



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ N.º de publicación: **ES 2 081 255**

⑫ Número de solicitud: 9400017

⑬ Int. Cl.⁶: A61K 38/16

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **05.01.94**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.96**

Fecha de concesión: **29.07.96**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.09.96**

⑱ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.09.96

⑲ Titular/es: **Industrial Farmacéutica y de
Especialidades, S.A.
Alameda de Urquijo, 27
48008 Bilbao, Vizcaya, ES**

⑳ Inventor/es: **Palacios Pelaez, Ricardo;
Martínez Garate, Alberto y
Martínez Quesada, Jorge**

㉑ Agente: **Ungría Goiburu, Bernardo**

㉒ Título: **Aplicación de las proteínas receptoras de autoincompatibilidad (SLSG) de plantas para el
tratamiento de las enfermedades alérgicas.**

㉓ Resumen:

Aplicación de las proteínas receptoras de autoincompatibilidad (SLSG) de plantas para el tratamiento de las enfermedades alérgicas.

Las proteínas receptoras de autoincompatibilidad (SLSG) extraídas de los pistilos de las flores de plantas angiospermas, en un estadio de maduración correspondiente a uno o varios días antes de la antesis, tienen utilidad para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de las enfermedades alérgicas mediadas por IgE.

ES 2 081 255 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

DESCRIPCION

Aplicación de las proteínas receptoras de autoincompatibilidad (SLSG) de plantas para el tratamiento de las enfermedades alérgicas.

Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de los productos de origen vegetal para el tratamiento de las enfermedades alérgicas mediadas por IgE.

Más particularmente, la presente invención se refiere a nuevas aplicaciones de los receptores de autoincompatibilidad de las plantas (SLSG) en el tratamiento potencial de dichas enfermedades con alta eficacia en base a su demostrada capacidad de interferencia de la unión IgE-alérgeno in vitro.

Estado de la técnica anterior a la invención

Las plantas con flores (angiospermas) son en su mayoría (95%) hermafroditas, es decir, presentan en los mismos individuos órganos sexuales masculinos -los pólenes, producidos por las anteras- y órganos femeninos, que corresponden a los pistilos. Este hecho junto a la inmovilidad de las plantas es un factor que predispone a la autofecundación, fenómeno mediante el cual las especies perderían la variabilidad genética que posibilita su supervivencia. Para evitarlo, las plantas disponen de un mecanismo de autoincompatibilidad basado en la detención del crecimiento del tubo polínico, mecanismo que ya desde 1.977 se sabe está ampliamente distribuido en las angiospermas [(1) De NETTANCOIRT D. Incompatibility in angiosperms. Springer-Verlag, New York (1977)].

La fecundación cruzada en estas plantas ocurre cuando el grano de polen de otro individuo de la misma especie alcanza el orificio superior del pistilo llamado estigma, donde una vez que el polen es reconocido, comienza el desarrollo del tubo polínico, que baja a lo largo del cuello del pistilo (estilo) hasta llegar al ovario situado en el interior, donde se producirá la fecundación del óvulo.

El desarrollo de las técnicas de genética molecular aplicados al campo de la fisiología vegetal han llevado a un conocimiento bastante avanzado de los mecanismos de autoincompatibilidad, fundamentalmente en dos especies vegetales: la col (*Brassica oleracea*) y un tabaco ornamental (*Nicotiana glauca*). En concreto, el grupo de Adrianne Clarke de la Universidad de Melbourne (Australia) en 1986 identificó los genes responsables de la autoincompatibilidad (llamados genes S) en *Nicotiana glauca* [(2) ANDERSON M.A. CORNISH E.C., MAV, S.L., WILLIAMS E.G., HOGART R. Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*, 321: 38-44 (1986)] y en 1985, el equipo de Mike y June Nasrallah de la Universidad de Cornell (Estados Unidos) identificaron los primeros genes S en *Brassica oleracea*. [(3) NASRALLAH J.B. KAO T.H. GOLDBERG M.L., NASRALLAH M.E. A cDNA clone encoding an S-locus-specific glycoprotein from *Brassica oleracea*. *Nature*, 318, 263-267 (1985)].

Brassica parece presentar un modelo de autoincompatibilidad más evolucionado que *Nicotiana* y ha centrado la mayoría de los estudios efectuados desde dichas fechas. Así, se ha con-

seguido caracterizar la secuencia aminoacídica de las glicoproteínas expresadas por los genes S [(4) NASRALLAH J. B., KAO T. H., CHEN CH., GOLDBERG M.L., NASRALLAH M.R. Aminoacid sequence of glycoproteins encoded by three alleles of the S locus of *Brassica oleracea*. *Nature*, 326: 617-619 (1987)], que son las moléculas receptoras que van a reconocer el grano de polen, y que van a dar lugar a su neutralización en caso de que sea del mismo individuo. Estas proteínas se han bautizado como SLSG (de S-locus specific glycoproteins) son polimórficas y codificadas por diferentes alelos, presentando pesos moleculares entre 57 y 65 kilodaltons [(5) NASRALLAH J.B., NASRALLAH M.E. The molecular genetics of self-incompatibility in *Brassica*. *Ann. Rev. Genet.* 23: 121-139 (1989)].

Los distintos alelos presentan alternancia de regiones muy conservadas y regiones hipervariables [(6) NASRALLAH J.B., YU, S.M. NASRALLAH, M.E. Self-incompatibility genes of *Brassica oleracea*: Expression, isolation and structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5551-5555 (1988)], lo cual indica una semejanza con la estructura de los genes de anticuerpos o del complejo mayor de histocompatibilidad que determina el reconocimiento entre lo propio y lo ajeno. En este caso, se trata del mecanismo a la inversa, para discernir lo propio, que es rechazado, y aceptar el polen ajeno.

