

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 384 231**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 39/36 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (96) Número de solicitud europea: **10171705 .6**
(96) Fecha de presentación: **03.08.2010**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2281836**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2011**

(54) Título: **Proteínas híbridas de principales alérgenos de Parietaria judaica y usos de las mismas**

(30) Prioridad:

04.08.2009 IT MI20091411

(73) Titular/es:

**LOFARMA S.p.A.
Viale Cassala, 40
20143 Milano, IT**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.07.2012

(72) Inventor/es:

**Mistrello, Giovanni;
Zanotta, Stefania;
Roncarolo, Daniela y
Falagiani, Paolo**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.07.2012

(74) Agente/Representante:

Lazcano Gainza, Jesús

ES 2 384 231 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 híbridas de principales alérgenos de *Parietaria judaica* y usos de las mismas

- 5 La presente invención proporciona proteínas hipoalergénicas diméricas de *Parietaria judaica*, moléculas de ácido nucleico que codifican para estas, composiciones farmacéuticas que contienen las mismas, y su uso en la inmunoterapia de enfermedades alérgicas provocadas por polen de plantas de la especie *Parietaria judaica*.

Antecedentes de la invención

- 10 Las alergias están provocadas por una anomalía en el sistema inmunitario que reacciona produciendo anticuerpos IgE frente a proteínas que, en sí mismas, son completamente inocuas y están principalmente contenidas en polen, ácaros, epitelios y algunos alimentos.

- 15 Estimaciones recientes muestran que más del 25% de las personas en naciones industrializadas están afectadas por esta enfermedad, que, persistiendo en el tiempo, puede inducir el empeoramiento de síntomas (por ejemplo, aparición de asma), y sensibilización a otros alérgenos, haciendo por tanto que la elección de la terapia más apropiada sea más complicada (1).

- 20 La inmunoterapia específica hiposensibilizante (SIT), a diferencia de la terapia farmacológica, es la única forma de tratamiento etiológico de enfermedades alérgicas que puede afectar positivamente a algunos parámetros inmunológicos que son la base de la enfermedad.

- 25 SIT consiste en la administración de dosis crecientes de extractos normalizados (vacunas) obtenidos de la misma sustancia que provoca la enfermedad (2).

De este modo, se induce gradualmente una especie de "tolerancia inmunológica" frente a tal sustancia en los pacientes. Esta tolerancia inmunológica está asociada con una reducción o incluso desaparición de síntomas alérgicos.

- 30 El riesgo para provocar efectos secundarios que son incluso de naturaleza grave (3), también si se reduce considerablemente mediante el uso de vacunas de liberación lenta o vacunas que se administran por vías alternativas a inyecciones, ha limitado la aplicabilidad de SIT en la terapia de enfermedades alérgicas. Además, puesto que SIT se lleva a cabo administrando una mezcla de proteínas alergénicas y no alergénicas de origen natural sin tener en cuenta el perfil de sensibilización del paciente, pueden surgir nuevas reactividades de IgE frente a alérgenos inicialmente nocivos que están presentes en el extracto.

- 40 Un elemento relacionado con el beneficio provocado por SIT es la inducción de anticuerpos IgG específicos para el alérgeno sensibilizante. Estos anticuerpos (protectores) pueden inhibir la unión de IgE al antígeno, influyendo por tanto en la estructura tridimensional de esta molécula (4, 5). El desarrollo de vacunas constituidas por proteínas recombinantes que tienen menos alergenicidad pero una capacidad inmunogénica inalterada puede dar como resultado una mejora adicional en el campo de terapia de enfermedades alérgicas.

- 45 Durante los últimos 15 años, se han hecho avances considerables en el campo de la caracterización de alérgenos gracias a la aplicación de tecnologías basadas en ADN recombinante. Los ADNc que codifican para principales alérgenos están disponibles para estudios de alergenicidad y el desarrollo de pruebas de diagnóstico, y permiten SIT innovadoras basadas en el uso de proteínas recombinantes purificadas y sus variantes genéticamente modificadas que se caracterizan por actividad alergénica reducida (6).

- 50 El polen de *Parietaria* es una de las causas más importantes de alergia en la zona mediterránea. En particular, al menos el 50% de todos los sujetos alérgicos en el sur de Italia muestran una respuesta positiva a la prueba cutánea de punción (SPT) para el polen de *Parietaria* (7).

- 55 Los dos principales alérgenos de polen de *Parietaria judaica*, es decir Par j 1 (cuya secuencia de nucleótidos se identifica por el n.º de registro de GenBank X95867), y Par j 2 (AC X95865), son proteínas con pesos moleculares de 14,4 y 11,3 kD, respectivamente, y comparten homología funcional y de secuencia (8, 9). El porcentaje de identidad de secuencia es de alrededor del 45%, y es más prominente en la región N terminal de las proteínas, en la que se ubica el epítopo de IgE más importante. Este epítopo es responsable de mucha de la reactividad cruzada entre las dos moléculas (10, 11). Estos dos alérgenos independientes presentan características comunes, y pertenecen a una familia de proteínas de origen vegetal que se denominan ns-LTP (proteínas de transferencia de lípidos no específicas) y se caracterizan por una estructura tridimensional altamente conservada (12). Estas proteínas tienen la función de transportar moléculas lipídicas a través de la membrana.

- 65 Se han realizado numerosos estudios para identificar o alterar epítopos de IgE de principales alérgenos de *Parietaria*.

Cambiando algunas cisteínas que son relevantes para mantener la estructura tridimensional en ambos alérgenos, se han obtenido mutantes tridimensionales con unión a IgE reducida y alergenicidad disminuida frente a seres humanos mediante mutagénesis específica del sitio (13).

