

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 262**

51 Int. Cl.:
C07K 14/415 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06007819 .3**
96 Fecha de presentación: **13.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1712560**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2006**

54 Título: **PROTEÍNAS HIPOALERGÉNICAS OBTENIDAS DEL ALÉRGENO PRINCIPAL DE PARIETARIA JUDAICA.**

30 Prioridad:
15.04.2005 IT MI20050669

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.12.2011

73 Titular/es:
**LOFARMA S.P.A.
VIALE CASSALA, 40
20143 MILANO, IT**

72 Inventor/es:
**Mistrello, Giovanni;
Zanotta, Stefania;
Roncarolo, Daniela;
Falagiani, Paolo y
Viotti, Angelo**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 371 262 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

Proteínas hipoalergénicas obtenidas del alérgeno principal de *Parietaria judaica*

5 La presente invención proporciona proteínas hipoalergénicas obtenidas a partir del alérgeno principal de *Parietaria judaica* Par j 1, composiciones farmacéuticas que las contienen y su uso en la profilaxis y terapia de enfermedades alérgicas causadas por el polen de plantas de las especies *Parietaria*.

Antecedentes de la invención

Las alergias están causadas por una disfunción en el sistema inmune, que reacciona produciendo anticuerpos de clase IgE frente a proteínas contenidas principalmente en el polen, ácaros, epitelios y algunos alimentos, proteínas que de por sí son completamente inocuas.

10 Estimaciones recientes indican que más del 10% de la población en los países occidentales sufre de esta enfermedad, que puede inducir a un empeoramiento de los síntomas (por ejemplo, aparición de asma) y una sensibilización a otros alérgenos con el tiempo, haciendo más complicada de esta manera la elección de una terapia apropiada.

15 La inmunoterapia específica (SIT), al contrario de la terapia farmacológica, es el único tipo de tratamiento etiológico de enfermedades alérgicas capaz de influir favorablemente sobre algunos parámetros inmunológicos que son la base de esta enfermedad.

La SIT consiste en la administración de dosis crecientes de extractos estandarizados (vacunas) obtenidos a partir de la misma sustancia que provoca la enfermedad.

20 De esta manera, una especie de tolerancia inmunológica a dicha sustancia aumenta gradualmente en el paciente, que viene acompañada por la desaparición de todos los síntomas alérgicos.

Sin embargo, el riesgo de provocar efectos secundarios (1), que pueden ser incluso graves aunque marcadamente reducidos con el uso de vacunas de liberación lenta o vacunas administradas a través de vías que son alternativas a inyecciones, ha limitado el uso de SIT en el tratamiento de enfermedades alérgicas.

25 En los últimos años, la atención se ha enfocado en el desarrollo de vacunas eficaces y más seguras. En particular, una diana importante es el desarrollo de vacunas que consisten en proteínas recombinantes mutagenizadas, es decir, variantes hipoalergénicas capaces de influir favorablemente en la progresión natural de la enfermedad sin provocar efectos secundarios indeseados (2).

30 El polen de *Parietaria* es una de las causas más importantes de alergia en el área mediterránea. Los dos alérgenos principales de este polen, Par j 1 (cuya secuencia de nucleótidos corresponde al número de acceso de GenBank AC X77414) y Par j 2 (AC X95865), son proteínas que tienen un peso molecular de aproximadamente 12 kD y son parcialmente homólogos en sus secuencias y funciones (3, 4, 5).

Descripción de la invención

Ahora se ha encontrado que el efecto alérgico de Par j 1 se puede disminuir modificando su secuencia a través de la sustitución o supresión de uno o más restos de aminoácidos.

35 De acuerdo con un primer aspecto, la invención proporciona una proteína hipoalergénica que es una variante de secuencia del alérgeno principal de *Parietaria judaica* (Par j 1) y que, en comparación con Par j 1 de tipo silvestre (SEC ID N°: 1), tiene reactividad reducida hacia IgE y contiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre **SEC ID N°: 6 y SEC ID N°: 7**.

40 La reactividad a IgE de las proteínas SEC ID N°: 6-7 a partir de una combinación de sueros de sujetos alérgicos se ha ensayado en un ensayo de ELISA (Figura 1). A 5 µg/ml estas variantes redujeron la reactividad a IgE en un alcance del 50% (SEC ID N°: 6) y el 82% (SEC ID N°: 7) (Figura 2), en comparación con el alérgeno Par j 1 wt (SEC ID N°: 1).

45 Además, se ha ensayado la reactividad a IgE de variantes de SEC ID N°: 6-7 en cada suero de once sujetos alérgicos a *Parietaria* en un ensayo de ELISA. También en este caso, todas las variantes mostraron una alergenidad reducida en los sueros analizados (Tabla 1 y Figura 3). En promedio, esta fue una reducción de al menos el 50%.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una variante de alérgeno Par j 1 descrita en el presente documento o un péptido obtenido a partir de la misma.

50 Las variantes de sustitución y/o supresión de acuerdo con la invención se pueden preparar fácilmente mediante mutagénesis de la secuencia de ADNc de Par j 1 (SEC ID N°: 14) usando técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Las secuencias de ADNc que codifican las variantes de sustitución de SEC ID N°: 6-7 se presentan en SEC ID N°: 12-13.

5 La invención se refiere además a un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica cualquiera de las variantes hipoalérgicas definidas anteriormente. Un vector de este tipo puede ser un plásmido, virus, fago o cualquier otro vector que se usa comúnmente con fines de ingeniería genética y puede comprender, además de la molécula de ácido nucleico de la invención, elementos de control para la expresión en células eucariotas o procariontas, tales como promotores o potenciadores de la transcripción, secuencias señal u otras secuencias para la regulación de la transcripción.

