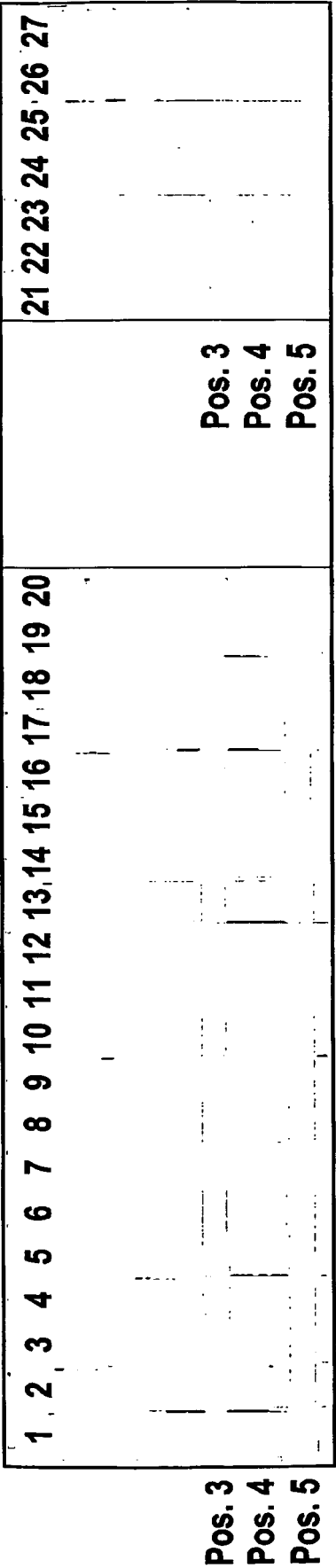


Fig. 2A

Fig. 2B



Pos. 3
Pos. 4
Pos. 5

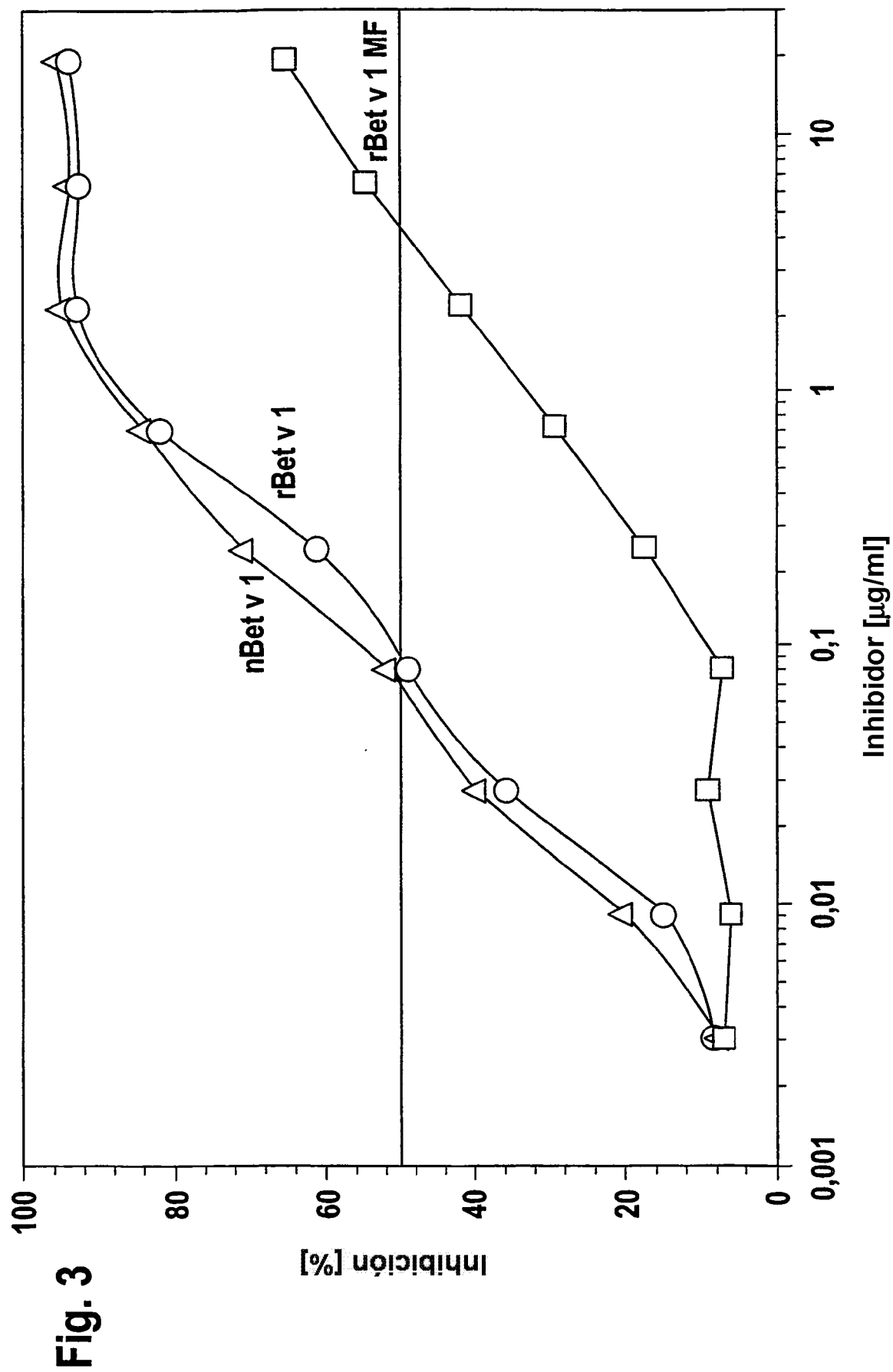


Fig. 4

Proliferación [SI]							
Concentración de proteína [$\mu\text{mol/l}$]		TCL				TCC	
		65.15	36.15	52.12	68.19	51.25A9	3.6E6
nBet v1	0,3	23,6	30,8	13,7	3,2	9,2	3,5
rBet v1	0,3	21,5	18,7	7,8	5,4	5,8	3,2
rBet v1-MF	0,3	28,2	42,5	16,4	7,2	10,2	4,1