- 5 El uso de péptidos sintéticos solapantes correspondientes a las secuencias enteras de Par j 1 y Par j 2 permitió la detección de epítopos lineales que pueden unirse a IgE de pacientes alérgicos a *Parietaria*. El posicionamiento de estas secuencias en el modelo tridimensional de los dos alérgenos permitió la localización de tres regiones con reactividad a IgE fuerte y un alto grado de homología en ambas moléculas (11).
- 10 El documento WO02/22674 (14) da a conocer una variante hipoalergénica del principal alérgeno Par j 2 (correspondiente a SEQ ID NO: 10 mostrada a continuación), en la que el cambio en 8 lisinas distribuidas por toda la proteína provoca una fuerte disminución en la capacidad de unión a IgE específicas.
- 15 El documento EP1712560 (15) identifica los aminoácidos implicados en reacciones de unión entre IgE específicas y Par j 1. Las diferentes combinaciones de residuos mutagenizados dan lugar a moléculas con diferentes grados de alergenicidad, y muestran la presencia de múltiples epítopos que se reconocen de manera variable por pacientes alérgicos a *Parietaria judaica*.
- 20 La posibilidad de usar moléculas multiméricas modificadas por ingeniería constituidas por diferentes alérgenos del mismo organismo para terapia específica de hiposensibilización se ha considerado fascinante desde hace mucho tiempo.
- 25 La alergia al polen de *Parietaria* es un modelo de estudio óptimo ya que esta alergia se provoca principalmente por los dos componentes alergénicos, Par j 1 y Par j 2, una mezcla de los cuales puede inhibir la unión entre IgE específicas y polen de *Parietaria judaica* hasta el 95% (16), demostrando así que otros alérgenos en el extracto son clínicamente menos importantes. Se sabe que Par j 1 y Par j 2 comparten numerosos epítopos de IgE, y que puede usarse Par j 2 como un marcador para el diagnóstico de alergia a *Parietaria*.
- 30 La asociación de Par j 1 y Par j 2 en una molécula híbrida individual representaría el repertorio completo de epítopos T, y podría inducir una fuerte respuesta de IgG protectora.
- 35 El documento WO2004/104047 (17) propone un multímero que comprende al menos una primera secuencia de aminoácidos que corresponde a uno de los principales alérgenos Par j 1 o Par j 2 de *Parietaria*, una segunda secuencia que codifica para Par j 1 o Par j 2, y preferiblemente una tercera secuencia de uno de los dos principales alérgenos de *Parietaria*. El objeto de la invención también son moléculas multiméricas en las que los principales alérgenos se mutan en la región entre los aminoácidos de 1 a 30, preferiblemente en las posiciones Lys 23, Glu 24, y Lys 27. En la sección de resultados, se analiza la capacidad de inducir la liberación de histamina a partir del dímero Parj2-Parj 1 mutagenizado o de tipo natural en comparación con una mezcla equimolar de los alérgenos Par j 1 y Par j 2 recombinantes individuales. Se notifica (figura 6, página 12) que el dímero de tipo natural (clon PjED) induce menos liberación de histamina en dos de los tres pacientes sometidos a prueba (paneles G y H), mientras que el dímero mutagenizado (clon PjEDmut) es igual al dímero de tipo natural en dos de los tres pacientes, y es menos eficaz en uno de los tres (panel F), mostrando así que las mutaciones insertadas en el clon PjEDmut en las posiciones Lys 23, Glu 24 y Lys 27 no son cruciales para la unión específica a IgE de todos los pacientes alérgicos.
- 40 45 En un artículo con fecha de 2007 (18), Bonura *et al.* sometieron a prueba el híbrido Par j 2-Par j 1 comparándolo con su derivado, rPjEDcys, que se había mutagenizado en ambos alérgenos en cisteínas que son importantes para mantener la estructura tridimensional. El híbrido rPjEDcys mutado tiene una reactividad a IgE reducida, tal como se demostró en experimentos de SPT e inhibición de ELISA, y mediante inducción de liberación de histamina a partir de basófilos. Además, la variante mutagenizada mantiene sus epítopos T sin cambiar debido a que, cuando se inyecta en ratones, puede inducir una producción de IgG que puede reconocer los alérgenos Par j 1 y Par j 2 individuales.
- 50 55 60 En el mismo año, Gonzalez-Rioja *et al.* (16) sometieron a prueba tres moléculas híbridas diferentes constituidas por los dos principales alérgenos de *Parietaria*, Par j 1 y Par j 2, en forma de tipo natural (Q1), o en forma de mutantes en los que sólo el fragmento 29-52 que contiene las 4 cisteínas implicadas en los cuatro enlaces de disulfuro (Q2), y este fragmento más una delección adicional de 8 residuos (aminoácidos 72-79 de Par j 1, y 73-80 de Par j 2, Q3) correspondiente a dos supuestos epítopos de IgE lineales, se delecionaron en ambas proteínas. Los datos muestran que el híbrido Q1 tiene reactividad a IgE inferior en comparación con la mezcla de los dos alérgenos individuales, y se observa una disminución adicional con Q2 y Q3. La capacidad de estimular linfocitos T permanece inalterada para los híbridos Q1 y Q2 en comparación con la mezcla de las proteínas individuales, mientras que disminuye significativamente en el caso de Q3, indicando que la delección de estas secuencias elimina epítopos T importantes para una respuesta de anticuerpos protectora, véase también el documento WO2007/116316.
- 65 En los dos artículos citados anteriormente, la disminución de alergenicidad de moléculas está relacionada con la mutación de algunas cisteínas que se sabe que son cruciales para mantener su estructura tridimensional, y por tanto epítopos B conformacionales.

Los resultados obtenidos con los principales alérgenos mutagenizados en los aminoácidos que no están implicados directamente en la estabilización de la estructura 3D (17) demostraron ser escasamente aleladores debido a que el mutante oligomérico no mostró disminución significativa de alergenicidad, no sólo con respecto a la mezcla de los componentes de tipo natural alergénicos individuales sino también en comparación con la molécula dimérica de tipo natural. Estas moléculas no parecen ser candidatas eficaces para su uso como un componente hipoalergénico único en la terapia de alergia a polen de *Parietaria judaica*.

Descripción de la invención

10 Se ha encontrado ahora que la unión de los alérgenos Par j 1 y Par j 2 a IgE puede reducirse usándolos en forma de una proteína híbrida constituida por secuencia del alérgeno Par j 1 unida a secuencia de Par j 2, en la que ambas secuencias se mutan mediante la sustitución de residuos de aminoácidos.

15 Según una primera realización, la invención proporciona una proteína híbrida que consiste en secuencias mutadas de Par j 1 y Par j 2 unidas entre sí en cualquier orden o bien directamente o bien mediante interposición de un ligador, en la que:

20 a) en la secuencia de Par j 1 (que es o bien SEQ ID NO: 1 o bien una secuencia de una proteína natural que es idéntica a SEQ ID NO: 1 en al menos el 95%, preferiblemente al menos el 98%) se reemplazan los residuos de Lys en las posiciones 23, 27, 41 y 66 de SEQ ID NO:1, o en las posiciones correspondientes de dicha secuencia natural, por aminoácidos neutros, polares o ácidos;

25 b) en la secuencia de Par j 2 (que es o bien SEQ ID NO:2 o bien una secuencia de una proteína natural que es idéntica a SEQ ID NO:2 en al menos el 95%, preferiblemente al menos el 98%) se reemplazan los residuos de Lys en las posiciones 19, 23, 27, 35, 41, 46, 73 y 78 de SEQ ID NO:2, o en las posiciones correspondientes de dicha secuencia natural, por aminoácidos neutros, polares o ácidos;

c) dichas secuencias de Par j 1 y Par j 2 tienen una orientación cabeza a cola;

30 d) si está presente, dicho ligador consiste en una cadena de aminoácidos que contiene de 1 a 8 aminoácidos.

Las posiciones especificadas anteriormente de residuos mutados se refieren a moléculas de Par j 1 y Par j 2 tal como se identifican por SEQ ID NO:1 y 2, respectivamente. Sin embargo, la proteína híbrida según la invención puede contener secuencias de moléculas que se producen de manera natural de la misma clase que Par j 1 y Par j 2, tales como Par j 1.0102 (Uniprot O04404), Par j 1.0201 (Uniprot Q40905), Par j 1.0101 (Uniprot P43217), Par j 2.0101 (Uniprot P55958), y Par j 2.0101 (Uniprot P55958), que se mutan en los residuos de Lys correspondientes a los residuos de Lys en las posiciones identificadas anteriormente de SEQ ID NO:1 ó 2, en alineaciones de secuencias entre dichas moléculas naturales y SEQ ID NO:1 ó 2.

40 Las proteínas Par j 1 y Par j 2 pueden disponerse en cualquier orden dentro de la molécula híbrida, y con una "orientación cabeza a cola", lo que significa que cuando el extremo amino-terminal de la proteína híbrida coincide con el extremo amino-terminal de Par j 1 o Par j 2, el extremo carboxilo-terminal de la proteína híbrida coincide con el extremo carboxilo-terminal de Par j 2 y Par j 1, respectivamente. Según una realización preferida, el extremo amino-terminal de la proteína híbrida está ocupado por Par j 1 y el extremo carboxilo-terminal por Par j 2.

45 El ligador que separa las secuencias mutadas de Par j 1 y Par j 2 consiste preferiblemente en una cadena de 8 aminoácidos, más preferiblemente una cadena de dos aminoácidos, incluso más preferiblemente el dipéptido GlySer.

50 Los residuos de Lys identificados anteriormente se reemplazan preferiblemente por aminoácidos seleccionados de Ala, Gly, Pro, Leu, Ile, Phe, Thr, Ser, Gln, Asn, Glu y Asp, más preferiblemente de Ala, Gly, Thr, Ser, Gln, Asn, Glu y Asp.

55 En una realización particularmente preferida de la invención, la proteína híbrida tiene la secuencia identificada en la SEQ ID NO: 3.

Se ha analizado la reactividad de esta proteína híbrida frente a IgE en doce sueros de sujetos alérgicos a polen de *Parietaria* mediante ensayo ELISA (figura 2). Cuando se incubó con los sueros, la proteína híbrida presentó una disminución media en la reactividad frente a IgE del 41% en comparación con el híbrido de tipo natural (SEQ ID NO: 4), con valores comprendidos entre el 10 y el 100%.

65 Se han confirmado estos resultados mediante experimentos de inhibición de ELISA, permitiendo la evaluación de la reactividad de epítopos homólogos en diferentes proteínas. A concentraciones de inhibidor equimolares (0,150 nM), la unión entre el extracto de *Parietaria judaica* adsorbido en pocillos e IgE específicas contenidas en los sueros de 14 pacientes se inhibió, en promedio, en un 69,8% cuando se trató previamente el suero con la mezcla de alérgenos de tipo natural individuales, en un 16,5% cuando se incubó previamente con la mezcla de los dos componentes

mutagenizados, en un 62,4% cuando se trató previamente con SEQ ID NO: 4, y en un 7,6% cuando se incubó previamente con la SEQ ID NO: 3 (figura 3).