Sobre las proteínas SLSG de *Brassica* se sabe también que son sintetizadas en los estigmas [(7) NASRALLAH, J.B., DONEY R.C. y NASRALLAH, M.E. Biosynthesis of glycoproteins involved in the pollen-stigma interaction of incompatibility in developing flowers of *Brassica oleracea* L. *Planta* 165, 100-107 (1985)], y que se acumulan en sus células papilares donde se constituye la barrera para el desarrollo del polen incompatible [(8) KANDASAMT M.K., PAOLILLO D.J., FARADAY C.D., NASRALLAH J.B., NASRALLAH M.E. The S. locus specific glycoproteins of *Brassica* accumulate in the cell wall of developing stigma papillae. *Dev. Biol.* 134: 462-472 (1989)]. La respuesta de autoincompatibilidad se manifiesta uno o dos días previos a la antesis (o liberación del polen de las anteras florales) y se ha comprobado que en esos días es precisamente cuando se produce la acumulación y síntesis de dichas proteínas en el estigma [(7) y (9) RIBERTS I. N. STEAD A. D., OCKENDON, D. J., DICKINSON H.G. A glycoprotein associated with the acquisition of the self-incompatibility system by maturing stigmas of *Brassica oleracea*. *Planta* 146, 179-183 (1979)].

El grado de conocimiento de estas proteínas receptoras de autoincompatibilidad (SLSG) está tan avanzado que no sólo se conoce la secuencia nucleotídica de los genes que las expresan (genes SGL) [(10) SCOTT C.P. GATES P.J., GATEHOUSE J.A., BOULTER D., CROY R.D. A cDNA encoding an S-locus specific glycoprotein from *Brassica oleracea* plants containing the S₅ self-incompatibility allele. *Mol. Gen. Genet.* 220: 409-413 (1990)] y su composición aminoacídica y glucídica [(11) TAKAYAMA S. ISOGA A, TSUKAMOTO C, UEDA Y, HINATA K. Structure of Carbohydrate chains of

S-glycoproteins in *Brassica campestris* selfincompatibility locus. *Nature*, 326: 102-104 (1987)], sino que también se han producido anticuerpos monoclonales frente a ella con los que se ha confirmado por técnicas inmunocitoquímicas su síntesis en el citoplasma de las células papilares con subsiguiente incorporación a las paredes de dichas células [(8) y (12) ROBERTS I.N., HARROD G. y DICKINSON H.G. Pollen-stigma interactions in *Brassica oleracea* I. Ultrastructure and physiology of the stigmatic papillar cells. *J. Cell. Sci.* 66: 241-253 (1984)]. Pese a ello, no se ha podido esclarecer aún el mecanismo molecular de la neutralización del autopolen a través del sistema de autocompatibilidad representado por las proteínas SLGG, tal y como advierten Dumas y cols. [(13) DUMAS C. GAUDE T. HEIZMANN P., ROUGIER. *La Recherche*, 13:576-578 (1993)], si bien, se ha apuntado que la respuesta de autoincompatibilidad opera a nivel de interacción célula-célula entre las del grano de polen y las papilares con las que contacta en el estigma.

Aunque en flores de otras plantas no se ha estudiado tan exhaustivamente el sistema de autoincompatibilidad como en *Brassica*, sí se han caracterizado proteínas del estilo asociadas con el proceso de reconocimiento del polen y su posterior desarrollo del tubo en especies como: *Prunus avium* (cereza) [(14) MAU S.L., RAFF J., CLARKE A.E. Isolation and partial characterization of component of *Prunus avium* styles, including an S-allele-associated antigenic glycoprotein. *Planta* 156: 505-516 (1982)], *Lycopersicon peruvianum* (tomate) [(15) MAU S.L., WILLIAMS E.G., ATKINSON A., ANDERSON M.A., CORNISH M.C., GREGO B., SIMPSON R.J., KHEYR-POUR A., CLARKE A.E. Style proteins of a wild tomato (*Lycopersicon peruvianum*) associated with expression of self-incompatibility. *Planta* 169: 184-191 (1986)], *Nicotiana glauca* (tabaco ornamental) [(16) JAHNEN W., BATTERHAM M.P., CLARKE A.E., MORITZ, R.L., SIMPSON, R. J. Identification, isolation and N-terminal sequencing of style glycoproteins associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Plant Cell. I.*: 493-499 (1989); (17) KURODA S. ISHIHARA K., SAKIYAMA F. Use of SMART System for micropreparation of a plant protein. *Science Tools* 36:8 -9 (1992)] y *Pecunia hybrida* [(18) LINSKENS H.F., Incompatibility in *Petunia*. *Proc. R. Soc. Lond.* 188: 299-311 (1975); y (19) BROOthaerts W.J., VAN LAERE A., WITTERS R., PREAVY G., DECOCK B., VAN DAMME J., VNEDRIG J.C. Purification and N-terminal sequencing of style glycoproteins associated with self-incompatibility in *Petunia hybrida*. *Plant. Molecular Biology* 14: 93-102 (1989)]. En conjunto las proteínas SLGG de estas plantas presentan aspectos comunes como su naturaleza básica y un peso molecular entre 24 y 65 kDa (19). En *Petunia* se ha descrito además, que la inhibición del tubo polínico se realiza a todo lo largo del estilo, encontrándose estas proteínas no sólo en el estigma sino también en la matriz intercelular del estilo [(18) y (19)]. La proteína SLGG de *Nicotiana* ha podido ser purificada a homogeneidad y en un estado fisiológicamente activo a partir de unos po-

cos pistilos, mediante aplicación del sistema cromatográfico SMART (17).

Como se demuestra mediante los antecedentes bibliográficos expuestos, la investigación de las proteínas receptoras SLGG, siempre se ha abordado desde los campos de fisiología vegetal y la genética molecular, teniendo en consideración su aplicación en temas relativos a la fertilización e hibridación vegetal, pero en ningún caso, bajo la aplicación que se presenta en la siguiente memoria.

Hasta la fecha actual, no se ha patentado, publicado o comunicado -y ni siquiera sugerido- la aplicación de dichas proteínas para el tratamiento de las enfermedades alérgicas. Una aplicación que el solicitante basa en los dos siguientes postulados:

1) Los pacientes alérgicos o hipersensibilizados, tienen como patrón común, el de presentar un incremento de sus tasas séricas del anticuerpo inmunoglobulina E (IgE). Esta IgE es específica del alérgeno al que el individuo está sensibilizado y presenta una gran afinidad por el mismo. Habitualmente, existen dos tipos celulares que presentan receptores para el fragmento Fc de la IgE: los basófilos en la sangre, y los mastocitos abundantes en tejido conectivo.

