



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 272 026**

51 Int. Cl.:

C07K 14/43 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 39/35 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99112987 .5**

86 Fecha de presentación : **06.07.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1067139**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **10.01.2001**

54

Título: **Ciclofilina identificada como alergeno.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

73

Titular/es: **SCAP Foundation**
Parklaan 81
2011 KS Haarlem, NL

72

Inventor/es: **Cadot, Pascal Gilbert y**
Ceuppens, Jan Louis

74

Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 272 026 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

Ciclofilina identificada como alérgeno.

5 La presente solicitud se refiere a una proteína con actividad rotamasa, la cual es una ciclofilina, para el diagnóstico y terapia de enfermedades alérgicas.

10 Muchas especies de árboles (como el abedul, *Betula verrucosa*) producen grandes cantidades de polen que inducen síntomas de alergia de tipo I (rinitis alérgica, conjuntivitis, asma) por inhalación. Otras especies de árboles botánicamente distintas pueden contener alérgenos en sus frutos, que presenten reacción cruzada con alérgenos del polen y, por tanto, provocar alergia a los alimentos por ingestión en individuos alérgicos al polen.

15 El polen de abedul es una causa principal de alergia en las zonas del norte de Europa y América, así como en algunas zonas de Australia, apareciendo los síntomas al principio de la primavera. Por esta razón, es de una importancia crucial caracterizar y analizar los alérgenos del polen de abedul, proteínas que son responsables de los síntomas clínicos de la alergia al polen de abedul.

20 Se ha descubierto que la reactividad cruzada observada entre ciertas especies de polen puede atribuirse a la similitud estructural e inmunológica de los alérgenos con reactividad cruzada relevante. Este hallazgo supone que puede realizarse el diagnóstico y la inmunoterapia con pocos alérgenos marcadores de reactividad cruzada portadores de una gran proporción de los epítomos de reacción cruzada.

25 Hasta el momento, ya se han descrito en detalle cinco alérgenos del polen de abedul. El principal alérgeno es Bet v 1, una proteína de 17 kDa compuesta por varios isoalérgenos y reconocida prácticamente por todos los pacientes alérgicos al polen de abedul. Los genes que codifican Bet v 1 muestran similitud con genes implicados en mecanismos de defensa de plantas (Breiteneder y col., EMBO J. 1989; 8: 1935-1938). Se encuentran proteínas similares a Bet v 1 en algunos frutos y vegetales y son responsables de alergias cruzadas entre alimentos y polen. El segundo alérgeno bien conocido es la profilina del polen de abedul, Bet v 2, que está implicada también en reacciones cruzadas entre el polen de abedul y productos alimenticios (Ebner y col., J Allergy Clin. Immunol. 1995; 95: 962-969). Los otros dos alérgenos, denominados Bet v 3 y Bet v 4, son alérgenos menores ya que son reconocidos por un pequeño porcentaje de sueros de pacientes alérgicos al polen de abedul. Se ha demostrado que ambas son proteínas que se unen a calcio (Seiberler y col., EMBO J. 1994; 13: 3481-3486; Engel y col., J Biol. Chem. 1997; 272: 28630-28637). Recientemente, se ha demostrado que una proteína de 35 kDa, relacionada con las isoflavona reductasas, se une a la IgE de personas alérgicas al polen de abedul (Vieths y col., Scand. J. Immunol. 1998; 47: 263-272). También puede estar implicada en alergias cruzadas entre polen y alimentos.

35 Además, Cadot y col. describieron en Allergy 1995; 50: 431-437, que los extractos del polen de abedul preparados a pH 7,5 u 8,5 con control de pH continuo, contenían tres alérgenos previamente desconocidos con pI 9, 9,1 y 9,3, posiblemente isoformas de una proteína. La masa molecular no pudo determinarse porque los sueros de los pacientes que eran positivos para estas proteínas en inmunotransferencias de IEF, no detectaban ninguna banda nueva en las inmunotransferencias de los SDS-PAGE, lo que podía explicarse por la implicación para el reconocimiento solamente de los epítomos conformacionales. La secuenciación directa en una membrana de transferencia fue infructuosa, lo que se atribuyó al bloqueo N-terminal.

45 La rotamasa (= peptidilpropil cis-trans isomerasa) cataliza la rotación del enlace peptídico en el grupo amino terminal de restos de prolina en una proteína o en un péptido. La rotamasa se inhibe de forma eficaz con la ciclosporina A, un undecapéptido cíclico que tiene efectos inmunosupresores (Takahashi y col., Nature 1989; 337: 473-475 y Fischer y col., Nature 1989; 337: 476-478). Se ha identificado que la última proteína descubierta, la ciclofilina, es idéntica a un tipo de rotamasa.

50 Las ciclofilinas se han identificado y aislado a partir de diversas especies, y se han identificado genes homólogos en mamíferos así como en *Drosophila* y en procariontes. Se han encontrado otras ciclofilinas además en diferentes especies de plantas superiores.