10 La invención comprende además una célula huésped procarionta o eucariota que se transforma o transfecta con el vector de la invención. Las células procariontas tales como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis* o las células eucariotas tales como *Saccharomyces cerevisiae* se usan generalmente para la clonación de vector y expresión de ADNc.

Además, las variantes hipoalérgicas de acuerdo con la invención se pueden producir como proteínas de fusión.

15 Dada la reactividad reducida a IgE, las variantes de Par j 1 de acuerdo con la presente invención se pueden usar de forma conveniente para la preparación de composiciones farmacéuticas para la inmunoterapia de individuos alérgicos al polen de *Parietaria*.

20 En un aspecto adicional la invención se refiere por lo tanto a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una variante hipoalérgica de Par j 1, combinada opcionalmente con otros alérgenos de *Parietaria*, junto con vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización preferida, la composición farmacéutica es una vacuna para el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades alérgicas, tales como asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis alérgica y conjuntivitis alérgica. Los principios y procedimientos de vacunación se conocen por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en (6) y (7).

Descripción de las figuras

25 Figura 1: Análisis de reactividad a IgE de alérgeno rPar j 1 y sus variantes hipoalérgicas a través de un ensayo de ELISA.
 Figura 2: Reactividad a IgE de una combinación de sueros de rPar j 1 y sus variantes hipoalérgicas (5 µg/ml).
 Figura 3: Reactividad a IgE de sueros individuales de rPar j 1 y sus variantes hipoalérgicas.

Los siguientes ejemplos describen la invención con mayor detalle.

Ejemplos

30 A menos que se indique de otra manera, los procedimientos usados en los siguientes ejemplos se describen en Sambrook, Fritsch ET Maniatis "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", II ed. vol. 1-2-3, CSH Lab Press, 1989.

Ejemplo 1 – Mutagénesis específica de sitio del ADNc que codifica Par

Alérgeno i 1

35 La mutagénesis específica de sitio de ADNc que codifica el alérgeno Par j 1 (SEC ID N°: 14) se llevó a cabo mediante amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) del mismo ADNc que se había clonado en un vector procarionta (pBlue-script, nº de acceso de GenBank X52327). Los oligonucleótidos usados como cebadores en la reacción de PCR (Tabla 1) tenían las sustituciones de base apropiadas. Para cada mutagénesis, se usó un oligonucleótido complementario que se une a una región correspondiente de la cadena de la molécula de ADN (8). A
 40 continuación de la amplificación, el molde original no modificado se degradó de forma selectiva durante una digestión enzimática catalizada por la enzima de restricción *DpnI*. Células de *Escherichia coli* después se transformaron con las moléculas mutagenizadas. Los clones obtenidos a partir de colonias bacterianas únicas se secuenciaron mediante el procedimiento de Sanger para evaluar la modificación de base correcta y la ausencia de mutaciones inespecíficas en el ADNc.

45 Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos usados como cebadores en reacciones de mutagénesis específica de sitio. Las bases que tienen la mutación están en negritas. Las bases subrayadas corresponden al sitio de restricción *Bam*HI, que se usó para clonación.

Código de oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido
Pj1 23	cag ggg aaa gag gca gag ccg tca aag
Pj1 23.27	g cag ggg aaa gag gca gag ccg tca gcg ggg tgc tgc
Pj1 66	gac atc gac ggg gca ctc gtc agc gag g

(continuación)

Código de oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido
Pj1 73	agc gag gtc ccc gcg cac tgc ggc atc g
Pj1 41	c ggg gag acg gcg acg ggg ccg
Pj1 41.42.46	g gag acg gcg gcg ggg ccg cag gcg gtg cac gct tg
Pj1 92	aac atg gac tgc gcg aca ctt gga gtg g
Pj1 121	gac ccc gcc cac gca gca cgg ttg gag
Pj1 138	ccc gca ccg gaa gca gcc taa <u>gga tcc</u>

Ejemplo 2 – Producción de proteína de Par j 1 y sus variantes

Par j 1 wt (SEC ID N°: 14) y ADNc mutagenizados (SEC ID N°: 8-13), enlazados a una secuencia codificante que codifica seis histidinas, se expresaron en células de *Escherichia coli* de acuerdo con protocolos convencionales (9, 10) después de clonación en un vector de expresión. Las células se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en un tampón de NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8. Las proteínas recombinantes se aislaron a continuación de lisis de células bacterianas mediante sonicación y eliminación de sedimentos celulares a través de centrifugación. Las proteínas se purificaron a partir del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad usando columnas de agarosa unidas a ácido nitrilotriacético que quelan los iones de níquel que interactúan con la parte de seis histidinas fusionada al alérgeno.

Ejemplo 3 – Características de los sueros de sujetos alérgicos

Los sueros se recogieron a partir de individuos con una historia clínica de alergia estacional a polen de *Parietaria* y una reactividad específica RAST 3+ y 4+ a alérgenos de *Parietaria*. La combinación de sueros se obtuvo recogiendo sueros con un nivel elevado de IgE de clase RAST 4+ específicas para alérgenos de *Parietaria*.