Las IgE, una vez fijadas por el fragmento Fc a los anteriores tipos celulares, puentean diméricamente el alérgeno y originan la liberación de la histamina almacenada en los gránulos citoplasmáticos y otros mediadores preformados hacia los tejidos colindantes originando el cuadro alérgico correspondiente, dependiente de la ubicación de los mastocitos en el tejido sensibilizado (rinitis, conjuntivitis, asma, etc)

Actualmente, la alergia por hipersensibilidad inmediata, se trata bien por inmunoterapia, o bien por farmacoterapia. En el primero de los casos, que es un tratamiento causal, la incorporación gradual de las proteínas que causan la alergia en el paciente van progresivamente desensibilizándole mediante el estímulo en la producción de anticuerpos IgG específicos "bloqueantes" y otros eventos celulares.

Los fármacos más utilizados en el tratamiento (sintomático) de la alergia son: antihistaminicos (competidores análogos de los receptores para la histamina), estabilizadores de membrana (cromoglicato y nedocromil), corticosteroides, β -agonistas, anticolinérgicos y broncodilatadores [(20) HOLGATE S.T., CHURCH M.K., *Allergy*, Gower Medical Publishing, London. New York (1993)].

2) Durante los últimos dos años, se ha puesto de manifiesto un extraordinario interés por el estudio de las profilinas, que se han definido como pan-alérgenos, pues son proteínas muy ubicuas y se ha demostrado, a través del grupo holandés de Aalberse [(21) VAN REE R., VOITENKO V., VAN LEEUNEN W.A., AALBERSE R.C. Profilin is a crossreactive allergen in pollen and vegetable foods. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 98: 97-104 (1992)] y el austriaco de Valenta [(22) VALLIER P., DECHAMP C., VALENTA R., VIAL O., DEVILLER P. Purification and characterization of an allergen from celery immunochemically related to an allergen pre-

sent in several other plant species. Identification as a profilin. Clin. and Exper. Allergy, 22: 774-782 (1992)] que son alérgenos importantes en polénes y alimentos de numerosas especies investigadas, siendo responsables de su reactividad cruzada. Se ha sospechado incluso la existencia de estructuras similares en miel y veneno de himenópteros [(23) AALBERSE R.C., KOSHTE V., CLEMENS J.G.J. Immunoglobulin E. antibodies that cross-react with vegetable foods, pollen and hymenoptera venom. J. Allergy Clin Immunol. 68: 356-364 (1981)]. Se sabe que las profilinas son proteínas que controlan la polimerización de la actina en las células eucariotas [(24) ADEREM A. Signal transduction and the actin cytoskeleton: the roles of Marcks and profilin. TIBS 17: 438-443 (1992)] y por su función en el citoesqueleto actínico desempeñan un papel fundamental en el desarrollo del tubo polínico [(25) VALENTA R. y cols. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. J. Exper. Med. 175: 377-385 (1992)].

Frente al estado actual de la técnica anteriormente expuesto, la presente invención propone la utilización de las proteínas SLSG como antiidiotipos o factores de interferencia con la unión a las inmunoglobulinas, considerando que, cuando los alérgenos entren en contacto con las mucosas (nasal, bronquial u ocular) de los órganos diana de los pacientes alérgicos, en condiciones de humedad y temperatura semejantes a las de los pistilos, podrán ser neutralizados por dichas SLSG previamente introducidas en el organismo, dado que la profilina del polen (un importante panalérgeno) es neutralizada en los estigmas (o estilos) de las flores por las mencionadas proteínas receptoras SLSG.

De acuerdo con lo anterior, el solicitante propone la aplicación de las SLSG a pacientes afectados de alergia por hipersensibilidad inmediata, como un posible tratamiento para estas patologías.

Breve descripción de las figuras

Figura 1.- RAST-Inhibición de D. pteronyssinus con extracto de Alnus.

Figura 2.- RAST-Inhibición de Phleum pratense con extracto de Alnus.

Figura 3. - RAST-Inhibición de Parietaria judaica con extracto de Alnus.

Figura 4.- RAST-Inhibición de una mezcla de gramíneas con extracto de Alnus.

Figura 5.- RAST-Inhibición de Olea europaea con extracto de Alnus.

Figura 6.- RAST-Inhibición de veneno de abeja con extracto de Alnus.

Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como indica su enunciado, se refiere a la aplicación de las proteínas receptoras de autoincompatibilidad (SLSG) de las plantas para el tratamiento de las enfermedades alérgicas mediadas por IgE.

La materia prima a partir de la que se efectúa el aislamiento de las proteínas SLSG, la constituyen los pistilos u órganos femeninos de las plantas con flores (angiospermas). Estas deben encontrarse en un concreto estadio de maduración: el correspondiente a uno o dos días antes de la antesis. El aislamiento se puede realizar por dos vías alternativas: bioquímica o genética.

a) *Bioquímica*: La extracción se realiza en medio acuoso por agitación magnética, que puede ser reforzada utilizando algún sistema más drástico de homogeneización con trituración por aspas o cizalladura. Se puede incrementar la hidrofobicidad del medio con adición de agentes surfactantes a baja concentración. Las proteínas solubilizadas en el medio acuoso son separadas del resto de estructura sólida vegetal mediante centrifugación, para a continuación dializar el sobrenadante que las contiene mediante ultrafiltración tangencial, o bien diálisis por difusión pasiva. Tras la diálisis, el extracto es clarificado por filtración, de este modo se obtiene el extracto crudo del pistilo conteniendo las proteínas SLSG en disolución. La preparación puede almacenarse de manera estable por congelación o liofilización.

La purificación posterior de las proteínas SLSG puede realizarse por cromatografía en columna de concanavalina A Sepharosa (específica para glicoproteínas) o bien por cromatografía de intercambio iónico en columna intercambiadora catiónica con relleno Mono-S (sistema SMART).

b) *Genética*: En el caso concreto de la Brassica, al conocerse la secuencia de los genes que codifican las proteínas SLSG, se pueden seleccionar los primeros oligonucleótidos convenientes, para realizar la amplificación del gen por técnica de PCR (Polymerase chain reaction) con posterior expresión en microorganismo tipo E. coli transformándolo con el plásmido recombinante resultante, obteniendo dichas proteínas SLSG, realizando primeramente un estudio comparativo de las proteínas recombinantes con las nativas para asegurar su homología.