Por tanto, la capacidad del híbrido mutante según la invención de inhibir la unión del extracto de *Parietaria* a IgE específicas es significativamente inferior tanto al híbrido de la SEQ ID NO: 4 de tipo natural ($p<0,001$) como a la mezcla de los dos alérgenos mutagenizados ($p<0,05$).

Además, las proteínas hibridas de tipo natural (SEQ ID NO: 4) e hipoalergénicas (SEQ ID NO:3), cuando se usan para inmunizar ratones Balb/c, demostraron poder inducir una respuesta de IgG específica frente a extracto de *Parietaria judaica* (figura 4). Las moléculas hibridas SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 indujeron una respuesta de IgG más temprana frente al extracto de *Parietaria* en comparación con el extracto completo. Tras cuatro semanas desde la primera inmunización, correspondiente a una semana tras la segunda inmunización, la respuesta de IgG era 2,5 veces superior con la SEQ ID NO: 4, y 1,7 veces superior con la SEQ ID NO: 3 que la obtenida mediante inmunización con extracto de *Parietaria*. Además, la respuesta de anticuerpos IgG obtenida con la SEQ ID NO: 3 era mucho más fuerte que la obtenida mediante inmunización con cantidades equimolares de las dos variantes mutagenizadas individuales (mezcla mutante). Por el contrario, los anticuerpos en el suero de animales inmunizados con un antígeno no relacionado no pudieron reconocer el extracto de *Parietaria*.

En lo que respecta a la inducción de anticuerpos protectores que pueden bloquear la unión del alérgeno a las IgE, se observó que los anticuerpos IgG producidos frente a la SEQ ID NO: 3 inhibieron la unión de IgE de pacientes alérgicos a *Parietaria* a extracto total de Par j (figura 5). Experimentos de inhibición de ELISA mostraron que IgG de ratones inmunizados con SEQ ID NO: 3 inhibieron la reactividad a IgE de once sueros en un 33,4% en promedio (con valores de desde el 19,7 hasta el 50,7%), y que los anticuerpos producidos frente a extracto total de *Parietaria* inhibieron esta unión en un 37,8% (27,5-47,3%), mientras que IgG obtenidas mediante inmunización con la mezcla de los dos alérgenos Par j 1 y Par j 2 mutagenizados (mezcla mutante) inhibieron la unión IgE-extracto, en promedio, en un 28,6%, con valores de desde el 13% hasta el 50%.

La proteína hibrida según la invención puede prepararse fácilmente mediante mutagénesis de Par j 1 (SEQ ID NO: 5), Par j 2 (SEQ ID NO:6), isoforma o variantes naturales de la misma, o de la secuencia de ADNc hibrida de tipo natural (SEQ ID NO: 7), mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica (véase por ejemplo 13,18,19).

Por tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína hibrida tal como se define en el presente documento.

En una realización preferida, tal molécula de ácido nucleico codifica para la proteína de SEQ ID NO:3 y consiste en la secuencia SEQ ID NO:8.

Aún en un aspecto adicional, la invención proporciona un vector de expresión que contiene una molécula de ácido nucleico tal como se define en el presente documento junto con elementos para el control de expresión en células eucariotas o procariotas, tales como promotores de la transcripción, potenciadores, secuencias señal y otras secuencias para la regulación transcripcional. El vector puede ser un plásmido, virus o cualquier otro vector comúnmente usado en ingeniería genética.

La invención comprende además una célula huésped eucariota o procariota transformada o transfectada con el vector de la invención. Las células procariotas tales como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, o células eucariotas tales como *Saccharomyces cerevisiae* se usan generalmente para la clonación de vectores y expresión de ADNc.

Además, las proteínas hibridas hipoalergénicas según la invención pueden producirse como proteínas de fusión.

Dada la reactividad reducida frente a IgE, la molécula hibrida según la presente invención puede usarse de manera adecuada para la preparación de composiciones farmacéuticas que van a usarse en inmunoterapia de sujetos alérgicos al polen de *Parietaria judaica*.

Por tanto un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una molécula hibrida tal como se proporciona en el presente documento, opcionalmente en combinación con otros alérgenos de *Parietaria judaica* y con vehículos, excipientes y adyuvantes farmacéuticamente aceptables. En una realización preferida, tal composición farmacéutica está en forma de una vacuna adecuada para el tratamiento preventivo o terapéutico de enfermedades alérgicas, tales como asma bronquial, rinitis alérgica y conjuntivitis alérgica. Los expertos en la técnica conocen los principios y métodos para la vacunación, se hace referencia a (20) y (21).

Los siguientes ejemplos ilustran la invención en más detalle.

Ejemplos

A menos que se indique lo contrario, los métodos 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 - Construcción de un plásmido que codifica para una molécula híbrida Par j 1-Par j 2 de tipo natural (wtHybrid)

- 5 Se obtuvo la molécula híbrida que contenía la información genética para el híbrido Par j 1-Par j 2 de tipo natural mediante fusión de ADNc que codifican para los alérgenos individuales.
- 10 Se obtuvieron por separado ADNc que codifican para las proteínas Par j 1 y Par j 2 maduras mediante PCR usando los cebadores de oligonucleótidos Pj 1 DIM FW (gcg cga aga aac ctg cg gac tgt agt g) y Pj1 DIM RV (gcg gga tcc ggc tt ttc cg ggg ggg) para Par j 1, y los cebadores de oligonucleótidos Pj2 FW (cgc gga tcc gag gag gct tgc ggg) y PJ2 RV (gcg gga tcc cta ata gta acc tct gaa aat agt act ttg) para Par j 2. Se usaron clones de Par j 1 SEQ ID NO:5 y de Par j 2 SEQ ID NO:6 como moldes. Se volvió a amplificar el producto de amplificación obtenido a partir de Par j 1 reemplazando el cebador Pj 1 DIM FW por Pj1 His FW (gcg cat atg cat cac cat cac cat cac gaa gaa acc tgc ggg act g), mediante el cual se insertó una secuencia que codificaba para seis histidinas en el sentido de 5' de la secuencia de Par j 1. Se insertó un sitio Nde I (que contenía el ATG) en 5' del producto de amplificación Par j 1, y se insertó un sitio Bam H I en su 3' en lugar del codón de terminación. Se insertó un sitio Bam H I en lugar del ATG en 5' de Par j 2, y se insertó un sitio Bam H I en su 3' tras el codón de terminación. Se purificaron los productos amplificados, se digirieron con las enzimas de restricción Nde I y Bam H I (Par j 1), o Bam H I (Par j 2) (se subrayan los sitios de restricción en los cebadores), y posteriormente se insertaron en los sitios Nde I/Bam H I del vector pET 3c (Stratagene, La Jolla, CA) para obtener un constructo que podía expresar una proteína de fusión Par j 1-Par j 2 precedida por una secuencia de seis histidinas. La introducción del sitio de restricción Bam H I, que es necesario para la clonación de fragmentos, permitió la inserción de dos aminoácidos (glicina y serina) en la unión de las dos proteínas sin alterar el marco de lectura (figura 1).
- 25 Se secuenciaron los clones obtenidos de colonias bacterianas individuales por el método de Sanger para verificar que el cambio de base era correcto, y la ausencia de mutaciones no específicas en el ADNc.

Ejemplo 2 - Construcción de un plásmido que codifica para una molécula híbrida Par j 1-Par j 2 mutante (MutHybrid)

- 30 Se obtuvo la molécula híbrida que codificaba para el híbrido Par j 1-Par j 2 mutante siguiendo el método descrito en el ejemplo 1 para la variante híbrida de tipo natural.
- 35 Los pares de oligonucleótidos usados en la reacción de PCR eran idénticos, mientras que los ADNc usados como moldes codificaban para dos variantes hiperalergénicas cuyas secuencias se identifican en el presente documento como SEQ ID NO: 9 (para el mutante Par j 1) y SEQ ID NO: 10 (mutante Par j 2).

Se secuenciaron los clones obtenidos a partir de colonias bacterianas individuales por el método de Sanger para verificar que el cambio de base era correcto, y la ausencia de mutaciones no específicas en el ADNc.