Ejemplo 4 – Análisis de ELISA de la reactividad de variantes de Par j 1 a IgE a partir de una combinación de sueros

Partiendo de una concentración de 10 µg/ml, diluciones dobles en serie de alérgeno normal y sus variantes mutagenizadas en tampón carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6, se adsorbieron en pocillos de placas de poliestireno para ensayos de ELISA mediante incubación a 4 °C durante 16 horas. Cantidades equivalentes de albúmina sérica humana (HSA) se adsorbieron como controles negativos. Después los pocillos se lavaron con solución de lavado (tampón fosfato 60 mM, pH 6,5, que contiene Tween-20 al 0,05%) y se bloquearon con solución de dilución (suero de caballo al 25%, EDTA 1 mM, Tween 20 al 0,05%, Thiomersal al 0,01% en tampón fosfato 150 mM, pH 7,4). Alícuotas iguales (100 µl) de una dilución 1:5 de una combinación de sueros humanos con reactividad RAST 4+ se añadieron a cada muestra y se incubaron a 25 °C durante 2 horas. Después de tres lavados, se añadió el antisuero anti-IgE humana conjugado con peroxidasa (diluido 1:1500 en tampón de dilución), seguido por incubación a 25 °C durante 1,5 horas. Después de tres lavados, se obtuvo desarrollo de la reacción colorimétrica añadiendo 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) e incubando durante 15 minutos a 25 °C. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de HCl 1 N y se midió en un espectrofotómetro a 450 nm.

Ejemplo 5 – Análisis de ELISA de reactividad de IgE de variantes de Par j 1 en sueros individuales

Cantidades equivalentes (0,2 µg) de alérgeno normal, sus variantes mutagenizadas y albúmina sérica humana (HSA), usándose esta última como un control negativo, en tampón carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6, se adsorbieron en pocillos de placas de poliestireno para ensayos de ELISA mediante incubación a 4 °C durante 16 horas. Después los pocillos se lavaron con solución de lavado (tampón fosfato 60 mM, pH 6,5, que contiene Tween-20 al 0,05%) y se bloquearon con solución de dilución (suero de caballo al 25%, EDTA 1 mM, Tween 20 al 0,05%, Thiomersal al 0,01% en tampón fosfato 150 mM, pH 7,4). Alícuotas iguales (50 µl) de una dilución 1:5 de suero humano con reactividad RAST 3+ y 4+ se añadieron a cada muestra y se incubaron a 25 °C durante 2 horas. Después de tres lavados, se añadió el antisuero anti-IgE humana conjugado con peroxidasa (diluido 1:1500 en tampón de dilución), seguido por incubación a 25 °C durante 1,5 horas. Después de tres lavados, la reacción colorimétrica se desarrolló añadiendo 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) e incubando durante 15 minutos a 25 °C. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de HCl 1 N y se analizó en un espectrofotómetro a 450 nm.

Tabla 2. Reactividad de IgE de sueros individuales a rPar j 1 y sus variantes hipoalergénicas

variante Suero	SEC ID N°: 1	SEC ID N°: 2	SEC ID N°: 3	SEC ID N°: 4	SEC ID N°: 5	SEC ID N°: 6	SEC ID N°: 7	HSA
1	100,0	68,2	61,1	52,8	95,2	71,1	49,1	7,7
2	100,0	48,1	44,6	33,6	59,2	33,6	39,2	13,7
3	100,0	15,7	17,8	13,1	82,8	37,6	11,8	7,1
4	100,0	59,7	47,1	37,9	127,5	62,9	48,7	14,7
5	100,0	59,5	36,9	26,5	52,6	33,3	25,3	6,9
6	100,0	30,7	61,9	47,5	88,8	48,6	27,7	6,8
7	100,0	27,2	44,7	21,4	60,6	20,9	26,8	4,7
8	100,0	43,3	19,0	14,8	54,6	24,9	6,9	12,3
9	100,0	25,0	37,0	27,3	66,3	19,1	34,4	9,4
10	100,0	71,0	35,4	18,3	62,1	81,4	23,2	3,2
11	100,0	35,2	27,8	16,0	57,6	20,4	32,6	11,4
Reactividad de IgE media	100,0	45,0	41,8	31,1	74,8	41,9	32,4	12,3

Bibliografía

5 1. Toubi E., Kessel A., Blant A., Golan T. D., (1999) "Follow-up after systemic adverse reactions of immunotherapy". Allergy, 54(6): 617-620.

2. Akdis C. A., Blaser K., (2000) "Regulation of specific immune response by chemical and structural modifications of allergens". Int. Arch. Allergy Immunol., 121(4): 261-269.

10 3. Costa M. A., Colombo P., Izzo V., Kennedy D., Venturella S., Cocchiara R., Mistrello G., Falagiani P., Geraci D., (1994). "cADN cloning, expression and primary structure of Par j I, a major allergen of Parietaria judaica pollen". FEBS Lett., 341: 182-186.

4. Duro G., Colombo P., Costa M. A., Izzo V., Porcasi R., Di Fiore R., Locorotondo G., Mirisola M. G., Cocchiara R., Geraci D., (1996). "cADN cloning, sequence analysis and allergological characterization of Par j 2.0101, a new major allergen of the Parietaria judaica pollen". FEBS Lett., 399: 295-298.

15 5. Colombo P., Kennedy D., Ramsdale T., Costa M. A., Duro G., Izzo V., Salvadori S., Guerrini R., Cocchiara R., Mirisola M. G., Wood S., Geraci D., (1998). "Identification of an immunodominant IgE epitope of the Parietaria judaica major allergen". J. Immunol., 160: 2780-2785.