Las proteínas SLSG extraídas de estigmas muestran en electroforesis de SDS-PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico) un esquema complejo con varias especies de pesos moleculares próximos, diferenciando en aproximadamente 2000 daltons y con un peso molecular medio de entre 57 y 65 kDa. Este polimorfismo puede asumirse puesto que refleja la variabilidad que requiere el reconocimiento específico del polen.

En su momento de mayor expresión constituye el 5% del total de proteínas solubles sintetizadas en el estigma del pistilo.

Las SLSG llevan de 5 a 7 cadenas laterales de oligosacáridos en la región N-terminal de la proteína. Se ha determinado que los oligosacáridos tienen una composición en azúcares neutros y xilosa, fucosa y manosa en proporción de 4,1:4,9:12,1 mol/mol de proteína. Los enlaces glicosídicos comprenden el grupo amida de residuos de asparragina con el carbono anomérico de N-acetilglucosaminas. La parte glucídica de la molécula no es responsable de la especificidad en la interacción polen-estigma.

Las proteínas SLSG presentan un número me-

dio de 436 aminoácidos y un punto isoelectrico básico en torno a 8,6.

El solicitante ha aplicado las proteínas SLGS para inhibir la reacción de RAST (Radio allergo sorbent test) que constituye un modelo in vitro de la reacción alérgica y por tanto resulta predictivo del mecanismo operativo en pacientes alérgicos.

La técnica RAST fue diseñada [(26) CESKA M., LUNDQVIST U. A new and simple radioimmunoassay method for the determination of IgE. *Immunochemistry* 9:102-105 1972] para el diagnóstico in vitro de enfermedades alérgicas de tipo I (hipersensibilidad inmediata) que son las mediadas por anticuerpos de la clase IgE. Dado que la base demostrada de esta alergia es la unión de la proteína alérgica a sus IgE específicos con posterior desencadenamiento de la degranulación celular, se ideó un sistema, según el cual, los alérgenos se acoplan a un disco de papel (mediante reacción de activación química) que se coloca en el fondo de un tubo. Al añadir el suero de un paciente sensibilizado a un alérgeno en cuestión, sus IgE específicas se fijan a las proteínas alérgicas del disco. Estas moléculas de IgE son a continuación visualizadas mediante la adición de anticuerpos anti IgE humana, los cuales llevan una enzima conjugada químicamente, de manera que la subsiguiente adición de un sustrato incoloro dé lugar a la aparición de un producto coloreado fácilmente cuantificable.

Sobre esta técnica base, Yman y colaboradores [(27) YMAN L., PONTERIUS G., BRANDT R. RAST-bases allergen assay methods. In: Rigamy, A.P.; Hennessen, W.; Perkins, F.T. (eds) *Developing Biological Standards*. Basel: S. Karger Verlag, 29: 151-165, 1975], proyectaron una variante consistente en adicionar alérgeno en fase líquida para competir con los alérgenos del disco por las IgE séricas, de modo que la nueva técnica (denominada RAST-inhibición) sirviera para evaluar la potencia (afinidad) de las proteínas alérgicas añadidas en fase líquida.

Dentro de este marco técnico y basándose en la hipótesis de que las proteínas SLGS son capaces de neutralizar los alérgenos del polen y todas aquellas estructuras análogas -presumiblemente por fijación previa- el solicitante llevó a cabo toda una serie de ensayos en los que se prueba la capacidad de interferencia de proteínas SLGS aisladas de pistilos de plantas diferentes, sobre la unión IgE-alérgeno, en experimentos de RAST-inhibición, utilizando diversos sistemas de alérgeno-suero positivo.

En concreto, se han utilizado proteínas extraídas a partir de:

- a) Inluorescencias inmaduras de *Alnus glutinosa* (Aliso)
- b) Inluorescencias inmaduras de *Parietaria judaica* (Parietaria)
- c) Pistilos de *Tulipa sp* (Tulipán)
- d) Pistilos de *Populus alba* (Chopo)

En los párrafos siguientes se analizan en detalle cada uno de estos casos:

- a) El *alnus glutinosa* (aliso) es una planta

con la que más estudios se han realizado. La inluorescencia de *Alnus* está constituida por el pistilo en más de un 90% de su estructura. Se aislaron sus proteínas SLGS mediante extracción acuosa obteniéndose un extracto crudo que fue cuantificado colorimétricamente y caracterizado por SDS-PAGE. Se realizaron dos extracciones, en diluyente acuoso y ligeramente hidrofóbico (con Tritón X-100). Utilizando ambos extractos a dos concentraciones diferentes, se logró inhibir significativamente el RAST a polen de *Parietaria judaica* (*Parietaria*), polen de *Olea europaea* (olivo), mezcla de pólenes de gramíneas, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Ácaro del polvo doméstico), y veneno de *Apis mellifera* (Abeja). En todos los casos, se efectuó en paralelo un ensayo de inhibición RAST con cada alérgeno a distintas concentraciones a modo de referencia comparativa. Enriqueciendo el extracto por precipitación con sulfato amónico, se aumentó el nivel de inhibición. En todos los sistemas alérgicos se encontraron, a la máxima concentración de extracto de SLGS, niveles similares de inhibición que se situaron entre el 50 y el 70%.

El extracto con Tritón X-100 inhibió en mayor medida los RAST a polen de *Olea europaea* y de *Parietaria judaica* mientras que el extracto acuoso mostró niveles similares de inhibición para gramíneas y veneno de abeja.

Estos resultados son indicativos de una cierta hidrofobicidad de las proteínas SLGS, lógica considerando su función de receptores celulares.

b) Con las proteínas de pistilos de *Parietaria judaica* se obtuvo inhibición en los dos sistemas alérgicos ensayados. Inhibió, hasta altos niveles (80-90%) el RAST a polen de *Parietaria judaica* y también en menor medida el RAST a otro ácaro del polvo doméstico, el *Dermatophagoides farinae*. Tanto el extracto acuoso, como el obtenido con detergente (Tritón X-100) mostraron poder inhibitorio.

c) Las flores de Tulipán presentan unos pistilos de gran tamaño, sin embargo, no se obtuvo inhibición con sus extractos proteicos, posiblemente por la dificultad de obtener plantas en período de expresión de las SLGS.

d) Utilizando extractos de pistilos de *Populus alba* (Chopo) se han logrado inhibir todos los sistemas alérgicos probados: pólenes de *Helianthus annuus* (Girasol), *Parietaria judaica*, *Lolium perenne* (Olivo), mezcla de gramíneas y el ácaro del polvo doméstico, *Dermatophagoides pteronyssinus*. En todos los casos el RAST fue inhibido en niveles que variaron desde el 44 al 73%, dependiendo del sistema alérgico y la concentración de extracto de pistilos utilizada.