55 Gasser y col. describieron en Proc. Natl. Acad. Sci. 1990; 87: 9519-9523; que las secuencias de ADN de las ciclofilinas de las diferentes especies vegetales tienen elevada homología entre sí así como con ciclofilinas de otras especies, es decir, humanas. Los marcos abiertos de lectura de los genes codifican proteínas de 171-172 aminoácidos. Las ciclofilinas de las diferentes especies vegetales tienen más del 75% de identidad de aminoácidos y más del 85% de conservación de aminoácidos. Además, se ha descubierto que el gen de la ciclofilina no contiene ningún intrón en la secuencia codificadora. La ciclofilina recombinante de tomate se expresa en *E. coli* y se identifica por su actividad rotamasa.

65 Horner, W.E. y col. describen en INT. ARCH. ALLERGY. IMMUNOL., 1995; 107:298-300, una ciclofilina recombinante de *Psilocybe cubensis* que tiene actividad antigénica con suero de pacientes que tienen alergias respiratorias.

Cadot, P. y col. describen en ALLERGY, 53 (supl. 43): 25 (1998), alérgenos de polen de abedul, especialmente una proteína con tres isoformas, que era reconocida por los sueros de pacientes alérgicos al polen de abedul como un antígeno.

ES 2 272 026 T3

Trandinh, C.C. y col., describen en 1992 varias ciclofilinas en el THE FASEB JOURNAL 6:3410-3420, en donde se alinean y comparan las secuencias de varias especies. Basándose en esta comparación, se describe la relación evolutiva entre estas proteínas.

5 Es objetivo de la presente solicitud proporcionar medios o medicamentos para el diagnóstico y terapia de enfermedades alérgicas.

Este objetivo se consigue mediante una proteína que contenga la ID SEC N° 1 para el uso diagnóstico o terapéutico.

10 Preferiblemente, la proteína según la invención tiene actividad rotamasa.

De la forma más preferida, la proteína según la invención es una ciclofilina. Las ciclofilinas son proteínas muy conservadas, especialmente las ciclofilinas vegetales tienen una alta homología entre sí. Puesto que todas las ciclofilinas conocidas poseen la misma actividad enzimática y se inhiben con la misma molécula (ciclosporina A), la estructura tridimensional de estas proteínas también debe estar muy bien conservada. Lippuner y col, mostraron en J. Biol. Chem. 15 1994; 269: 7863-7868, que el antisuero obtenido frente a la ciclofilina citosólica de la mostaza silvestre reaccionaba de forma cruzada con una amplia variedad de ciclofilinas de otras fuentes. Estos resultados implican, que también la antigenicidad de las ciclofilinas es muy similar.

20 Nunca antes se había descrito una ciclofilina vegetal como alergeno. También es la primera vez que se describe en el polen. La presente solicitud muestra que la ciclofilina vegetal es un nuevo alergeno importante y puede usarse para el diagnóstico y terapia de enfermedades alérgicas, tales como rinitis alérgica, asma alérgica, conjuntivitis alérgica y alergias a los alimentos asociadas al polen. El análisis mediante inmunotransferencias de la IEF con sueros de 48 personas alérgicas al polen de abedul mostraba hasta un 20,8% de sueros que reaccionaban con la ciclofilina. 25

Un objetivo preferido de la presente solicitud es proporcionar medios para el diagnóstico *in vivo* e *in vitro* y la terapia de la alergia al polen de abedul. Debido a la estructura y antigenicidad muy conservadas entre las ciclofilinas, la presente solicitud además proporciona medios para el diagnóstico y terapia de la alergia al polen.

30 Un objetivo preferido adicional de la presente solicitud es proporcionar medios para el diagnóstico *in vivo* e *in vitro* y terapia de la alergia a los alimentos asociada al polen.

Se sabe que las ciclofilinas están contenidas en diversas plantas, habiéndose mencionado su presencia en prácticamente todos los órganos estudiados: raíces, tallos, yemas, semillas y anteras. Por esta razón, y debido a la estructura y antigenicidad tan conservadas entre las ciclofilinas y especialmente entre las ciclofilinas vegetales, parece evidente la implicación de las ciclofilinas en las alergias cruzadas entre alimentos y polen. Hasta el momento, nunca se había analizando la reactividad cruzada de la alergia a los alimentos en referencia a las ciclofilinas. En la presente invención las ciclofilinas vegetales que contienen la ID SEC N° 1 se usan para el diagnóstico o terapia de alergias cruzadas entre alimentos y polen. En la realización más referida se usan ciclofilinas que se aíslan de aquella planta frente a la se analizará a la persona que es alérgica a los alimentos. Son especialmente preferidas las combinaciones de ciclofilinas de diferentes plantas. 35 40