40 Ejemplo 3 - Producción de proteínas Par j 1 y Par j 2, mutantes respectivos, wtHybrid y MutHybrid

- 45 Se clonaron ADNc de Par j 1 (SEQ ID NO:5) y Par j 2 (SEQ ID NO:6) de tipo natural, ADNc mutagenizados (SEQ ID NO: 9 y 10), y ADNc de híbrido de tipo natural y mutante modificados por ingeniería (SEQ ID NO: 7 y 8), precedidos por la secuencia que codificaba para seis histidinas, en un vector de expresión y se expresaron en células de *Escherichia coli* según protocolos convencionales (22,23). Se recogieron las células mediante centrifugación y se resuspendieron en NaH₂PO₄ 50 mM, tampón NaCl 300 mM, pH 8. Se aislaron proteínas recombinantes tras la lisis de células bacterianas mediante sonicación y eliminación de particulados celulares mediante centrifugación. Se purificaron las proteínas a partir del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad usando columnas de agarosa a las que se unieron los iones de níquel quelante de ácido nitrilotriacético que interaccionaban con la parte de seis histidinas fusionada con el alérgeno.

Ejemplo 4 - Características de sueros de sujetos alérgicos

- 55 Se recogieron sueros de sujetos con una historia clínica de alergia estacional al polen de *Parietaria judaica*, y reactividad de RAST 3+ y 4+ específica para los alérgenos Par j 1 y Par j 2. Se usó una combinación de sueros de sujetos no alérgicos como control negativo (datos no mostrados).

60 Ejemplo 5 – Reactividad de la proteína híbrida de SEQ ID N: 3 frente a IgE de sueros de pacientes alérgicos a *Parietaria* mediante ensayo ELISA

- 65 Se adsorbieron cantidades iguales (0,075 nM) de alérgeno de SEQ ID NO: 4 y su variante de SEQ ID NO: 3 mutagenizada, en tampón carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6, en pocillos de placas de poliestireno para ensayo ELISA incubando a 4°C durante 16 horas. Entonces se lavaron los pocillos con disolución de lavado (tampón fosfato 60 mM, pH 6,5, que contenía Tween-20 al 0,05%), y se bloquearon los sitios libres con disolución de dilución (suero de cabra al 15%, EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,05%, en tampón fosfato 150 mM, pH 7,4). Se añadieron a cada

muestra alícuotas iguales (100 µl) de 12 sueros positivos humanos frente a Par j 1 y Par j 2, o sueros de sujetos no alérgicos (datos no mostrados), a una dilución 1:10 en tampón de dilución y se incubaron a 25°C durante 3 horas. Tras tres lavados, se añadió suero conjugado con peroxidasa anti-IgE humana diluido 1:3500 en tampón de dilución, y se incubó a 25°C durante 1,5 horas. Tras tres lavados, se obtuvo el desarrollo de reacción colorimétrica añadiendo 100 µl de reactivo de TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD), e incubando durante 20 minutos a 25°C. Se detuvo la reacción añadiendo 100 µl de HCl 1 N, y se evaluó leyendo a 450 nm con un espectrofotómetro.

Ejemplo 6 – Ensayo de inhibición de ELISA - SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 3 inhiben la unión del extracto de *Parietaria judaica* a IgE en suero

Se adsorbieron cantidades iguales (1 µg) de extracto de *Parietaria judaica* en tampón carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6, en pocillos de placa de poliestireno para ensayo ELISA incubando a 4°C durante 16 horas. Entonces se lavaron los pocillos con disolución de lavado (tampón fosfato 60 mM, pH 6,5, que contenía Tween-20 al 0,05%), y se bloquearon los sitios libres con disolución de dilución (suero de cabra al 15%, EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,05%, en tampón fosfato 150 mM, pH 7,4). Se incubaron previamente alícuotas (100 µl) de una dilución 1:5 de sueros de RAST 4+ y 3+ humanos frente a Par j 1 y Par j 2 con cantidades equimolares (0,150 nM) de alérgeno (híbrido) de tipo natural, mutagenizado o modificado por ingeniería a 25°C durante 2 horas. Entonces se añadieron las mezclas a cada pocillo, y se incubaron a 4°C durante 16 horas. Tras tres lavados con fosfato 0,06 M, pH 6,5, tampón Tween-20 al 0,05%, se añadió suero conjugado con peroxidasa anti-IgE humana diluido 1:3000 en tampón de dilución, y se incubó a 25°C durante 1,5 horas. Tras tres lavados, se obtuvo el desarrollo de reacción colorimétrica añadiendo 100 µl de reactivo de TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD), e incubando durante 20 minutos a 25°C. Se detuvo la reacción añadiendo 100 µl de HCl 1 N, y se evaluó leyendo a 450 nm con un espectrofotómetro. Se calculó el porcentaje de inhibición usando la siguiente fórmula: 100 x [(A-B)/A], en la que A es la absorbancia a 450 nm en ausencia de inhibidor, y B es la absorbancia en presencia de inhibidor.

Tabla. Las moléculas mutagenizadas y de tipo natural híbridas inhiben la unión *Parietaria judaica* - IgE

| suero | Mezcla de tipo natural | Mezcla mutante | SEQ ID NO: 4 | SEQ ID NO: 3 |
|-----------------------|------------------------|----------------|--------------|--------------|
| 1 | 84,2 | 7,0 | 87,6 | 0,4 |
| 2 | 83,4 | 10,1 | 77,7 | -0,6 |
| 3 | 61,2 | 24,0 | 59,7 | -4,2 |
| 4 | 71,8 | 5,4 | 47,7 | 1,0 |
| 5 | 62,7 | 13,9 | 61,5 | 12,9 |
| 6 | 39,9 | 5,8 | 30,6 | 12,5 |
| 7 | 78,9 | 13,6 | 79,3 | 12,6 |
| 8 | 85,4 | 21,8 | 83,9 | 14,8 |
| 9 | 73,7 | 1,7 | 46,5 | 8,9 |
| 10 | 83,4 | 30,9 | 81,6 | 17,3 |
| 11 | 70,7 | 30,8 | 70,5 | 22,5 |
| 12 | 31,0 | 1,5 | 4,0 | -3,4 |
| 13 | 79,6 | 9,6 | 63,4 | 5,5 |
| 14 | 71,6 | 54,8 | 80,0 | 6,7 |
| % de inhibición media | 69,8 | 16,5 | 62,4 | 7,6 |
| desviación estándar | 16,52 | 14,77 | 23,63 | 8,20 |

Ejemplo 7 - Inmunización de ratones Balb/c

Se inmunizaron por vía subcutánea cinco grupos de ratones cada uno compuesto por tres animales hembra de la cepa de Balb/c (Charles River) con 200 µl de emulsión compuesta por 100 µl de adyuvante de Freund completo y cantidades equimolares (0,150 nM) de antígeno recombinante o extracto de *Parietaria judaica* (20 µg) en 100 µl de solución salina. Se realizaron otros dos refuerzos tras 21 y 42 días sustituyendo el adyuvante completo por adyuvante incompleto. Como control, tres ratones recibieron el mismo tratamiento con un antígeno no relacionado (datos no mostrados). Cuatro, seis y nueve semanas tras la primera inmunización, se realizó la extracción de sangre de la vena yugular de ratones, y se comprobó la respuesta de anticuerpos frente al inmunógeno respectivo mediante ELISA.

Ejemplo 8 - Análisis de respuesta de IgG específica en ratones inmunizados mediante ensayo ELISA

Se adsorbieron cantidades iguales (1 µg) de extracto *Parietaria judaica* en tampón carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6, en pocillos de placa de poliestireno para ensayo ELISA incubando a 4°C durante 16 horas. Entonces se lavaron los pocillos con disolución de lavado (tampón fosfato 60 mM, pH 6,5, que contenía Tween-20 al 0,05%), y se bloquearon sitios libres con disolución de dilución (suero de cabra al 15%, EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,05%, en tampón fosfato 150 mM, pH 7,4). Se combinaron los sueros de ratones basándose en el tipo inmunogénico y el tiempo transcurrido desde la primera inmunización. Se añadieron alícuotas iguales (100 µl) de cada combinación a cada pocillo a una dilución 1:27000 en tampón de dilución, y se incubaron a 25°C durante 3 horas. Tras tres lavados,

se añadió suero conjugado con peroxidasa anti-IgG de ratón total diluido 1:8000 en tampón de dilución y se incubó a 25°C durante 1,5 horas. Tras tres lavados, se obtuvo el desarrollo de reacción colorimétrica añadiendo 100 µl de reactivo de TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD), e incubando durante 20 minutos a 25°C. Se detuvo la reacción añadiendo 100 µl de HCl 1 N y se leyó a 450 nm con un espectrofotómetro.