Por último, es de destacar que con todos los sistemas florales estudiados, se comprobó la presencia de proteínas en el extracto en la zona de pesos moleculares de 45 a 65 kDa del gel de SDS-PAGE compatibles con las SLGS.

Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance que viene definido única y exclusivamente por la Nota Reivindicatoria adjunta.

Ejemplo 1

Aislamiento de SLSG a partir de Alnus glutinosa.

Se utilizaron influorescencias femeninas inmaduras de *Alnus glutinosa* (Aliso) de estadio previo a la antesis como materia prima. Se comprobó microscópicamente la ausencia de otras partes de plantas o pólenes.

Se extrajeron 40 g de dicho material (previamente congelado a -20°C) mediante suspensión en 200 ml de agua ultrapurificada. La homogeneización se efectuó en un aparato VIRTISHEAR-25 (homogeneizador de aspas) a 25.000 rpm añadiendo un 50% del volumen con bolas de vidrio de 400-600 μm para facilitar la ruptura de las paredes celulares.

La separación de las proteínas solubilizadas del resto de estructura sólida se llevó a cabo por centrifugación a 5.000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante de la centrifugación fue dializado frente a agua extrapurificada por ultrafiltración tangencial en el sistema Pellicon (Millipore) con membrana de corte de 5.000 daltons. Todo el proceso se realizó a $4-8^{\circ}\text{C}$. De este modo se obtuvo el extracto acuoso que fue caracterizado y aplicado directamente (tras filtración por membrana de 0,22 μ de poro, o bien fue almacenado en estado liofilizado hasta su uso.

El sedimento de la mencionada centrifugación fue sometido a una nueva extracción, esta vez en líquido de coca con Tritón X-100 al 0,1 % en un volumen de 200 ml por agitación magnética (11.000 rpm) durante 48 horas a 4°C . Seguidamente, se efectuaron los pasos de centrifugación, ultrafiltración, filtración y liofilización, bajo las mismas condiciones descritas para el extracto acuoso.

Ejemplo 2

Caracterización del extracto de Alnus glutinosa obtenido en el Ejemplo 1.

El contenido proteico del extracto de pistilos de *Alnus glutinosa* se determinó por el método de Bradford (conocido comercialmente como BIO-RAD), de acuerdo con el siguiente protocolo:

Determinación de Proteína por el método BIO-RAD. Procedimiento "microassav" (microtest)

Se basa en el método diseñado por Bradford, fundamentado en el desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorción que sufre el Azul de Coomassie G-250 de 465 a 595 nm cuando se une a las proteínas.

Preparación del Patrón:

A partir de la disolución comercial (BIO-RAD Standard II) de BSA o Albúmina Fracción a MERCK, a concentración de 1498 $\mu\text{g}/\text{ml}$ que se denominará Disolución A, se prepararon 7 nuevas disoluciones (B, C, D, E, F, G, H) de las cuales las 5 últimas (D-H) se utilizaron para construir la recta de calibrado.

Las disoluciones se formaron de la siguiente manera:

Disolución A (1498 $\mu\text{g}/\text{ml}$) : Descongelar una alícuota de la Standard Comercial
Disolución B (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) : 0,1 ml Disol. A + 0,9 ml H_2O ó SSFF

Disolución C (75 $\mu\text{g}/\text{ml}$) : 1 ml Disol. B + 1 ml H_2O ó SSFF

Disolución D (37,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) : 2 ml Disol. C + 2 ml H_2O ó SSFF

Disolución E (18,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) : 2 ml Disol. D + 2 ml H_2O ó SSFF

Disolución F (9,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) : 2 ml Disol. E + 2 ml H_2O ó SSFF

Disolución G (4,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) : 2 ml Disol. G + 2 ml H_2O ó SSFF

Procedimiento:

Se tomó un duplicado de 0,8 ml de las diluciones D-E-F-G -H y un blanco (H_2O ó Solución salina fisiológica fenolada) y se le añadieron 0,2 ml de reactivo concentrado, tras agitar la mezcla, se leyó la absorbancia al de 5-60 minutos a 595 nm. Se representó la absorbancia a 595 nm frente a la concentración de proteína. El ensayo fue válido, pues el coeficiente de correlación fue igual o mayor de 0,98.

Resultado:

Mediante la técnica descrita, se determinó un contenido proteico del 5,4% (respecto a la masa total liofilizada) para el extracto acuoso y un 9,1 % para el extracto obtenido con Tritón X-100.

La caracterización del peso molecular de las proteínas obtenidas se realizó por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico) de acuerdo con el método que se describe a continuación.

Se efectuó, básicamente, por el método de Laemmli, con modificaciones leves, propias y de las diseñadas por los fabricantes de equipo de electroforesis (horizontal) utilizado: Mini-Protean II (Bio-Rad). Los tampones y disoluciones empleados fueron los siguientes:

a. *Solución Bis-acrilamida*
Acrilamida 87,6 g (29,2 g/100 ml)

N-N'-bis-metilen-acrilamida 2,4 g (0,8 g/100 ml)

Agua Destilada 300 ml

Filtrado y almacenado a 4°C en oscuridad.

b. *1,5 M Tris-HCl pH= 8,8 (Running)*

Tris base 27,23 g (18,15/100 ml)

Agua destilada 150 ml

Se ajustó el pH a 8,8 con HCl 1N y se almacenó a 4°C hasta su uso.

c. *0,5 M Tris-HCl pH= 6,8 (Stacking)*

Tris base 6 g

Agua destilada 100 ml

Se ajustó el pH a 6,8 con HCl 1N y se almacenó a 4°C .

d. *Disolución de SDS al 10%*

SDS 10 g

Agua destilada 100 ml

e. *Tampón de tratamiento ("Sample buffer")*

Agua destilada 4,0 ml

0,5 M Tris-HCl PH= 6,8 1,0 ml

Glicerol 0,8 ml

SDS 10% 1,6 ml

2-B-mercaptoetanol 0,4 ml

Azul de bromofenol 0,5 % 0,2 ml

Las muestras se calentaron a 100°C durante 5

minutos.

f. *Tampón de electrodos pH = 8,3 (5X)*

Tris base 9 g (15 g/l)

Glicina 43,2 g (72 g/l)

SDS 3,0 g (5 g/l)

Agua destilada 600 ml

Se almacenó a 4°C y se calentó a 37°C cuando se produjo precipitación.