La proteína de la presente invención puede ser una proteína nativa o recombinante de un procariota o un eucariota, es decir, de una fuente bacteriana, de levadura, hongo, planta, insecto o mamífero. Se prefiere una proteína de cualquier eucariota, más preferida de plantas superiores (por ejemplo, dedalera, hierba doncella, tomate y cebolla). La proteína más preferida es la ciclofilina del polen de abedul. 45

La extracción de alergen es posible en cualquier solución acuosa. Puede usarse agua pura así como cualquier sistema de tampón acuoso. Los alergen del polen de árboles son proteínas (o glicoproteínas) de bajo peso molecular que eluyen rápidamente a partir del polen tras el contacto con soluciones acuosas. La hidratación del polen transporta los alergen desde el interior a la superficie de los granos de polen. Los diferentes alergen del polen de árboles se extraen fácilmente a partir del polen en grandes cantidades tras la hidratación. Los expertos en la técnica normalmente conocen procedimientos de extracción de las proteínas recombinantes correspondientes a partir de las células de cualquier sistema de expresión. 50 55

En una realización preferida los extractos de alergen se preparan en tampón fosfato con un intervalo de pH de 6,5 a 8,5, mas preferiblemente de 7,5 a 8,5.

60 Los extractos proteicos pueden purificarse mediante cualquier procedimiento de purificación de proteínas conocido, es decir, filtración, cromatografía de interacción hidrófila o hidrófoba, intercambio iónico, cromatografía de filtración molecular, estrategias de precipitación o combinaciones de las mismas, para obtener una proteína según la presente invención.

65 Las proteínas según la invención contienen una secuencia de aminoácidos de la ID SEC N° 1, que es DFTAGNGTG-GESIYGAK. La ID SEC N° 1 puede estar flanqueada por una secuencia o partes de la secuencia de una ciclofilina en uno o ambos extremos. En una realización más preferida la ID SEC N° 1 es una parte interna de una ciclofilina.

ES 2 272 026 T3

La proteína según la invención muestra en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS una única banda de aproximadamente 18 kDa, y en un análisis de inmunotransferencia tras isoelectroenfoque (IEF) puede mostrar varias bandas en el intervalo del pI básico, lo que representa diversas isoformas de la proteína.

5 Preferiblemente además, la proteína posee un actividad peptidilprolil cis-trans isomerasa (rotamasa) y se une a ciclosporina A. Más preferentemente, la actividad de la proteína se inhibe con la ciclosporina A.

10 La proteína puede usarse para medios o medicamentos de diagnóstico *in vivo* e *in vitro* y terapia en forma de soluciones, unida a fases sólidas (es decir, a placas, perlas, pocillos), dispersada o disuelta en cremas, polvos, pomadas o preparaciones análogas. Puede emplearse como una proteína completa, en fragmentos, como epítomos, fusionada o conjugada con otras proteínas o sustancias, o agrupada. La proteína puede ser nativa o estar desnaturalizada. La proteína puede usarse sola o mezclada con otros alérgenos purificados, o como extractos brutos, para el diagnóstico *in vivo* o *in vitro* y tratamiento de enfermedades alérgicas.

15 Descripción detallada del aislamiento, identificación y uso de la proteína de la presente invención:

Extracción del alérgeno: El polen de *Betula verrucosa* se obtuvo de Allergon (Engelholm, Suecia). La extracción (1/10 p/v) se realizó en tampón fosfato (PB) 0,01 M, pH 7,5 con ajuste y control de pH continuo. Después de 3 h de extracción a temperatura ambiente, los extractos se centrifugaron (17.500 g, 30 min) para eliminar las partículas de polen y, a continuación se filtraron a través de una membrana de 0,45 μ m.

20 Purificación de alérgenos: El tampón del extracto de polen de abedul se cambió por Tris 0,05 M, pH 8,5. A continuación, el extracto se incubó 3x15 min, cada vez con nueva DEAE-Sephacel[®] (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) preequilibrada en Tris 0,05 M, pH 8,5, hasta una proporción total gel/extracto de 3. Después de cada incubación, el gel se retiró por centrifugación (600 g, 5 min) y se conservó el sobrenadante.

30 La solución resultante (fracción A) se dializó durante una noche frente a sulfato amónico 1,4 M en fosfato de hidrógeno disódico 0,1 M, pH 7,0, antes de que se cargara en una columna cromatográfica de fenilsefarosa (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) para una cromatografía de interacción hidrófoba. Las proteínas unidas se eluyeron aplicando un gradiente del 20-100% de fosfato de hidrógeno disódico 0,1 M, pH 7,0. Las fracciones se recogieron y se concentraron mediante filtración a través de membrana (punto de corte de 10 kDa) y el tampón se cambió a PB 0,01 M, pH 7,5, antes de que las muestras se distribuyeran en alícuotas y se congelaran a -70°C hasta su uso.