Ejemplo 9 – Ensayo de inhibición de ELISA: IgG frente a SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 3 inhiben la unión entre el extracto de *Parietaria judaica* e IgE en los sueros de pacientes alérgicos a *Parietaria*

Se adsorbieron cantidades iguales (1 µg) de extracto de *Parietaria judaica* en tampón carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6, en pocillos de poliestireno para ensayo ELISA incubando a 4°C durante 16 horas. Entonces se lavaron los pocillos con disolución de lavado (tampón fosfato 60 mM, pH 6,5, que contenía Tween-20 al 0,05%), y se bloquearon los sitios libres con disolución de dilución (suero de cabra al 15%, EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,05%, en tampón fosfato 150 mM, pH 7,4). Se incubaron alícuotas (100 µl) de combinaciones diluidas 1:25 de sueros de ratón recogidos tras siete semanas desde la primera inmunización a 4°C durante 16 horas. Tras tres lavados con tampón fosfato 0,06 M, pH 6,5, Tween-20 al 0,05%, se añadieron doce sueros de RAST 4+ y 3+ humanos diluidos 1:10 frente a Par j 1 y Par j 2 a 25°C durante 2 horas. Tras tres lavados con tampón fosfato 0,06 M, pH 6,5, Tween-20 al 0,05%, se añadió suero conjugado con peroxidasa anti-IgE humana diluido 1:3500 en tampón de dilución, y se incubó a 25°C durante 1,5 horas. Tras tres lavados, se obtuvo el desarrollo de la reacción colorimétrica añadiendo 100 µl de reactivo de TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD), e incubando durante 20 minutos a 25°C. Se detuvo la reacción añadiendo 100 µl de HCl 1 N y se leyó a 450 nm con un espectrofotómetro. Se calculó el porcentaje de inhibición usando la siguiente fórmula: $100 \times [(A-B)/A]$, en la que A es la absorbancia a 450 nm en ausencia de suero humano de inhibición, y B es la absorbancia en presencia de suero humano de inhibición.

Ejemplo 10 – Análisis estadístico

En las figuras, se expresan los resultados como valores medios más las correspondientes desviaciones estándar.

Se usó el programa UNISTAT 5.5 Light para el software Excel para los análisis estadísticos. Se analizaron los datos mediante prueba de la t para datos emparejados.

Bibliografía

- 1) Vrtala S, (2008) "From allergen genes to new forms of allergy diagnosis and treatment". Allergy; 63(3):299-309.
- 2) Malling H. J., (1998) "Immunotherapy as an effective tool in allergy treatment". Allergy; 53: 461.
- 3) Toubi E., Kessel A., Blant A., Golan T.D., (1999) "Follow-up after systemic adverse reactions of immunotherapy". Allergy; 54(6): 617-620.
- 4) Visco V, Dolecek C, Denépoux S, Le Mao J, Guret C, Rousset F, Guinnepain MT, Kraft D, Valenta R, Weyer A, Banchereau J, Lebecque S. (1996). "Human IgG monoclonal antibodies that modulate the binding of specific IgE to birch pollen Bet v 1". J. Immunol. 157: 956-962.
- 5) Vrtala S, Ball T, Spitzauer s, Pandjaitan B, Suphioglu C, Knox B, Sperr WR, Valent P, Kraft D, Valenta R. (1998). "Immunization with purified natural and recombinant allergens induces mouse IgG1 antibodies that recognize similar epitopes as human IgE and inhibit the human IgE-allergen interaction and allergen-induced basophil degranulation". J Immunol 160: 6137.
- 6) Singh MB, de Weerd N, Bhalla PL, (1999) "Genetically engineered plant allergens with reduced anaphylactic activity". Int. Arch. Allergy Immunol.; 119: 75-85.
- 7) Colombo P, Duro G, Costa MA, Izzo V, Mirisola MG, Locorotondo G, Cocchiara R, Geraci D. (1998). "Parietaria pollen allergens". Allergy; 53:917-921.
- 8) Costa M.A., Colombo P., Izzo V., Kennedy D., Venturella S., Cocchiara R., Mistrello G., Falagiani P., Geraci D., (1994). "cDNA cloning, expression and primary structure of Par j 1, a major allergen of *Parietaria judaica* pollen". FEBS Lett.; 341:182-186.
- 9) Duro G., Colombo P., Costa M.A., Izzo V., Porcasi R., Di Fiore R., Locorotondo G., Mirisola M.G., Cocchiara R., Geraci D., (1996). "cDNA 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.
- 10) 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.

- 11) Asturias JA, Gomez-Bayon N, Eseverry JL, Martinez A. (2003). "Par j 1 and Par j 2, the major allergens from Parietaria judaica pollen, have similar immunoglobulin E epitopes". Clin Exp Allergy; 33:518-524.
- 5 12) Han GW, Lee JY, Song HK et al. (2001). Structural basis of non-specific lipid binding in maize, lipid transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography". J Mol Biol; 308:263-278.
- 10 13) Bonura A, Amoroso S, Locorotondo G, Di Felice G, Tinghino R, Geraci D, Colombo P. (2001) "Hypoallergenic variants of the Parietaria judaica major allergen Par j 1: a member of the non-specific lipid transfer protein plant family". Int Arch Allergy Immunol; 126:32-40.
- 14) Sturaro M, Viotti A, Genga A, Falagiani P, Mistrello G, Roncarolo D, Zanotta S. "Variants of the major allergen Par j 2 of Parietaria judaica". WO 02/22674.
- 15 15) Mistrello G, Zanotta S, Roncarolo D, Falagiani P, Viotti A. "Hypoallergenic proteins derived from the major allergen of Parietaria judaica". EP1712560.
- 20 16) Gonzalez-Rioja R, Ibarrola I, Arilla C, Ferrer A, Amparo M, Andreu C, Martinez A, Asturias J. (2007). "Genetically engineered hybrid proteins from Parietaria judaica pollen for allergen-specific immunotherapy". J allergy Clin Immunol; 120:602-609, and WO2007/116316.
- 17) Costa MA, Geraci D, Colombo P, Passantino R, Bonura A. "Hypoallergenic variants of the Parietaria judaica major allergens, uses thereof and compositions comprising them". WO 2004/104047 A1.
- 25 18) Bonura A, Corinti S, Artale A, Di Felice G, Amoroso S, Melis M, Geraci D, Colombo P. (2007). "A hybrid expressing genetically engineered major allergens of the Parietaria pollen as a tool for specific allergy vaccination". Int Arch Allergy Immunol; 142:274-284.
- 30 19) 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.
- 20) Paul, (1989), "Fundamental Immunology", Raven press, New York.
- 35 21) Cryz, S.J. (1991), "Immunotherapy and Vaccines", VCH Verlagsgesellschaft.
- 35 22) Younghhee Kim. (2004). "Cloning and Expression of a Lipase Gene from Rice (*Oryza sativa* cv. Dongjin)". Mol. Cells, 18 (1): 40-45.
- 40 23) 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.

ES 2 384 231 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> LOFARMA S.P.A.