Se diluyeron 60 ml de tampón stock 5X con 240 ml de agua destilada.

g. *Disolución de azul de coomassie (Tinción)*

Azul de Coomassie R-250 1 g

Metanol 400 ml

Acido Acético 100 ml

Agua destilada 500 ml

Tiempo de tinción: 30 minutos

h. *Disolución desteñidora*

Metanol 400 ml

Acido Acético 100 ml

Agua destilada 500 ml

Tiempo de desteñido: 1-3 horas

Método:

1. *Montaje de placas*

Se siguieron las instrucciones del catálogo "mini-protean II dual slab cell".

2. *Preparación del gel separador (% de acrilamida 12,5%)*

Agua destilada 3,1 ml

1,5 M Tris-HCl pH = 8,8 2,5 ml (0,376 M)

SDS 10% 100 µl (0,1%)

Solución Bis/Acrilamida 4,3 ml (9,68% ACA; 0,26%BIS)

..... Se desgasificó 10'

Persulfato amónico (fresco) 75 µl (30 mg/ml)

Temed 6 µl

Cantidad por placa: 3,2 ml (tiempo de polimerización 1 h)

Interfase: 40 µl de SDS al 0,1 % por cada lado de la placa.

3. *Preparación del gel preparador (% Acrilamida 4%)*

Agua destilada 6,1 ml

0,5 M Tris-HCl pH 6,8 2,5 ml

SDS 10% 100 µl

Solución bis-acrilamida 1,3 ml (3,79% ACA)

..... Se desgasificó 10'

Persulfato amónico (fresco) 75 µl

Temed 10 µl

4. *Condiciones electroforéticas*

Voltaje: 200 voltios

Tiempo: 45 minutos

Determinación de pesos moleculares

Se llevó a cabo construyendo una recta de calibrado, representando la movilidad (en mm) manifestada por una serie de proteínas frente al logaritmo de su peso molecular (conocido). La movilidad se midió desde el comienzo del gel separador hasta el punto medio de la banda.

Una vez demostrada la correlación entre ambas variables ($r > 0,90$), el peso molecular de las proteínas o polipéptidos problema se determinó a

partir de sus movilidades. Las proteínas utilizadas como patrones fueron las del kit BIO-RAD para bajos pesos moleculares (Ref. 161-0304).

	Proteína	Peso molecular (daltons)
5	Fosforilasa b	97.400
	Seroalbúmina bovina	66.200
	Ovoalbúmina	42.699
10	Anhidrasa carbónica	31.000
	Inhibidor de tripsina	21.500
	Lisozima	14.400

Resultados

En el correspondiente esquema electroforético se observa que el extracto de pistilos de *Alnus* dio origen a una intensa y amplia banda en la zona de 60kDa de pesos moleculares, lo que es consistente con el carácter polidisperso de las proteínas SLSG. Esta banda supone más de un 90% de las proteínas del extracto.

Ejemplo 3

Estudio de la inhibición del RAST por las proteínas SLSG.

La capacidad de las proteínas receptoras SLSG de poder ser aplicadas como factor de interferencia de la IgE se demostró mediante la técnica de RAST-inhibición. Dichos ensayos se realizaron de acuerdo con el protocolo que se describe a continuación:

Elisa-Inhibición con fase sólida de discos de celulosa (RAST-Inhibición).

Nota: Para realizar las soluciones de alérgenos en fase libre, se utilizó el siguiente tampón de incubación.

Tampón de incubación

NaCl	9 g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	7,2 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1,3 g
Albúmina humana 20%	15 ml
Azida sódica	0,5 ml
Agua destilada hasta 1 litro	

1. Se prepararon concentraciones de alérgeno diferentes, en tampón de incubación, según esquema (alérgeno en fase libre: inhibidor).

(a): 10 mg/ml (en base al peso seco de material liofilizado)

(b): 1 mg/ml

(c): 0,1 mg/ml

(d): 0,01 mg/ml

2. Se colocaron los discos de alérgeno (fase sólida) en tubos, secándolos bien, por aspiración con pipeta al vacío.

3. Se añadieron 50 µl de sueros positivos y de cada una de las concentraciones de alérgeno.

4. Se taparon los tubos e incubaron 3h. a temperatura ambiente.

5. Se lavaron tres veces cada tubo, con la solución de lavado del kit de Phadezym RAST tracer.

6. Se añadieron 50 μ l de conjugado [Enzima (β -galactosidasa)-anti IgE] sobre cada uno de los discos (Phadezym RAST tracer)
7. Se taparon los tubos e incubaron durante la noche a 4°C.
8. Se lavaron 3 veces, igual que en el punto 5.
9. Se añadieron 200 μ l de solución de desarrollo (Development Solution, Phadezym RAST Tracer). Se colocaron 200 μ l de solución de desarrollo en dos tubos aparte, sin discos ni alérgeno en fase libre, ni suero para realizar los blancos de la lectura.
10. Se taparon los tubos e incubaron exactamente 2 horas a 37°C.
11. Se añadió 1 ml de solución de paro* (Stop Solution, Phadezym RAST tracer)

*Solución de paro: 4,2 g de carbonato de sodio en 100 ml de agua destilada.
12. Se midió la absorbancia a 420 nm, ajustando a cero con los blancos.