35 En la Figura 1 se ilustran las etapas de purificación. La incubación del extracto en bruto con DEAE-Sephacel[®] a pH 8,5 producía una solución enriquecida en una proteína de 18 kDa (fracción A). Las proteínas de esta fracción se separaron después mediante una cromatografía de interacción hidrófoba, cuyo perfil típico de elución se muestra en la Figura 2. El análisis de las fracciones resultantes se realizó mediante inmunotransferencia del IEF con sueros humanos, que se mostraban en Cadot y col., en *Allergy* 1995, 50: 431-437, para reconocer las bandas en el pI 9,0, 9,1 y 9,3 en un patrón de IEF. Las proteínas básicas diana se encontraron en la fracción 48-55. Esta fracción presentaba en SDS-PAGE una única banda a 18 kDa (Figura 1). Para la inmunotransferencia del IEF en tiras de la fracción 48-53, para la incubación se usó un suero que reaccionaba con un número mayor de bandas, incluyendo las básicas. Entonces, sólo pudieron distinguirse tres bandas en el pI 9,0, 9,1 y 9,3 (Figura 3). Las tres se unen a la IgE de los pacientes. Esto confirmaba que debían existir varias isoformas de la ciclofilina. Típicamente, se obtenía una cantidad de 250 pg de proteína purificada a partir de 30 g de polen. La concentración se determinó por absorbancia a 280 nm, asumiendo una D.O.= 0,6 como 1 mg/ml, que es la absorbancia de la ciclofilina de tomate calculada a partir de su secuencia completa.

45 Electroforesis e inmunotransferencia: El isoelectroenfoque (IEF) se realizó usando un aparato Multiphor II para electroforesis horizontal (Pharmacia-Biotech, Uppsala, Suecia) en geles finos de acrilamida al 5% que contenían anfólitos al 7,5% con un intervalo de pH de 3-10 (Isolab, Akron, OH, USA) vertido sobre una lámina de Gelbond[®] PAG (FMC, Rockland, ME, EE.UU.). Las condiciones de desarrollo fueron 1.500 V, 25 mA y 15 W para un total de 1.250 Vh. En los experimentos de inmunotransferencia, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon[®], Millipore, Bedford, MA, EE.UU.) mediante transferencia por presión. Después del bloqueo con leche en polvo descremada al 0,2% en solución salina tamponado con fosfato (PBS-LEPD, al 0,2%), las tiras de membrana se incubaron durante una noche a 4°C con sueros de pacientes diluidos en PBS-LEPD al 0,1% (125 μ l de suero/tira). Después se detectó la IgE unida mediante un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgE humana (CLB, Ámsterdam, Holanda), seguido de IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa (CLB, Ámsterdam, Holanda). Las bandas se revelaron mediante la incubación con el sustrato de la peroxidasa TMB (KPL, Gaithersburg, MD, EE.UU.).

60 La SDS-PAGE se realizó en geles de poliacrilamida al 13% con un gel concentrador de poliacrilamida al 5%, usando el sistema de tampón discontinuo de Laemmli, *Nature* 1970, 227: 680-685. Antes del desarrollo, las muestras se calentaron durante 5 min a 100°C en tampón de muestra compuesto de Tris 125 mM, pH 6,8, glicerol al 17,5%, SDS al 4%, beta-mercaptoetanol al 1% y azul de bromofenol al 0,002%. Se aplicó un voltaje de 350 V hasta que el azul de bromofenol alcanzó el lado opuesto del gel.

65 Microsecuenciación: Los primeros intentos de secuenciación de los aminoácidos del extremo N-terminal con la proteína purificada fueron infructuosos, lo que confirmó el bloqueo del extremo N-terminal ya observado. A continuación, la proteína se digirió con Asp-N durante 16 h a 37°C y los fragmentos resultantes se separaron por interacciones

ES 2 272 026 T3

hidrófobas en una columna de HPLC. La microsecuenciación se realizó por degradación de Edman en un secuenciador automático.

La digestión con la proteasa Asp-N produjo varios fragmentos. El análisis de un pico de la columna de HPLC dio claramente la siguiente secuencia: DFTAGNGTGGESIYGAK. Los resultados de las búsquedas de similitud con esta secuencia se presentan en la Tabla 1.

Búsquedas de similitud: Las búsquedas de similitud y los alineamientos de secuencias se hicieron en un ordenador mediante búsquedas no redundantes usando el servidor Blitz y la base de datos Swissall.

La presente invención se refiere a proteínas, que incluyen una secuencia que muestra el 100% de identidad en comparación con la ID SEC N° 1.