6. Paul, (1989), "Fundamental Immunology", Raven press, New York.

7. Cryz, S. J. (1991), "Immunotherapy and Vaccines", VCH Verlagsgesellschaft.

20 8. Wang W., Malcolm BA. (2002). " Two-stage polymerase chain reaction protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions, and insertions, using QuikChange site-directed mutagenesis". Methods Mol Biol.; 182: 37-43.

9. Younghee Kim. (2004). "Cloning and Expression of a Lipase Gene from Rice (Oryza sativa cv. Dongjin)". Mol. Cells, 18 (1): 40-45.

10. Asturias JA, Ibarrola I, Eseverri JL, Arilla MC, Gonzales-Rioja R, Martinez A. (2004). "PCR-based cloning and immunological characterization of Parietaria judaica pollen profilin". J Investig Allergol Clin Immunol, 14: 43-48.

Listado de secuencias

<110> LOFARMA

<120> proteínas hipoalergénicas obtenidas a partir del alérgeno principal de *Parietaria judaica*

<130> 7474Meur

5 <160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 139

<212> PRT

10 <213> Desconocido

<220>

<223> Par j 1 de tipo silvestre

<400> 1

ES 2 371 262 T3

Glu Glu Thr Cys Gly Thr Val Val Gly Ala Leu Met Pro Cys Leu Pro
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Gly Lys Glu Lys Glu Pro Ser Lys Gly Cys Cys Ser Gly
 20 25 30
 Ala Lys Arg Leu Asp Gly Glu Thr Lys Thr Gly Pro Gln Arg Val His
 35 40 45
 Ala Cys Glu Cys Ile Gln Thr Ala Met Lys Thr Tyr Ser Asp Ile Asp
 50 55 60
 Gly Lys Leu Val Ser Glu Val Pro Lys His Cys Gly Ile Val Asp Ser
 65 70 75 80
 Lys Leu Pro Pro Ile Asp Val Asn Met Asp Cys Lys Thr Leu Gly Val
 85 90 95

Val Pro Arg Gln Pro Gln Leu Pro Val Ser Leu Arg His Gly Pro Val
 100 105 110
 Thr Gly Pro Ser Asp Pro Ala His Lys Ala Arg Leu Glu Arg Pro Gln
 115 120 125
 Ile Arg Val Pro Pro Pro Ala Pro Glu Lys Ala
 130 135

<210> 2

<211> 139

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Par j 1 mutante

<400> 2

ES 2 371 262 T3

Glu Glu Thr Cys Gly Thr Val Val Gly Ala Leu Met Pro Cys Leu Pro
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Gly Lys Glu Ala Glu Pro Ser Lys Gly Cys Cys Ser Gly
 20 25 30
 Ala Lys Arg Leu Asp Gly Glu Thr Lys Thr Gly Pro Gln Arg Val His
 35 40 45
 Ala Cys Glu Cys Ile Gln Thr Ala Met Lys Thr Tyr Ser Asp Ile Asp
 50 55 60
 Gly Lys Leu Val Ser Glu Val Pro Lys His Cys Gly Ile Val Asp Ser
 65 70 75 80
 Lys Leu Pro Pro Ile Asp Val Asn Met Asp Cys Lys Thr Leu Gly Val
 85 90 95
 Val Pro Arg Gln Pro Gln Leu Pro Val Ser Leu Arg His Gly Pro Val
 100 105 110

 Thr Gly Pro Ser Asp Pro Ala His Lys Ala Arg Leu Glu Arg Pro Gln
 115 120 125
 Ile Arg Val Pro Pro Pro Ala Pro Glu Lys Ala
 130 135

<210> 3

<211> 139

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Par j 1 mutante

<400> 3

ES 2 371 262 T3

Glu Glu Thr Cys Gly Thr Val Val Gly Ala Leu Met Pro Cys Leu Pro
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Gly Lys Glu Ala Glu Pro Ser Ala Gly Cys Cys Ser Gly
 20 25 30
 Ala Lys Arg Leu Asp Gly Glu Thr Lys Thr Gly Pro Gln Arg Val His
 35 40 45
 Ala Cys Glu Cys Ile Gln Thr Ala Met Lys Thr Tyr Ser Asp Ile Asp
 50 55 60
 Gly Lys Leu Val Ser Glu Val Pro Lys His Cys Gly Ile Val Asp Ser
 65 70 75 80
 Lys Leu Pro Pro Ile Asp Val Asn Met Asp Cys Lys Thr Leu Gly Val
 85 90 95
 Val Pro Arg Gln Pro Gln Leu Pro Val Ser Leu Arg His Gly Pro Val
 100 105 110
 Thr Gly Pro Ser Asp Pro Ala His Lys Ala Arg Leu Glu Arg Pro Gln
 115 120 125

 Ile Arg Val Pro Pro Pro Ala Pro Glu Lys Ala
 130 135

<210> 4

<211> 139

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Par j 1 mutante

<400> 4

ES 2 371 262 T3

Glu Glu Thr Cys Gly Thr Val Val Gly Ala Leu Met Pro Cys Leu Pro
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Gly Lys Glu Ala Glu Pro Ser Ala Gly Cys Cys Ser Gly
 20 25 30
 Ala Lys Arg Leu Asp Gly Glu Thr Lys Thr Gly Pro Gln Arg Val His
 35 40 45
 Ala Cys Glu Cys Ile Gln Thr Ala Met Lys Thr Tyr Ser Asp Ile Asp
 50 55 60
 Gly Lys Leu Val Ser Glu Val Pro Ala His Cys Gly Ile Val Asp Ser
 65 70 75 80
 Lys Leu Pro Pro Ile Asp Val Asn Met Asp Cys Lys Thr Leu Gly Val
 85 90 95
 Val Pro Arg Gln Pro Gln Leu Pro Val Ser Leu Arg His Gly Pro Val
 100 105 110
 Thr Gly Pro Ser Asp Pro Ala His Lys Ala Arg Leu Glu Arg Pro Gln
 115 120 125
 Ile Arg Val Pro Pro Pro Ala Pro Glu Lys Ala
 130 135