Resultados:

Algunos de los resultados más representativos obtenidos mediante la técnica descrita se presentan en las figuras 1 a 6 y se comentan a continuación:

Se realizó inhibición con el extracto acuoso de *Alnus glutinosa*, conteniendo proteínas SLSG a diferentes concentraciones en tres sistemas alérgicos: el ácaro *D. pteronyssinus*, el polen de gramíneas *Phleum pratense* y el polen de maleza *Parietaria judaica*. Al probar varias concentraciones de alérgeno y de *Alnus*, se pudieron construir las rectas de inhibición y de este modo, estimar sus dos parámetros básicos comparativos: la pendiente de la recta (m) que da una indicación de la homología de los sistemas comparados, y el valor IU₅₀ que, definido como la concentración de alérgeno en fase líquida que produce una inhibición del RAST del 50%, proporciona información sobre la afinidad (o potencia) de cada uno de los sistemas antígeno-anticuerpo.

En el sistema de *D. pteronyssinus* (figura 1), el extracto de *Alnus* produjo inhibiciones de hasta el 50,7% (a 10 mg/ml), por el 82% de autoinhibición del extracto de *D. pteronyssinus* a esa misma concentración. Como se observa en la figura, las pen-

dientes de las rectas son similares, y el extracto de *Alnus* inhibe con un factor de potencia 38 veces menor que el de *D. pteronyssinus* (calculado por el cociente de los IU₅₀ respectivos).

La inhibición del RAST a polen de *Phleum pratense* (figura 2) mostró aún mayor paralelismo entre las rectas del extracto homólogo y de *Alnus*. Este último produjo un máximo de inhibición del 53,1 % (por 88,3 % de *Phleum*) y una potencia relativa de 96 veces menos.

La recta de inhibición del RAST a polen de *Parietaria judaica* (figura 3) originada por el extracto de influorescencias (pistilo en más del 90%) de *Alnus*, fue también paralela a la ocasionada por el extracto del propio polen, alcanzando un 51,8% de inhibición a la máxima concentración utilizada (10 mg/ml), mientras que el de *Parietaria* fue de un 87,6 %. El cociente de los IU₅₀ indicó una potencia (o afinidad) de 47 veces menor en el extracto de *Alnus*.

En otra serie de experimentos (figuras 4-6) se comprobó la inhibición de los extractos de *Alnus*, tanto acuoso como levemente hidrófobos (con Tritón X-100) a dos concentraciones fijas 10 y 1 mg/ml, en tres sistemas alérgicos: mezcla de pólenes de gramíneas, polen de *Olea europaea* (Oливо) y veneno de abeja.

La inhibición del RAST a polen de gramíneas se presenta en la figura 4. Con ambos extractos de *Alnus* se consiguió una inhibición máxima del 64,7 y 63,0 % siendo mayor la del extracto obtenido con detergente (Tritón X-100) mientras que la máxima producida por el propio extracto de pólenes fue del 93,8 %.

En el sistema de polen de *Olea* (figura 5) la inhibición causada por el extracto de *Alnus* obtenido con detergente el 71,4 % a 10 mg/ml por 55,4 % del extracto acuoso y 91,5 % del propio extracto de *Olea* a las mismas concentraciones.

Un sistema tan dispar como el del veneno de abeja también fue inhibido (figura 6), alcanzándose máximos de inhibición (similares) del 70,4 y 69,6 % para los extractos de *Alnus*, con detergente y acuoso respectivamente y de un 83,7 % con el extracto homólogo, es decir, del veneno de abeja. A concentración de 1 mg/ml inhibe más, nuevamente, el extracto hidrófobo, lo que ratifica una vez más que las proteínas inhibidoras (SLSG) presentan una naturaleza levemente hidrófoba, pudiendo ser extraídas con disolventes acuosos o con adición de detergentes a bajas concentraciones.

REIVINDICACIONES

1. Aplicación de las proteínas receptoras de autoincompatibilidad (SLSG) extraídas de, los pistilos de las flores de plantas angiospermas, en un estadio de maduración correspondiente a uno

o varios días antes de la antesis, para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de las enfermedades alérgicas mediadas por IgE.

2. Aplicación según la reivindicación 1, **caracterizada** porque la citada proteína pertenece a la planta *Alnus glutinosa* (Aliso).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