TABLA 1

Fuente	Masa molecular [Da]	Número de aminoácidos	Posición de la correspondiente secuencia interna	Identidad con la secuencia de la presente ciclofilina	Número de acceso
Dedalera (<i>Digitalis lanata</i>)	18.055	172	73-89	100%	Q96417
Judía verde (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	18.160	172	73-89	100%	Q41119
Hierba doncella (<i>Catharanthus roseus</i>)	18.285	172	73-89	100%	Q39613
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	17.910	171	73-89	100%	P21568
Cebolla (<i>Allium cepa</i>)	16.033	150	51-67	100%	P34887
Judía blanca (<i>Vicia faba</i>)	?	171	73-89	94%	D1026688
Mostaza silvestre (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	18.492	173	74-90	94%	Q38900

La ciclofilina de la presente invención muestra una homología muy grande (identidad de hasta el 100%) con ciclofilinas de otras diversas plantas. Las ciclofilinas vegetales, por consiguiente, tienen una masa molecular de aproximadamente 18 kDa y un pI básico.

Ensayo de rotamasa: La actividad rotamasa se ensayó mediante una modificación del procedimiento original de Fischer y col., Biochim. Biophys. Acta 1984; 791: 87-97. En este ensayo, un péptido cromogénico, el succinil-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilida (sAAPFn; Sigma, St. Louis) se escinde con quimiotripsina, pero sólo cuando está en la conformación Ala-Pro trans. Más del 80% del péptido está en esta conformación en el equilibrio. Esta fracción se escindiría prácticamente de forma inmediata con la quimiotripsina, pero el 20% restante debe experimentar el proceso relativamente lento de isomerización de cis a trans antes de que pueda escindirarse. La actividad rotamasa, que facilita la isomerización cis-trans, puede detectarse a continuación mediante la aceleración de la tasa de escisión peptídica. En nuestro ensayo, realizado en tampón HEPES 35 mM, pH 8,0, la concentración final de quimiotripsina era de 2 μ M y la de sAAPFn era de 10 μ M. La actividad rotamasa se comprobó a concentraciones de la proteína purificada de 3 nM y 30 nM. Para inhibir la actividad rotamasa, se usó ciclosporina A (CsA) a 1 μ M. Como control negativo de la inhibición de la actividad rotamasa, se usó FK506 a 1 μ M, que es conocido porque se une específicamente a otro grupo de peptidilpropil isomerasas (rotamasas), las proteínas de unión a FK506.

Se demostró que la actividad rotamasa de la ciclofilina era dependiente de dosis (Figura 4). Además, el alergeno se unía a la CsA, que inhibía su actividad rotamasa (Figura 4), pero no se unía a FK506.

60 Leyendas de las figuras

Figura 1 Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie que muestra: A, extracto total de polen de abedul; B, fracción después de DEAE-Sephacel; C, fracción 47-53 (4 μ g) de la cromatografía de interacción hidrófoba. Los marcadores de masa molecular se muestran a la izquierda.

Figura 2 Purificación de la ciclofilina del polen de abedul mediante cromatografía HP de fenilsefarosa. La fracción A en tampón A se cargó en la columna y, a continuación, se eluyó con un gradiente del 20-100 % de tampón B a un

ES 2 272 026 T3

caudal de 2 ml/min. Tampón A: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4 M; Na_2HPO_4 0,1 M; pH 7.0. Tampón B: Na_2HPO_4 0,1 M; pH 7.0. La absorbancia (UA) se monitorizó a 280 nm.

5 Figura 3 Inmunotransferencia para IgE de un gel de IEF. La fracción 47-53 se incubó con: A, el suero de un paciente que reacciona con un número elevado de alérgenos del polen de abedul, incluyendo los del intervalo básico. B, tampón de incubación como control. Los marcadores de pI se indican a la izquierda.

10 Figura 4 Ensayo de la actividad rotamasa de la ciclofilina purificada del polen de abedul, que implica: sin ciclofilina (cuadrados), ciclofilina 3 nM (cruces), ciclofilina 30 nM (rombos rellenos), ciclofilina 30 nM + CsA 1 μM (triángulos rellenos), ciclofilina 30 nM + FK506 1 μM (triángulos vacíos). La absorbancia a 390 nm refleja la escisión del péptido cromogénico sAAPFn.

Ejemplo

15 Pruebas cutáneas: Las pruebas cutáneas de punción con la fracción A (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en glicerol al 50%) se realizaron en el antebrazo de siete pacientes alérgicos al polen de abedul, seleccionados por sus antecedentes y pruebas cutáneas positivas claras para el polen de abedul. A continuación, se realizó un ensayo con la proteína de 18 kDa purificada (a 1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en glicerol al 50%) en pacientes que mostraban una respuesta positiva a la fracción A. Se usó como control negativo una solución de glicerol al 50%.