<210> 5

<211> 139

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Par j 1 mutante

<400> 5

ES 2 371 262 T3

Glu Glu Thr Cys Gly Thr Val Val Gly Ala Leu Met Pro Cys Leu Pro
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Gly Lys Glu Lys Glu Pro Ser Lys Gly Cys Cys Ser Gly
 20 25 30
 Ala Lys Arg Leu Asp Gly Glu Thr Ala Ala Gly Pro Gln Ala Val His
 35 40 45
 Ala Cys Glu Cys Ile Gln Thr Ala Met Lys Thr Tyr Ser Asp Ile Asp
 50 55 60
 Gly Lys Leu Val Ser Glu Val Pro Lys His Cys Gly Ile Val Asp Ser
 65 70 75 80
 Lys Leu Pro Pro Ile Asp Val Asn Met Asp Cys Lys Thr Leu Gly Val
 85 90 95
 Val Pro Arg Gln Pro Gln Leu Pro Val Ser Leu Arg His Gly Pro Val
 100 105 110
 Thr Gly Pro Ser Asp Pro Ala His Lys Ala Arg Leu Glu Arg Pro Gln
 115 120 125
 Ile Arg Val Pro Pro Pro Ala Pro Glu Lys Ala
 130 135

<210> 6

<211> 139

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Par j 1 mutante

<400> 6

ES 2 371 262 T3

Glu Glu Thr Cys Gly Thr Val Val Gly Ala Leu Met Pro Cys Leu Pro
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Gly Lys Glu Lys Glu Pro Ser Lys Gly Cys Cys Ser Gly
 20 25 30
 Ala Lys Arg Leu Asp Gly Glu Thr Lys Thr Gly Pro Gln Arg Val His
 35 40 45
 Ala Cys Glu Cys Ile Gln Thr Ala Met Lys Thr Tyr Ser Asp Ile Asp
 50 55 60
 Gly Lys Leu Val Ser Glu Val Pro Lys His Cys Gly Ile Val Asp Ser
 65 70 75 80
 Lys Leu Pro Pro Ile Asp Val Asn Met Asp Cys Ala Thr Leu Gly Val
 85 90 95
 Val Pro Arg Gln Pro Gln Leu Pro Val Ser Leu Arg His Gly Pro Val
 100 105 110
 Thr Gly Pro Ser Asp Pro Ala His Ala Ala Arg Leu Glu Arg Pro Gln
 115 120 125
 Ile Arg Val Pro Pro Pro Ala Pro Glu Ala Ala
 130 135

<210> 7

<211> 139

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Par j 1 mutante

<400> 7

ES 2 371 262 T3

Glu Glu Thr Cys Gly Thr Val Val Gly Ala Leu Met Pro Cys Leu Pro
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Gly Lys Glu Ala Glu Pro Ser Ala Gly Cys Cys Ser Gly
 20 25 30
 Ala Lys Arg Leu Asp Gly Glu Thr Ala Thr Gly Pro Gln Arg Val His
 35 40 45
 Ala Cys Glu Cys Ile Gln Thr Ala Met Lys Thr Tyr Ser Asp Ile Asp
 50 55 60
 Gly Ala Leu Val Ser Glu Val Pro Lys His Cys Gly Ile Val Asp Ser
 65 70 75 80
 Lys Leu Pro Pro Ile Asp Val Asn Met Asp Cys Lys Thr Leu Gly Val
 85 90 95
 Val Pro Arg Gln Pro Gln Leu Pro Val Ser Leu Arg His Gly Pro Val
 100 105 110
 Thr Gly Pro Ser Asp Pro Ala His Lys Ala Arg Leu Glu Arg Pro Gln
 115 120 125
 Ile Arg Val Pro Pro Pro Ala Pro Glu Lys Ala
 130 135

<210> 8

<211> 420

<212> ADN

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Par j 1 mutante (secuencia codificante)

<400> 8

ES 2 371 262 T3

gaagaaacct gcgggactgt agtgggagcg ctgatgccgt gcctgccgtt cgtgcagggg 60
aaagaggcag agccgtcaaa ggggtgctgc agcggcgcca aaagattgga cggggagacg 120
aagacggggc cgcagagggt gcacgcttgt gagtgcattc agaccgcat gaagacctat 180
tccgacatcg acgggaaact cgtcagcgag gtccccaagc actgcggcat cgttgacagc 240
aagctccgc ccattgacgt caacatggac tgcaagacac ttggagtggg acctcggcaa 300
ccccaacttc cagtctctct ccgtcatggt cccgtcacgg gcccaagtga ccccgccac 360
aaagcacggt tggagagacc ccagattaga gttccgcccc ccgcaccgga aaaagcctaa 420

<210> 9

<211> 420

<212> AND

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Par j 1 mutante (secuencia codificante)