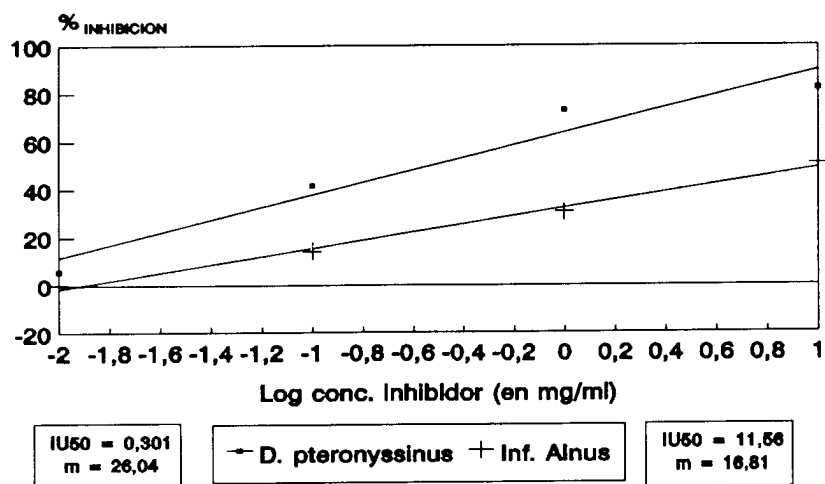


Figura 1

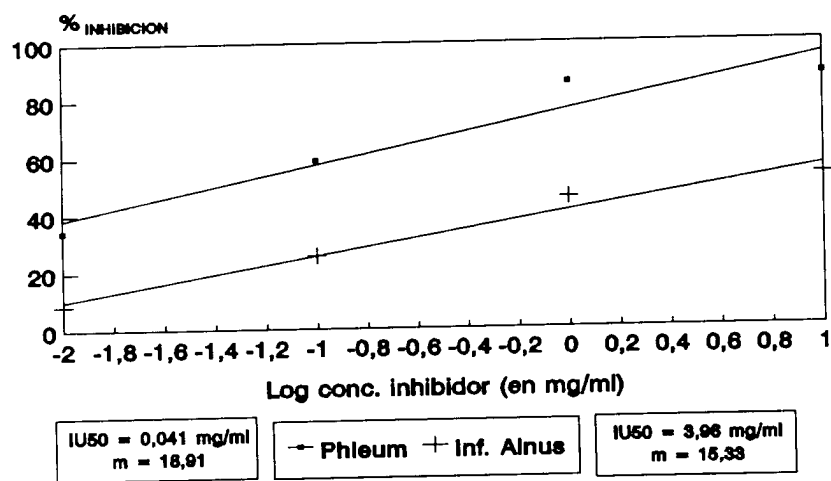


Figura 2

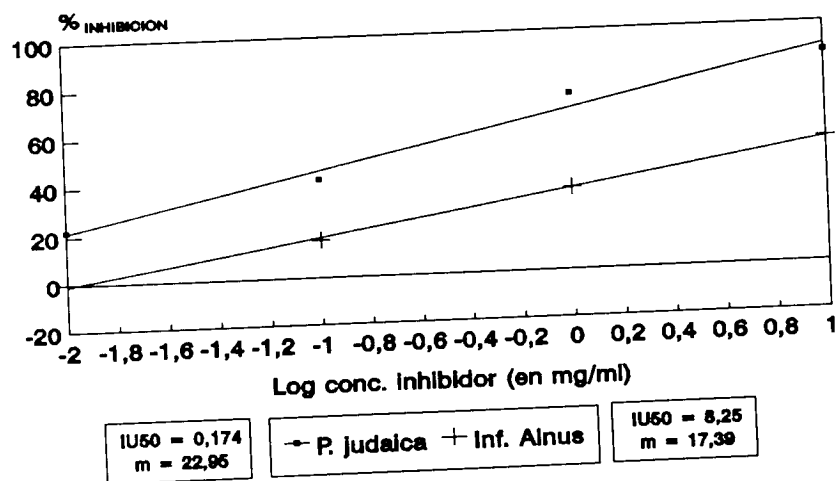


Figura 3

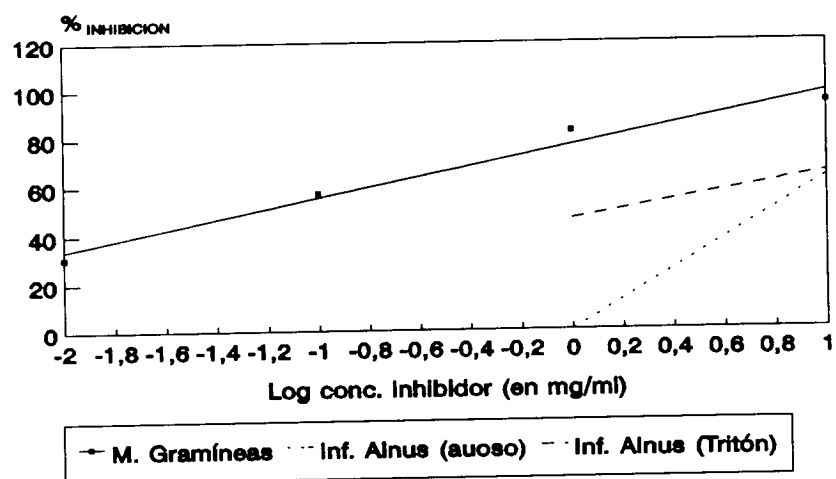


Figura 4

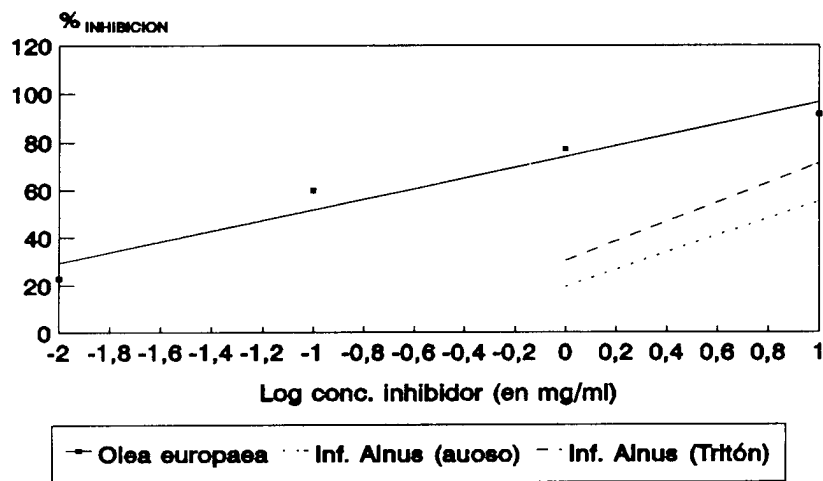


Figura 5

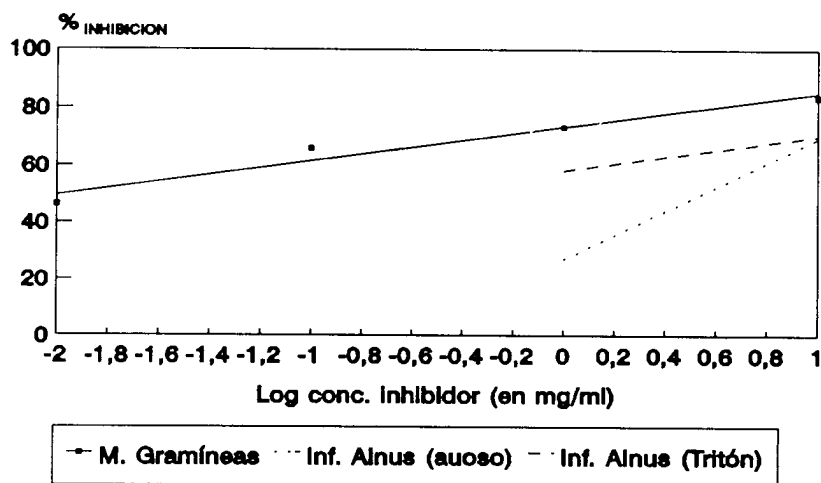


Figura 6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 081 255
⑫ N.º solicitud: 9400017
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 05.01.94
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: A61K 38/16

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP-436467-A (CIBA-GEIGY A.G.) 10.07.91	
A	WO-9203550-A (THE UNIVERSITY OF MELBOURNE) 05.03.92	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe 17.01.96	Examinador M. Novoa Sanjurjo	Página 1/1
--	---------------------------------	---------------