5 <120> PROTEÍNAS HÍBRIDAS DE PRINCIPALES ALÉRGENOS DE *PARIETARIA JUDAICA* Y USOS DE LAS MISMAS

<130> 8887MEUR

10 <160> 15

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

15 <211> 139

<212> PRT

<213> *Parietaria judaica*

<400> 1

20

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 |
| | | | | | | | | | | 25 | | | | 30 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Lys | Arg | Leu | Asp | Gly | Glu | Thr | Lys | Thr | Gly | Pro | Gln | Arg | Val | His |
| | | | | | | | | | 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 | Ala | Pro | Glu | Lys | Ala | | | | | | |
| | | | | | | | | 130 | 135 | | | | | | |

<210> 2

<211> 102

25 <212> PRT

<213> *Parietaria judaica*

<400> 2

ES 2 384 231 T3

Glu Glu Ala Cys Gly Lys Val Val Gln Asp Ile Met Pro Cys Leu His
1 5 10 15

Phe Val Lys Gly Glu Glu Lys Glu Pro Ser Lys Glu Cys Cys Ser Gly
20 25 30

Thr Lys Lys Leu Ser Glu Glu Val Lys Thr Thr Glu Gln Lys Arg Glu
35 40 45

Ala Cys Lys Cys Ile Val Arg Ala Thr Lys Gly Ile Ser Gly Ile Lys
50 55 60

Asn Glu Leu Val Ala Glu Val Pro Lys Lys Cys Asp Ile Lys Thr Thr
65 70 75 80

Leu Pro Pro Ile Thr Ala Asp Phe Asp Cys Ser Lys Ile Gln Ser Thr
85 90 95

Ile Phe Arg Gly Tyr Tyr
100

<210> 3
<211> 243

5 <212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> secuencia sintética

10 <400> 3

ES 2 384 231 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 Ala Pro Glu Lys Ala Gly Ser Glu Glu Ala
130 135 140

Cys Gly Lys Val Val Gln Asp Ile Met Pro Cys Leu His Phe Val Gln
145 150 155 160

Gly Glu Glu Ala Glu Pro Ser Ala Glu Cys Cys Ser Gly Thr Lys Gly
165 170 175

Leu Ser Glu Glu Val Ala Thr Thr Glu Gln Ala Arg Glu Ala Cys Lys
180 185 190

Cys Ile Val Arg Ala Thr Lys Gly Ile Ser Gly Ile Lys Asn Glu Leu
195 200 205

Val Ala Glu Val Pro Gly Lys Cys Asp Ile Ser Thr Thr Leu Pro Pro
210 215 220

Ile Thr Ala Asp Phe Asp Cys Ser Lys Ile Gln Ser Thr Ile Phe Arg
225 230 235 240

Gly Tyr Tyr

<210> 4

5 <211> 243

ES 2 384 231 T3

<212> PRT
<213> Desconocido

5 <220>
<223> secuencia sintética

<400> 4

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

ES 2 384 231 T3

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 Ala Pro Glu Lys Ala Gly Ser Glu Glu Ala
130 135 140

Cys Gly Lys Val Val Gln Asp Ile Met Pro Cys Leu His Phe Val Lys
145 150 155 160

Gly Glu Glu Lys Glu Pro Ser Lys Glu Cys Cys Ser Gly Thr Lys Lys
165 170 175

Leu Ser Glu Glu Val Lys Thr Thr Glu Gln Lys Arg Glu Ala Cys Lys
180 185 190

Cys Ile Val Arg Ala Thr Lys Gly Ile Ser Gly Ile Lys Asn Glu Leu
195 200 205

Val Ala Glu Val Pro Lys Lys Cys Asp Ile Lys Thr Thr Leu Pro Pro
210 215 220

Ile Thr Ala Asp Phe Asp Cys Ser Lys Ile Gln Ser Thr Ile Phe Arg
225 230 235 240

Gly Tyr Tyr

<210> 5

<211> 420

<212> ADN

5 <213> *Parietaria judaica*

ES 2 384 231 T3

| | | |
|---------|---|-----|
| <400> 5 | | |
| | gaagaaaacct gcgggactgt agtgggagcg ctgatgccgt gcctgccgtt cgtgcagggg | 60 |
| | aaagagaaaag agccgtcaaa ggggtgctgc agcggcgcca aaagattgga cggggagacg | 120 |
| | aagacggggc cgcaagggt gcacgcttgt gagtgcatcc agaccgcccataa gaagacccat | 180 |
| | tccgacatcg acgggaaact cgtcagcgag gtccccaaagc actgcggcat cgttgacagc | 240 |
| | aagctccgc ccattgacgt caacatggac tgcaagacac ttggagtggt acctcggcaa | 300 |
| | ccccaaacttc cagtctctc ccgtcatggt cccgtcacgg gcccaagtga ccccgccccac | 360 |
| | aaagcacggt tggagagacc ccagattaga gttccgcccc ccgcacccgga aaaaggctaa | 420 |
| 5 | | |
| | <210> 6 | |
| | <211> 309 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> <i>Parietaria judaica</i> | |
| 10 | | |
| | <400> 6 | |
| | gaggaggctt gcgggaaagt ggtgcaggat ataatgccgt gcctgcattt cgtgaagggg | 60 |
| | gaggagaagg agccgtcgaa ggagtgctgc agcggcacga agaagctgag cgaggaggtg | 120 |
| | aagacgacgg agcagaagag ggaggcctgc aagtgcatacg tgcgccac gaagggcatc | 180 |
| | tccggtatca aaaatgaact tgcgcccag gtccccaaaga agtgcgatat taagaccact | 240 |
| | ctcccgccccca tcaccgccccca cttcgactgc tccaagatcc aaagtactat tttcagaggt | 300 |
| | tactattag | 309 |
| 15 | | |
| | <210> 7 | |
| | <211> 732 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Desconocido | |
| 20 | | |
| | <220> | |
| | <223> secuencia sintética | |
| | <400> 7 | |

ES 2 384 231 T3

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-----|
| gaagaaaacct | gcgggactgt | agtggagcg | ctgatgccgt | gcctgccgtt | cgtgcagggg | 60 |
| aaagagaaaag | agccgtcaa | ggggtgctgc | agcggcgcca | aaagattgga | cggggagacg | 120 |
| aagacggggc | cgcagagggt | gcacgcttgt | gagtgcaccc | agaccgcat | gaagacctat | 180 |
| tccgacatcg | acgggaaact | cgtcagcgag | gtccccaa | actgcggcat | cgttgacagc | 240 |
| aagctccgc | ccattgacgt | caacatggac | tgcaagacac | ttggagtgg | acctcgca | 300 |
| ccccaa | cagtctct | ccgtcatgg | cccgtcacgg | gcccaagtga | ccccgcccac | 360 |
| aaagcacggt | tggagagacc | ccagattaga | gttccgcccc | ccgcacccgga | aaaagccgga | 420 |
| tccgaggagg | cttgcggaa | agtggtgca | gatataatgc | cgtgcctgca | tttcgtgaag | 480 |
| ggggaggaga | aggagccgtc | gaaggagtgc | tgcagcggca | cgaagaagct | gagcgaggag | 540 |
| gtgaagacga | cggagcagaa | gagggaggcc | tgcaagtgc | tagtgcgcgc | cacgaagggc | 600 |
| atctccggt | tcaaaaatga | acttgcgc | gaggtcccc | agaagtgcga | tattaagacc | 660 |
| actctccgc | ccatcaccgc | cgacttcgac | tgctccaaga | tccaaagtac | tatttcaga | 720 |
| ggttactatt | ag | | | | | 732 |

<210> 8

<211> 732

5 <212> ADN

<213> Desconocido

<220>

<223> secuencia sintética

10 <400> 8

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-----|
| gaagaaaacct | gcgggactgt | agtggagcg | ctgatgccgt | gcctgccgtt | cgtgcagggg | 60 |
| aaagagggcag | agccgtcagc | ggggtgctgc | agcggcgcca | aaagattgga | cggggagacg | 120 |
| gcgcacggggc | cgcagagggt | gcacgcttgt | gagtgcaccc | agaccgcat | gaagacctat | 180 |
| tccgacatcg | acggggact | cgtcagcgag | gtccccaa | actgcggcat | cgttgacagc | 240 |
| aagctccgc | ccattgacgt | caacatggac | tgcaagacac | ttggagtgg | acctcgca | 300 |
| ccccaa | cagtctct | ccgtcatgg | cccgtcacgg | gcccaagtga | ccccgcccac | 360 |
| aaagcacggt | tggagagacc | ccagattaga | gttccgcccc | ccgcacccgga | aaaagccgga | 420 |
| tccgaggagg | cttgcggaa | agtggtgca | gatataatgc | cgtgcctgca | tttcgtgcag | 480 |
| ggggaggagg | cgagccgtc | ggcgagtg | tgcagcggca | cgaagggt | gagcgaggag | 540 |
| gtggcgacga | cgagcaggc | gagggaggcc | tgcaagtgc | tagtgcgcgc | cacgaagggc | 600 |
| atctccggt | tcaaaaatga | acttgcgc | gaggtcccc | agaagtgcga | tattaagacc | 660 |
| actctccgc | ccatcaccgc | tgacttcgac | tgctccaaga | tccaaagtac | tatttcaga | 720 |
| ggttactatt | ag | | | | | 732 |