<400> 9

gaagaaacct gcgggactgt agtgggagcg ctgatgccgt gcctgccgtt cgtgcagggg 60
aaagaggcag agccgtcagc ggggtgctgc agcggcgcca aaagattgga cggggagacg 120
aagacggggc cgcagagggt gcacgcttgt gagtgcattc agaccgcat gaagacctat 180
tccgacatcg acgggaaact cgtcagcgag gtccccaagc actgcggcat cgttgacagc 240
aagctccgc ccattgacgt caacatggac tgcaagacac ttggagtggg acctcggcaa 300
ccccaacttc cagtctctct ccgtcatggt cccgtcacgg gcccaagtga ccccgccac 360
aaagcacggt tggagagacc ccagattaga gttccgcccc ccgcaccgga aaaagcctaa 420

10 <210> 10

<211> 420

<212> AND

<213> Desconocido

<220>

15 <223> Par j 1 mutante (secuencia codificante)

<400> 10

ES 2 371 262 T3

gaagaaacct gcgggactgt agtgggagcg ctgatgccgt gcctgccgtt cgtgcagggg 60
 aaagaggcag agccgtcagc ggggtgctgc agcggcgcca aaagattgga cggggagacg 120
 aagacggggc cgcagagggg gcacgcttgt gagtgcattc agaccgccat gaagacctat 180
 tccgacatcg acgggaaact cgtcagcgag gtccccgcgc actgcggcat cgttgacagc 240
 aagctcccgc ccattgacgt caacatggac tgcaagacac ttggagtggg acctcggcaa 300
 cccaacttc cagtctctct ccgtcatggg cccgtcacgg gcccaagtga ccccgccac 360
 aaagcacggt tggagagacc ccagattaga gttccgcccc ccgcaccgga aaaagcctaa 420

<210> 11

<211> 420

<212> AND

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Par j 1 mutante (secuencia codificante)

<400> 11

gaagaaacct gcgggactgt agtgggagcg ctgatgccgt gcctgccgtt cgtgcagggg 60
 aaagagaaag agccgtcaaa ggggtgctgc agcggcgcca aaagattgga cggggagacg 120
 gcggcggggc cgcagggcgt gcacgcttgt gagtgcattc agaccgccat gaagacctat 180
 tccgacatcg acgggaaact cgtcagcgag gtccccaaagc actgcggcat cgttgacagc 240
 aagctcccgc ccattgacgt caacatggac tgcaagacac ttggagtggg acctcggcaa 300
 cccaacttc cagtctctct ccgtcatggg cccgtcacgg gcccaagtga ccccgccac 360
 aaagcacggt tggagagacc ccagattaga gttccgcccc ccgcaccgga aaaagcctaa 420

10 <210> 12

<211> 420

<212> AND

<213> Desconocido

<220>

15 <223> Par j 1 mutante (secuencia codificante)

<400> 12

ES 2 371 262 T3

gaagaaacct gcgggactgt agtgggagcg ctgatgccgt gcctgccgtt cgtgcagggg 60
 aaagagaaag agccgtcaaa ggggtgctgc agcggcgcca aaagattgga cggggagacg 120
 aagacggggc cgcagagggt gcacgcttgt gagtgcattc agaccgcat gaagacctat 180
 tccgacatcg acgggaaact cgtcagcgag gtccccaagc actgcggcat cgttgacagc 240
 aagctcccgc ccattgacgt caacatggac tgcgcgacac ttggagtggg acctcggcaa 300
 ccccaacttc cagtctctct ccgtcatggt cccgtcacgg gcccaagtga ccccgcccac 360
 gcagcacggt tggagagacc ccagattaga gttccgcccc ccgcaccgga agcagcctaa 420

<210> 13

<211> 420

<212> AND

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Par j 1 mutante (secuencia codificante)

<400> 13

gaagaaacct gcgggactgt agtgggagcg ctgatgccgt gcctgccgtt cgtgcagggg 60
 aaagaggcag agccgtcagc ggggtgctgc agcggcgcca aaagattgga cggggagacg 120
 gcgacggggc cgcagagggt gcacgcttgt gagtgcattc agaccgcat gaagacctat 180
 tccgacatcg acggggcact cgtcagcgag gtccccaagc actgcggcat cgttgacagc 240
 aagctcccgc ccattgacgt caacatggac tgcaagacac ttggagtggg acctcggcaa 300
 ccccaacttc cagtctctct ccgtcatggt cccgtcacgg gcccaagtga ccccgcccac 360
 aaagcacggt tggagagacc ccagattaga gttccgcccc ccgcaccgga aaaagcctaa 420

10 <210> 14

<211> 420

<212> AND

<213> Desconocido

<220>

15 <223> Par j 1 de tipo silvestre (secuencia codificante)