20 Uno de cada siete pacientes manifestó una clara respuesta positiva frente a la fracción A y, a continuación, a la ciclofilina del polen de abedul purificada (reacción muy clara a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). El control con glicerol al 50% era negativo. Los sueros de los siete pacientes con pruebas cutáneas se usaron en las inmunotransferencias de los IEF con el extracto total del polen de abedul. Existía una correlación entre las pruebas cutáneas y las transferencias, puesto que sólo el
25 paciente que era positivo para la ciclofilina purificada mostraba unión a las tres bandas básicas.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Proteína que es una ciclofilina vegetal que contiene la ID SEC N° 1 para su uso en el diagnóstico y/o terapia de enfermedades alérgicas.

2. Proteína de la reivindicación 1, en la que la planta se selecciona entre tomate, dedalera, hierba doncella, cebolla o abedul.

10 3. Proteína de la reivindicación 1 ó 2, en la que la ciclofilina vegetal es una ciclofilina de polen de abedul.

4. Uso de la proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la preparación de un medio o remedio en el diagnóstico y/o terapia de enfermedades alérgicas.

15 5. Uso de la proteína según la reivindicación 4, para la preparación de un medio o remedio para el diagnóstico *in vivo* o *in vitro*, o para terapia de la alergia al polen y alergias cruzadas asociadas con alimentos y polen.

6. Uso según la reivindicación 5, por el cual la alergia al polen se selecciona entre rinitis alérgica, asma alérgica y conjuntivitis alérgica.

20 7. Uso de la proteína según la reivindicación 4, para la preparación de un medio o remedio en el diagnóstico y terapia de alergia al polen de abedul.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

