



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 286 150**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01980370 .9**

86 Fecha de presentación : **11.09.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1319020**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.06.2003**

54 Título: **Variantes del alergeno principal Par j 2 de *Parietaria judaica*.**

30 Prioridad: **12.09.2000 IT MI00A1985**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

73 Titular/es:
**CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
Piazzale Aldo Moro, 7
00185 Roma, IT**

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

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 286 150 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

Variantes del alérgeno principal Par j 2 de *Parietaria judaica*.

5 La presente invención se refiere a nuevas variantes de un alérgeno del polen de plantas de la especie *Parietaria judaica*.

Más particularmente, la presente invención se refiere a las secuencias de aminoácidos de variantes hipoalérgicas del alérgeno Par j 2, obtenido por mutagénesis específica de sitio de la secuencia nucleotídica que codifica dicho alérgeno. Las variantes hipoalérgicas pueden usarse en la inmunoterapia específica de patologías alérgicas causadas por el polen de *Parietaria judaica*.

Antecedentes de la invención

15 Las alergias están causadas por un mal función del sistema inmune, que reacciona produciendo anticuerpos de la clase IgE contra proteínas, principalmente contenidas en pólenes, ácaros, epitelios, y algunos productos alimenticios, que siendo dichas proteínas *per se* inocuas.

20 Las recientes estimaciones indican que más del 10% de la población en países occidentales padece esta enfermedad, que con el tiempo puede inducir el empeoramiento de los síntomas (por ejemplo, aparición de asma) y sensibilización a otros alérgenos, haciendo de este modo que la elección de la terapia sea más complicada.

25 La inmunoterapia específica (SIT), al contrario de la terapia farmacológica, es el único tipo de tratamiento etiológico de las patologías alérgicas capaz de afectar de forma favorable a algunos parámetros inmunológicos en la base de la enfermedad.

SIT consiste en la administración de dosis crecientes de extractos normalizados (vacunas), obtenidos partiendo de la sustancia que es la causa de la enfermedad.

30 De este modo, la tolerancia inmunológica a dicha sustancia aumenta gradualmente en el paciente, acompañada por la desaparición de los síntomas alérgicos.

35 El riesgo de provocar incluso efectos secundarios graves (1), aunque remarcadamente reducidos con el uso de vacunas de liberación lenta o vacunas administradas a través de una vía alternativa a la inyección, sin embargo ha restringido el uso de SIT en la terapia de enfermedades alérgicas.

40 En los últimos años, la atención se ha centrado en el desarrollo de vacunas eficaces, más seguras. En particular, una diana importante es el desarrollo de vacunas compuestas por proteínas recombinantes mutagenizadas, es decir variantes hipoalérgicas capaces de afectar de forma favorable al progreso natural de la enfermedad sin causar efectos secundarios indeseados (2).

45 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 está identificada en GenBank con el código de número de acceso AC X77414) y Par j 2 (AC X95865), son proteínas de aproximadamente 12 kD de peso molecular con homología parcial de secuencia y funcional (3, 4, 5).

Descripción detallada de la invención

50 Ahora se ha descubierto que el efecto alérgico de Par j 2 (GenBank, AC X95865) puede disminuirse cambiando su secuencia de aminoácidos en al menos uno de las posiciones nº 19, 23, 27, 35, 41, 46, 73 y 78, en las que está presente un resto de Lys. "Cambio" en este documento significa sustituir uno o más restos en las posiciones especificadas preferiblemente con aminoácidos neutros o polares, o delecionar uno o más restos de Lys presentes en la forma natural, o sustituir y delecionar simultáneamente dos o más restos.

55 Se prefieren las siguientes mutaciones por sustitución: Gln19, Ala23, Ala27, Gly35, Ala41, Ala46, Gly73 y Ser78, en las que el número significa la posición del resto aminoacídico en la secuencia. Son más preferidas las variantes en las que están presentes al mismo tiempo las ocho sustituciones indicadas anteriormente (SEC ID N° 2) o, como alternativa, las 5 sustituciones Gln19, Ala23, Ala27, Ala41 y Ala46 (SEC ID N° 3).

60 La invención comprende adicionalmente un péptido inmunológicamente activo que deriva de la secuencia de aminoácidos de Par j 2 y que contiene al menos una de las sustituciones/delecciones descritas anteriormente.

65 En un aspecto adicional, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína variante de Par j 2 o un péptido derivado de la misma.