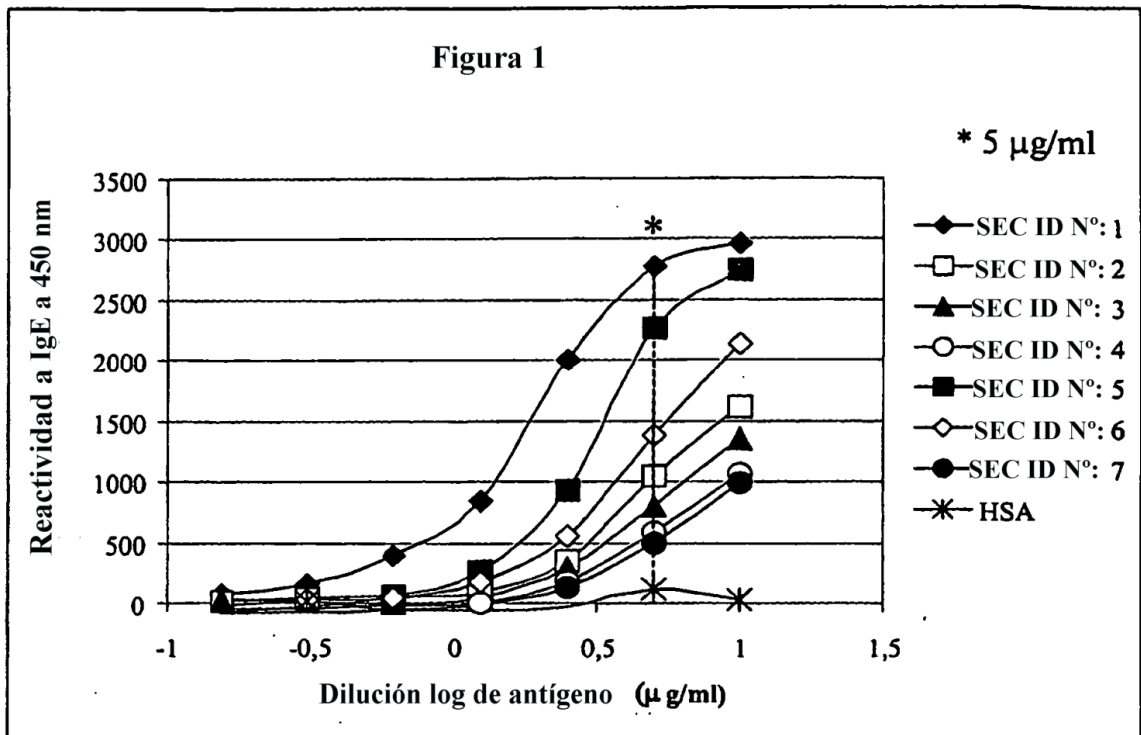
<400> 14

ES 2 371 262 T3

gaagaaacct gcgggactgt agtgggagcg ctgatgccgt gcctgccgtt cgtgcagggg 60
aaagagaaag agccgtcaaa ggggtgctgc agcggcgcca aaagattgga cggggagacg 120
aagacggggc cgcagagggg gcacgcttgt gagtgcaccc agaccgcat gaagacctat 180
tccgacatcg acgggaaact cgtcagcgag gtccccaagc actgcggcat cgttgacagc 240
aagctcccgc ccattgacgt caacatggac tgcaagacac ttggagtggg acctcggcaa 300
ccccaacttc cagtctctct ccgtcatggg cccgtcacgg gcccaagtga ccccgcccac 360
aaagcacggt tggagagacc ccagattaga gttccgcccc ccgcaccgga aaaagcctaa 420

REIVINDICACIONES

1. Una proteína hipoalergénica obtenible mediante mutagénesis del alérgeno principal de *Parietaria judaica* Par j 1 (SEC ID N°: 1), en la que dicha proteína se selecciona entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 6 y SEC ID N°: 7.
2. Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de acuerdo con la reivindicación 1.
- 5 3. Una molécula de ácido de acuerdo con la reivindicación 2, que se selecciona entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 12-13.
4. Un vector que contiene la molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 2 ó 3.
5. Una célula huésped que contiene el vector de la reivindicación 4.
- 10 6. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una proteína hipoalergénica de *Parietaria* de acuerdo con la reivindicación 1.
7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 6, en forma de una vacuna.
8. Uso de una proteína hipoalergénica de *Parietaria* de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades alérgicas causadas por polen de plantas de las especies *Parietaria*.
- 15 9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 para el tratamiento de asma bronquial, rinitis, dermatitis o conjuntivitis alérgica.



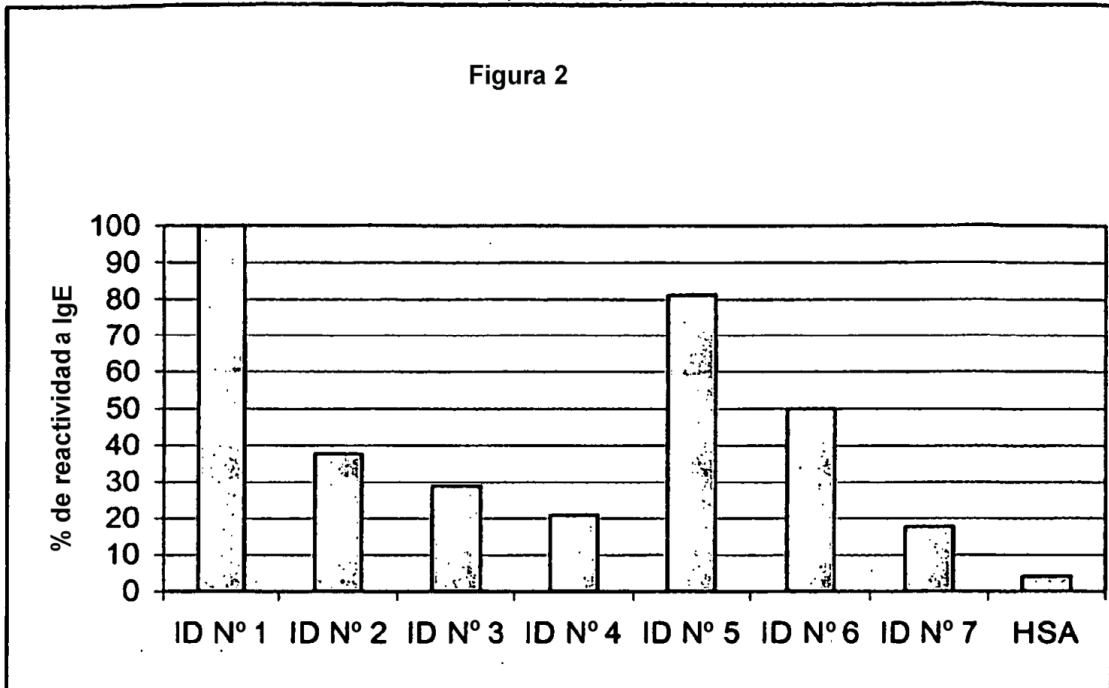


Figura 3 (continúa en la página 4/4)