ES 2 384 231 T3

5 <210> 9
 <211> 420
 <212> ADN
 5 <213> Desconocido

10 <220>
 <223> secuencia sintética

10 <400> 9

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-----|
| gaagaaaacct | gcgggactgt | agtgggagcg | ctgatgccgt | gcctgccgtt | cgtgcagggg | 60 |
| aaagaggcag | agccgtcagc | ggggtgctgc | agcggcgcca | aaagattgga | cggggagacg | 120 |
| gcgacggggc | cgcagagggt | gcacgcttgt | gagtgcaccc | agaccgccc | gaagacctat | 180 |
| tccgacatcg | acggggcact | cgtcagcgag | gtccccaa | actgcggcat | cgttgcacagc | 240 |
| aagctccgc | ccattgacgt | caacatggac | tgcaagacac | ttggagtggt | acctcgccaa | 300 |
| ccccaaacttc | cagtctctct | ccgtcatggt | cccgta | gcccaagtga | ccccgcccac | 360 |
| aaagcacggt | tggagagacc | ccagattaga | gttccgc | ccgcaccgga | aaaagcctaa | 420 |

15 <210> 10
 <211> 309
 <212> ADN
 15 <213> Desconocido

20 <220>
 <223> secuencia sintética

20 <400> 10

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| gaggaggctt | gcgggaaagt | ggtgcaggat | ataatgccgt | gcctgcattt | cgtgcagggg | 60 |
| gaggaggcgg | agccgtcggc | ggagtgcgtc | agcggcacga | aggggctgag | cgaggaggtg | 120 |
| gcgacgacgg | agcaggcgag | ggaggcctgc | aagtgcata | tgcgcgccac | gaagggcatc | 180 |
| tccgttatca | aaaatgaact | tgtcgccgag | gtccccggga | agtgcgat | tagcaccact | 240 |
| ctcccgccca | tcaccgcccga | ttcgactgc | tccaagatcc | aaagtactat | tttcagaggt | 300 |
| | tactattag | | | | | 309 |

25 <210> 11
 <211> 28
 <212> ADN
 25 <213> Desconocido

30 <220>
 <223> cebador de oligonucleótido

30 <400> 11

35 gcgcgaagaa acctgcggga ctgttagtg

| | | | | | |
|--|--|--|--|--|----|
| | | | | | 28 |
|--|--|--|--|--|----|

35 <210> 12
 <211> 30
 <212> ADN
 40 <213> Desconocido

| | | | | | | |
|----|------------|----------------------------|------------|------------|--------|----|
| | <220> | | | | | |
| | <223> | cebador de oligonucleótido | | | | |
| 5 | <400> | 12 | | | | |
| | gcgggatccg | gcttttccg | gtgcgggggg | | | |
| 10 | <210> | 13 | 30 | | | |
| | <211> | 24 | | | | |
| | <212> | ADN | | | | |
| | <213> | Desconocido | | | | |
| 15 | <220> | | | | | |
| | <223> | cebador de oligonucleótido | | | | |
| 15 | <400> | 13 | | | | |
| | cgcggatccg | aggaggcttg | cggg | | | |
| 20 | <210> | 14 | 24 | | | |
| | <211> | 39 | | | | |
| | <212> | ADN | | | | |
| | <213> | Desconocido | | | | |
| 25 | <220> | | | | | |
| | <223> | cebador de oligonucleótido | | | | |
| | <400> | 14 | | | | |
| 30 | gcgggatccc | taatagtaac | ctctgaaaat | agtactttg | 39 | |
| | <210> | 15 | | | | |
| | <211> | 46 | | | | |
| | <212> | ADN | | | | |
| 35 | <213> | Desconocido | | | | |
| | <220> | | | | | |
| | <223> | cebador de oligonucleótido | | | | |
| 40 | <400> | 15 | | | | |
| | gcgcatatgc | atcaccatca | ccatcacgaa | gaaacctgcg | ggactg | 46 |

REIVINDICACIONES

1. Proteína híbrida que consiste en alérgenos Par j 1 y Par j 2 mutados, opcionalmente separados por un ligador, en la que:
 - 5 a) la secuencia de Par j 1 es o bien SEQ ID NO:1 o bien una secuencia de una proteína que se produce de manera natural idéntica a SEQ ID NO:1 en al menos el 95%,
y
10 en dicha secuencia de Par j 1, los residuos de Lys en las posiciones 23, 27, 41 y 66 de SEQ ID NO:1, o en las posiciones correspondientes de dicha proteína que se produce de manera natural en las que están presentes residuos de Lys correspondientes en alineaciones de secuencias respectivas, se sustituyen por aminoácidos neutros, polares o ácidos;
 - 15 b) la secuencia de Par j 2 es o bien SEQ ID NO:2 o bien una secuencia de una proteína que se produce de manera natural idéntica a SEQ ID NO:2 en al menos el 95%,
y
20 en dicha secuencia de Par j 2, los residuos de Lys en las posiciones 19, 23, 27, 35, 41, 46, 73 y 78 de SEQ ID NO:2, o en las posiciones correspondientes de dicha proteína que se produce de manera natural en las que están presentes residuos de Lys correspondientes en alineaciones de secuencias respectivas, se sustituyen por aminoácidos neutros, polares o ácidos;
 - 25 c) las secuencias de Par j 1 y Par j 2, tal como se definió anteriormente, pueden ubicarse indistintamente en los extremos N o C terminales de la proteína híbrida, siempre que tengan orientación cabeza a cola;
 - 30 d) si está presente, dicho ligador consiste en de 1 a 8 aminoácidos.
2. Proteína híbrida según la reivindicación 1, en la que dichos residuos de Lys se sustituyen por aminoácidos seleccionados de Ala, Gly, Pro, Leu, Ile, Phe, Thr, Ser, Gln, Asn, Glu, Asp.
3. Proteína híbrida según la reivindicación 2, en la que dichos aminoácidos se seleccionan de Ala, Gly, Thr, Ser, Gln, Asn, Glu, Asp.
4. Proteína híbrida según la reivindicación 1, en la que dicho ligador es un dipéptido.
5. Proteína híbrida según la reivindicación 1, en la que Par j 1 y Par j 2 se ubican en los extremos N y C terminales, respectivamente.
- 40 6. Proteína híbrida según la reivindicación 1, que tiene la secuencia SEQ ID NO:3.
7. Molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína híbrida según las reivindicaciones 1-6.
- 45 8. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6, que tiene la secuencia SEQ ID NO: 8.
9. Vector de expresión que contiene la molécula de ácido nucleico según las reivindicaciones 7-8.
- 50 10. Célula huésped que contiene el vector según la reivindicación 9.
11. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una proteína híbrida según las reivindicaciones 1-6 junto con excipientes y portadores farmacéuticamente aceptables.
- 55 12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, que está en forma de una vacuna adecuada para la inmunoterapia de enfermedades alérgicas.
13. Proteína híbrida según las reivindicaciones 1-6, o composición farmacéutica según las reivindicaciones 11-12, para el tratamiento preventivo o terapéutico de enfermedades alérgicas provocadas por el polen de *Parietaria judaica*.
- 60 14. Proteína híbrida según las reivindicaciones 1-6, o composición farmacéutica según las reivindicaciones 11-12, para el tratamiento de asma bronquial alérgica o rinoconjuntivitis alérgica.