Las variantes de secuencia de acuerdo con la invención pueden prepararse fácilmente partiendo de ADNc de la forma madura del alérgeno Par j 2, que no incluye la región que codifica el péptido señal, adecuadamente mutagenizado en las posiciones deseadas.

ES 2 286 150 T3

La secuencia de ADNc que codifica la variante preferida correspondiente a la SEC ID N° 2, se presenta en la SEC ID N° 1.

El ADNc de la SEC ID N° 1 se expresó en células de *Escherichia coli*. La proteína recombinante producida tiene reactividad reducida a IgE del suero de sujetos alérgicos al polen de *Parietaria judaica*. En particular, ensayos de transferencia de Western demostraron que aproximadamente el 75% (10/13) de los sueros que inmunorreaccionan con el alérgeno normal tienen reactividad reducida con la variante mutagenizada correspondiente a la SEC ID N° 2 [Fig. 1]. Esta reactividad disminuye en más del 80% de media, como se determina por ensayo ELISA [Fig. 2, mut 8]. Por otro lado, la variante obtenida introduciendo los restos Gln19, Ala23, Ala27, Ala41 y Ala46 mostró alergenicidad reducida en la mitad de los sueros ensayados [Fig. 1] y dicha reducción es del 50% de media [Fig. 2, mut 5]. Finalmente, la variante del alérgeno Par j 2 con las 3 sustituciones Gln19, Ala23 y Ala27 muestra una reducción de la unión de IgE de aproximadamente el 20% [Fig. 2, mut 3].

La invención se refiere adicionalmente a un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una cualquiera de las variantes hipoalérgicas definidas anteriormente.

Dicho vector puede ser un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago o cualquier otro vector habitualmente usado en ingeniería genética, y puede incluir, además de la molécula de ácido nucleico de la invención, elementos eucariotas o procariotas para el control de la expresión, tales como secuencias reguladoras para el inicio y la terminación de la transcripción, potenciadores, promotores, secuencias señal y similares.

Además, la invención comprende una célula huésped procariota o eucariota transformada en o transfectada con el vector de la invención. En principio, se usarán células procariotas tales como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*, o células eucariotas tales como *Saccharomyces cerevisiae* para clonar el vector y expresar el ADNc.

Las proteínas variantes de la invención pueden producirse como tales o como proteínas de fusión.

Gracias a la reactividad IgE reducida, dichas variantes pueden usarse para propósitos terapéuticos en la preparación de vacunas a usar en la inmunoterapia de alergias al polen de *Parietaria judaica*.

Un aspecto adicional de la invención, por lo tanto, se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de la variante hipoalérgica de la invención, opcionalmente junto con otros alérgenos naturales o modificados de *Parietaria judaica*, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.

En una realización preferida, dicha composición farmacéutica es una vacuna para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades alérgicas, tales como asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis alérgica, conjuntivitis alérgica. Los principios y práctica de la vacunación son bien conocidos para los especialistas en la técnica y se describen, por ejemplo, en (7) y (8).

Los siguientes ejemplos ilustran la invención en mayor detalle.

Los procedimientos usados en los siguientes ejemplos, si no se especifica de otro modo, son los descritos por 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 el alérgeno Par j 2

La mutagénesis específica de sitio del ADNc que codifica el alérgeno Par j 2 se realiza por amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) del mismo ADNc clonado en un vector procariota (pBluescript).

Los oligonucleótidos usados como cebador para la reacción de PCR tienen las sustituciones de bases necesarias. Para cada mutagénesis se ha usado un par de complementariedad de dichos oligonucleótidos, que se une a regiones correspondientes de las cadenas de ADN. Después de la amplificación, el molde original sin cambiar se degrada selectivamente por digestión enzimática catalizada por la enzima de restricción Dpn I. Después se transforman células de *Escherichia coli* con las moléculas mutagenizadas. Los clones obtenidos de las colonias bacterianas individuales se secuencian de acuerdo con el procedimiento de Sanger para verificar la modificación correcta de las bases y la ausencia de mutaciones no específicas del ADNc.

Ejemplo 2

Producción de la proteína Par j 2 y de las variantes de la misma

Se expresa el ADNc normal de Par j 2 y el ADNc mutagenizado, después de la clonación en un vector de expresión (pCALn - Stratagene), en células de *Escherichia coli* de acuerdo con protocolos convencionales. Las células se recogen por centrifugación y se resuspenden en tampón PBS. Las proteínas recombinantes se aíslan después de lisis de las células bacterianas por sonicación y retirada de los particulados celulares por centrifugación. Las proteínas se

ES 2 286 150 T3

purifican del sobrenadante por cromatografía de afinidad, usando columnas en las que la matriz está unida a la proteína calmodulina, que interacciona con la parte CBP (Proteína de Unión a Calmodulina) fusionada al alérgeno.