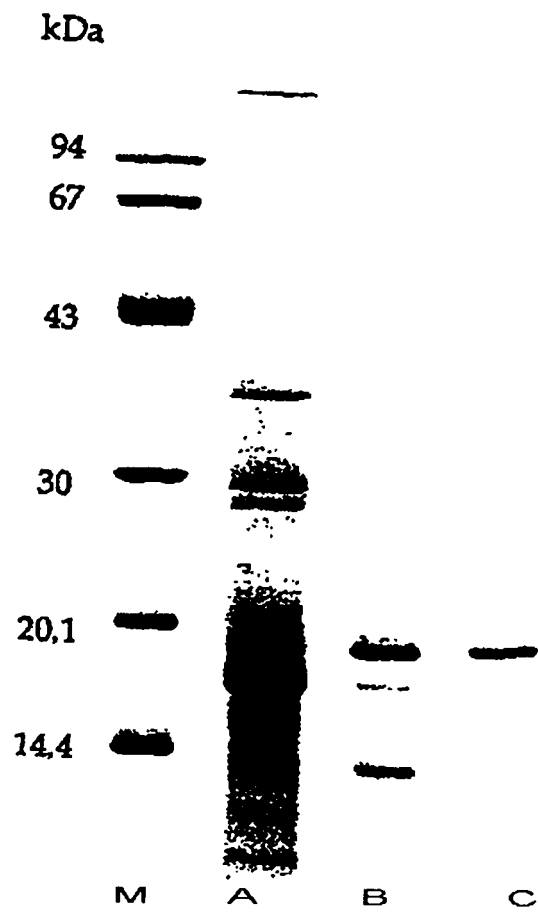


Fig. 2

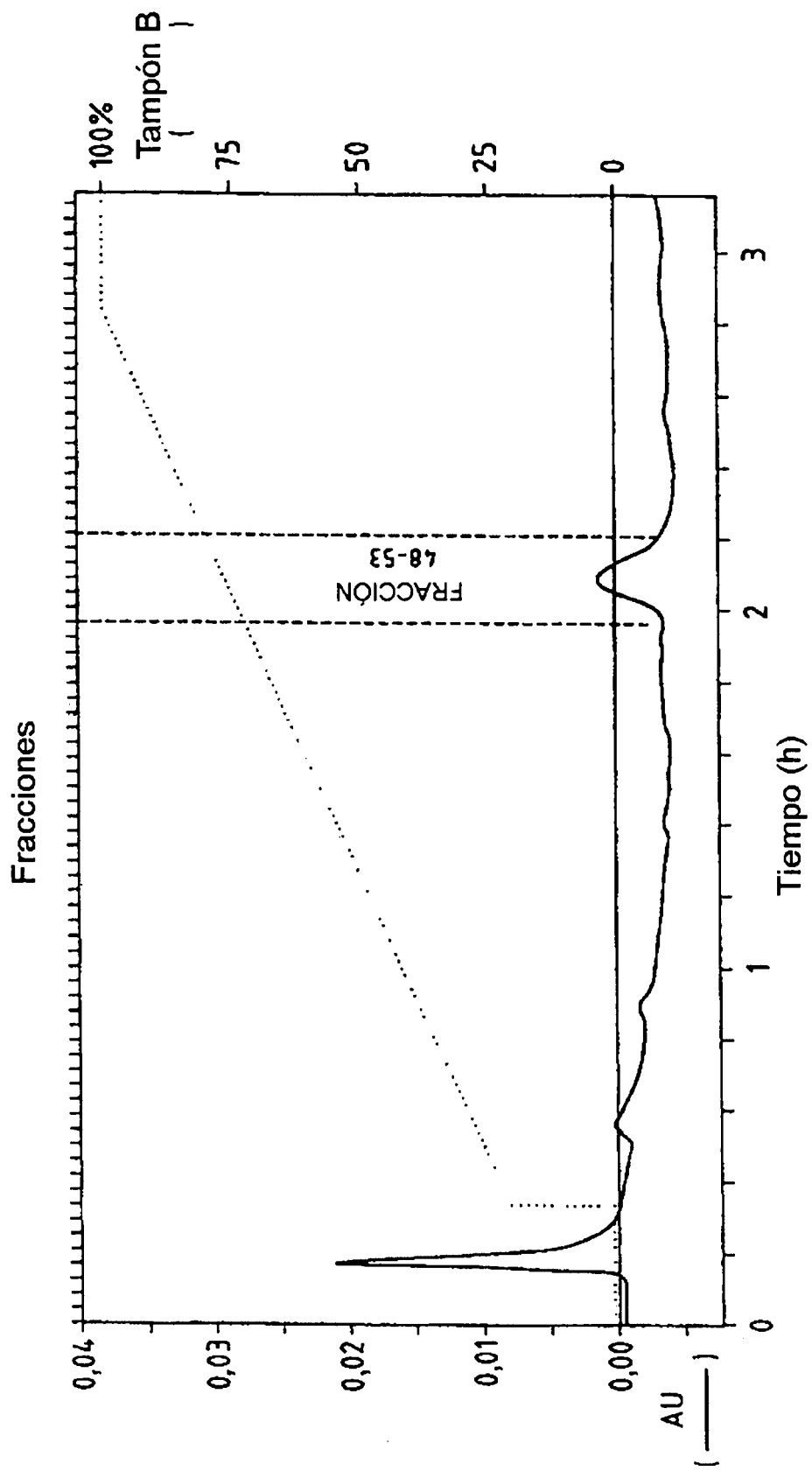
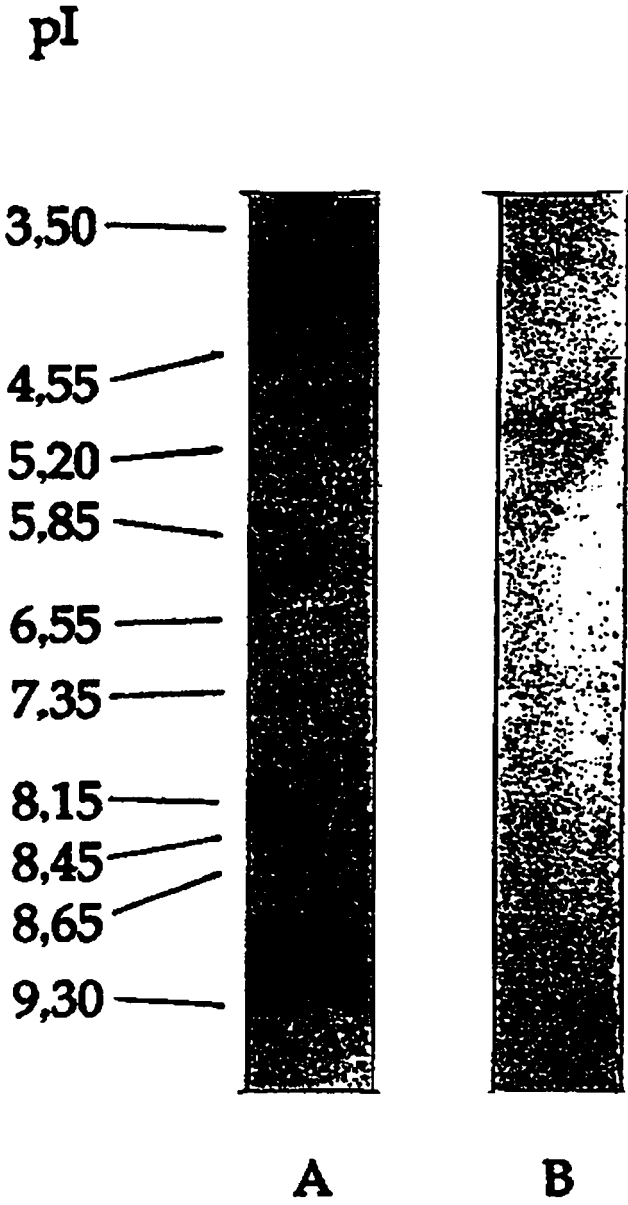
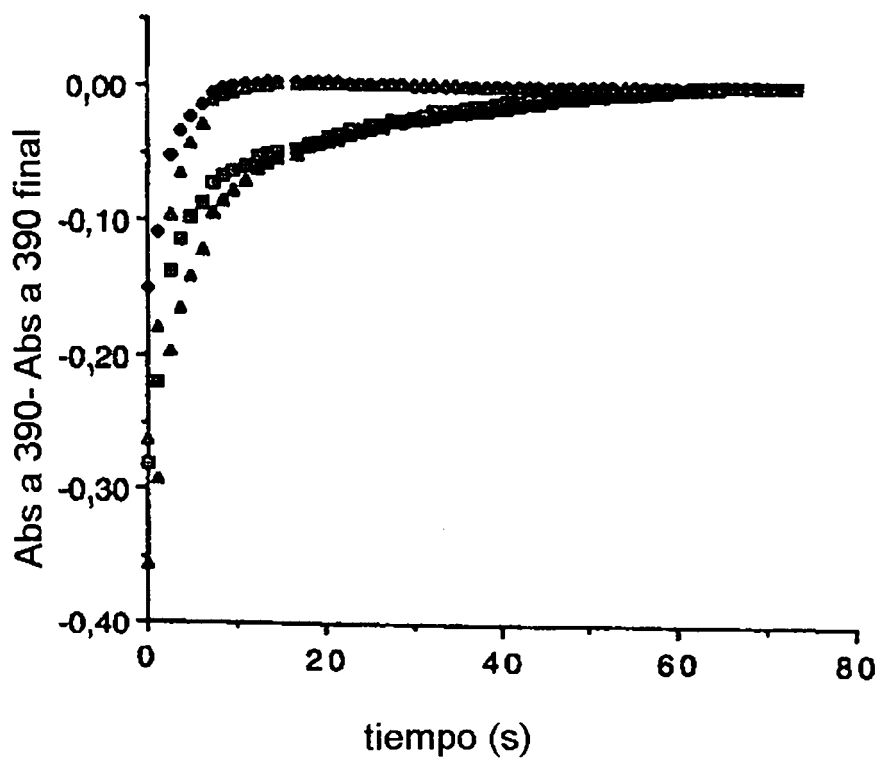
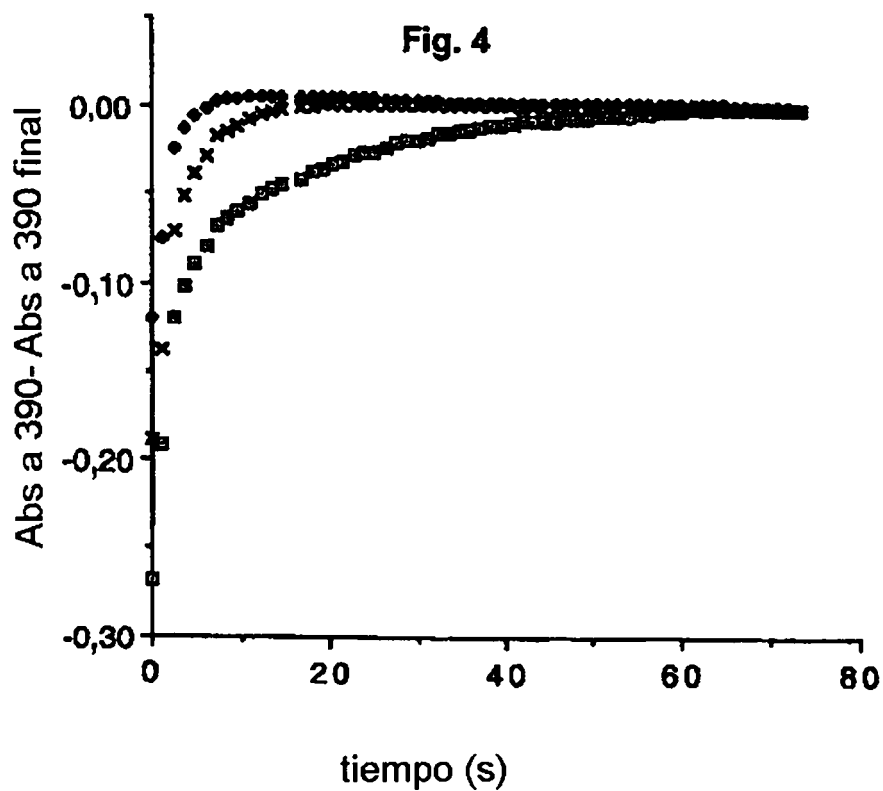


Fig. 3





ES 2 272 026 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Fundación SCAP
5 <120> Ciclofilina como nuevo alergeno
<130> 5673EPSeq
<140>
<141>
10 <160> 1
<170> PatentIn ver. 2.
<210> 1
<211> 17
15 <212> PRT
<213> *Betula verrucosa*
<400> 1
20 Asp Phe Thr Ala Gly Asn Gly Thr Gly Gly Glu Ser Ile Tyr Gly Ala
1 5 10 15
Lys
25
30
35
40
45
50
55
60
65