Figura 1

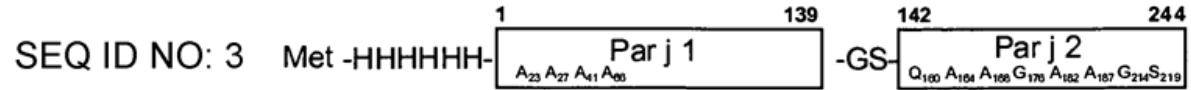
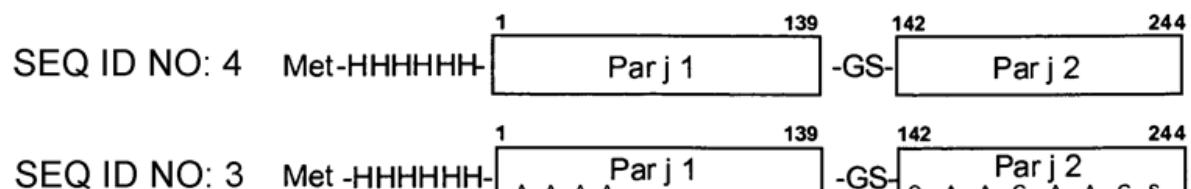


Figura 2

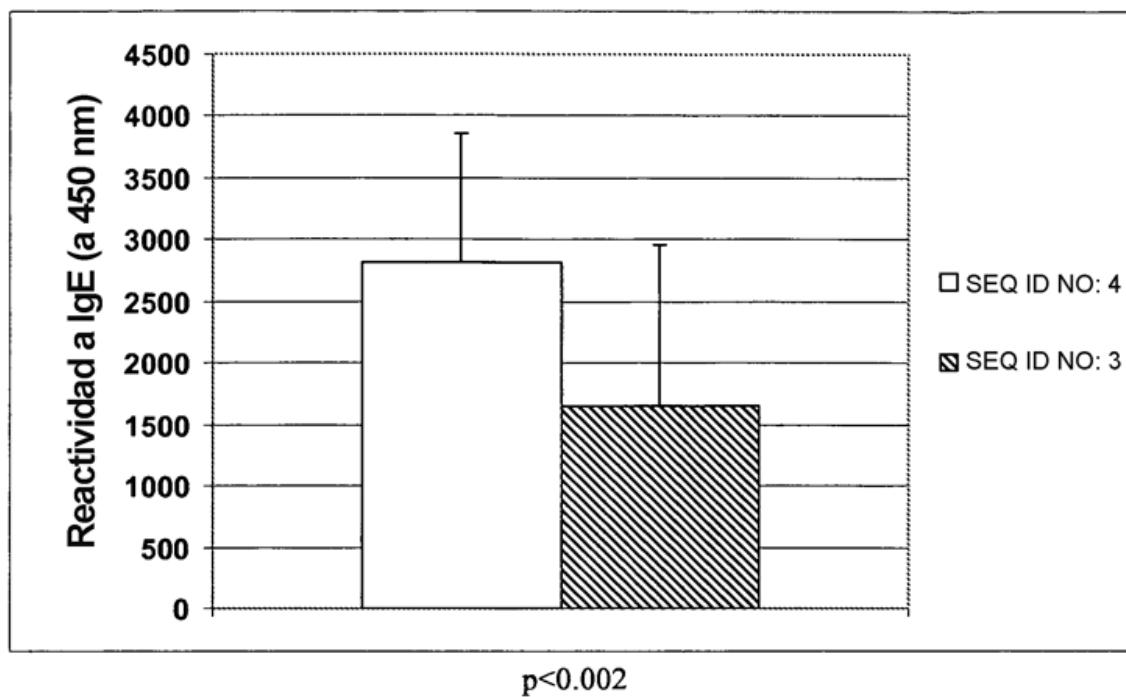


Figura 3

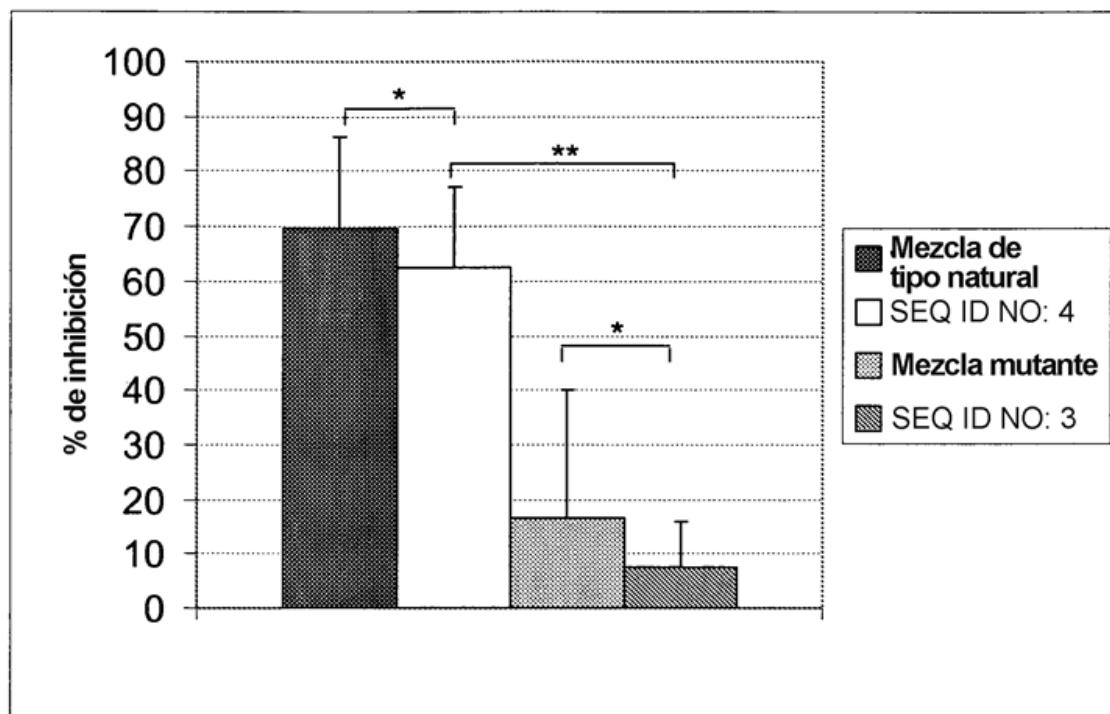


Figura 4

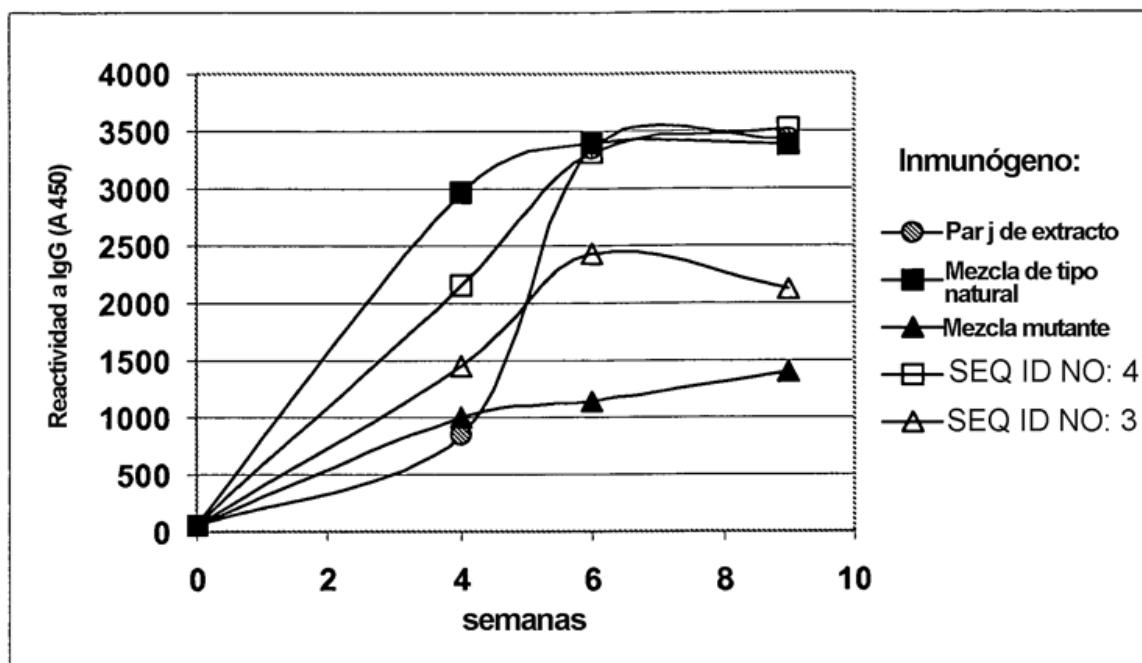


Figura 5