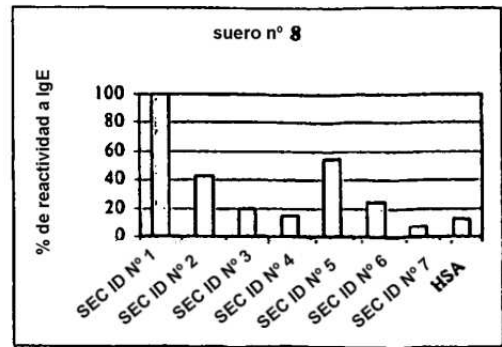
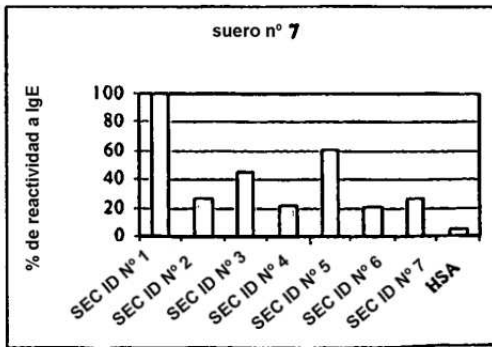
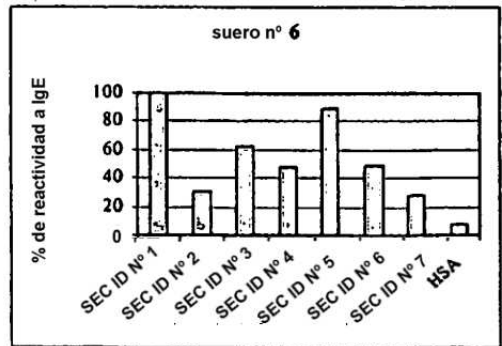
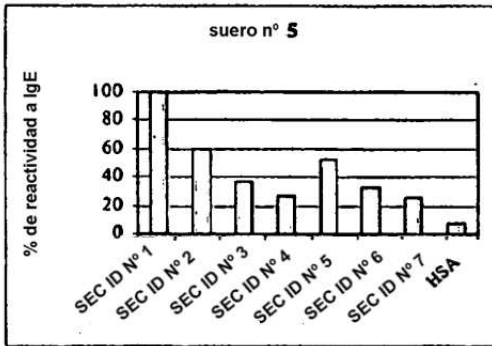
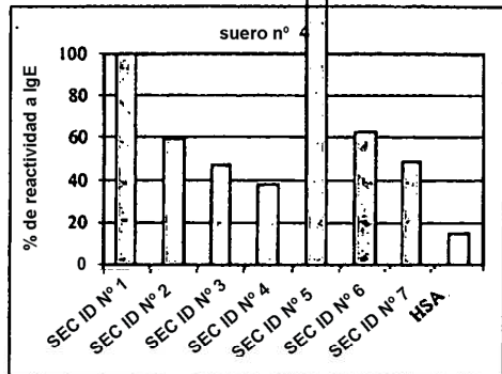
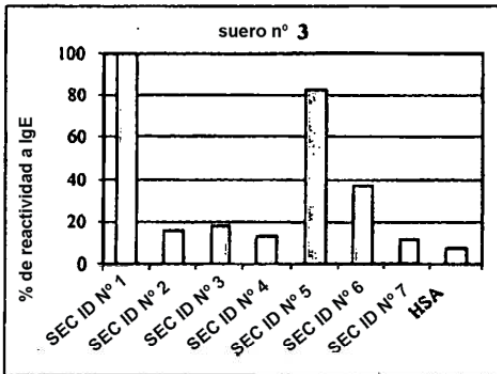
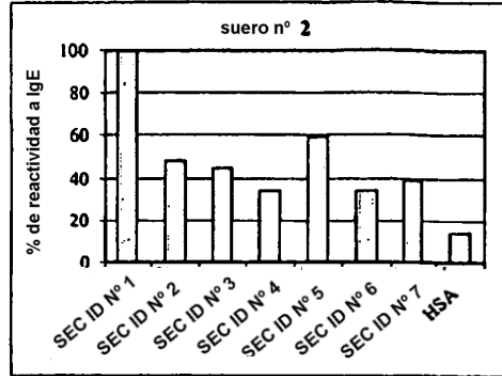
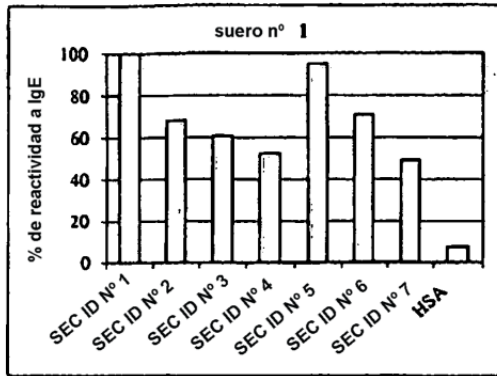


Figura 3 (continúa de la página 3/4)