Ejemplo 3

Ensayo por transferencia de Western de la alergenicidad de las variantes de Par j 2

Se analizan cantidades iguales del alérgeno recombinante y de la variante mutagenizada por electroforesis en gel de poliacrilamida y posteriormente se transfieren a una membrana de nitro-celulosa por electrotransferencia, de acuerdo con la técnica descrita por Towbin (6).

La membrana se incuba durante una hora en TBS que contiene un 5% de leche en polvo (tampón de saturación) después durante una noche con sueros individuales de pacientes alérgicos a *Parietaria* (RAST 3+ y 4+). Después de tres lavados con TBS que contiene Tween-20 al 0,05%, se detectan los anticuerpos IgE unidos a la membrana por incubación durante una hora con antisuero anti-IgE humana conjugado con peroxidasa y, después de lavados adicionales, con el sistema de detección basado en el uso de una solución de DAB (diaminobencidina) que contiene H₂O₂ como sustrato para la peroxidasa.

Ejemplo 4

Ensayo ELISA para la reactividad a IgE de las variantes Par j 2

Se adsorben cantidades iguales (0,2 µg) de alérgeno normal y de sus variantes mutagenizadas, en tampón carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6, en pocillos de placas de poliestireno para ensayos ELISA por incubación a 4°C durante 16 horas. Los antígenos después se lavan con solución de lavado (tampón fosfato 60 mM pH 6,5 que contiene Tween-20 al 0,05%) y se saturan los sitios libres con solución diluyente (suero de caballo al 25%, EDTA 1 mM, Tween 20 al 0,05%, Tiomersal al 0,01% en tampón fosfato 150 mM pH 7,4). Se preparan diluciones en serie de combinaciones de suero humano con reactividad RAST 4+ en una proporción 1:2 en tampón diluyente. Se añaden cantidades iguales (100 µl) de las diversas diluciones de suero a cada muestra y se incuban a 25°C durante 2 horas. Después de tres lavados, se añade el antisuero anti-IgE humana conjugado con peroxidasa diluido 1:1500 en tampón diluyente, y se incuba a 25°C durante 1,5 horas. Después de tres lavados, se revela la reacción colorimétrica por la adición de 100 µl de reactivo Ultra Blu (Intergen, Milford, MA) e incubación durante 15 minutos a 25°C. La reacción se detiene por la adición de 100 µl de HCl 1 N y se evalúa a 450 nm con un espectrofotómetro.

Referencias

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.

3) **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 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., 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.

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) **Towbin J., Staehelin T., Gordon J., (1979)**. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350-4354.

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

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

ES 2 286 150 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína Par j 2 que tiene la secuencia de la SEC ID N° 2, en la que está presente un resto de Lys en las posiciones 19, 23, 27, 35, 41, 46, 73 y 78, en la que al menos uno de dichos restos de Lys está sustituido y/o delecionado, teniendo dicha proteína efecto alergénico reducido.
2. La proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichos restos están sustituidos con aminoácidos neutros o polares.
- 10 3. La proteína de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en la que dichas sustituciones se seleccionan entre Gln19, Ala23, Ala27, Gly35, Ala41, Ala46, Gly73 y Ser78.
4. La proteína de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, que tiene la secuencia de la SEC ID N° 2.
- 15 5. La proteína de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, que alberga las sustituciones Gln19, Ala23, Ala27, Ala41 y Ala46 (SEC ID N° 3).
6. Un péptido que comprende una parte inmunológicamente activa de la proteína de las reivindicaciones 1-5, en el que está presente al menos una sustitución/delección de acuerdo con la reivindicación 1.
- 20 7. Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de acuerdo con las reivindicaciones 1-5 o un péptido de acuerdo con la reivindicación 6.
- 25 8. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, de la secuencia SEC ID N° 1.
9. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 7-8.
10. Un célula huésped transducida con el vector de la reivindicación 9.
- 30 11. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una proteína de acuerdo con las reivindicaciones 1-5 o de un péptido de acuerdo con la reivindicación 6 junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.
12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11, en forma de una vacuna.

35

40

45

50

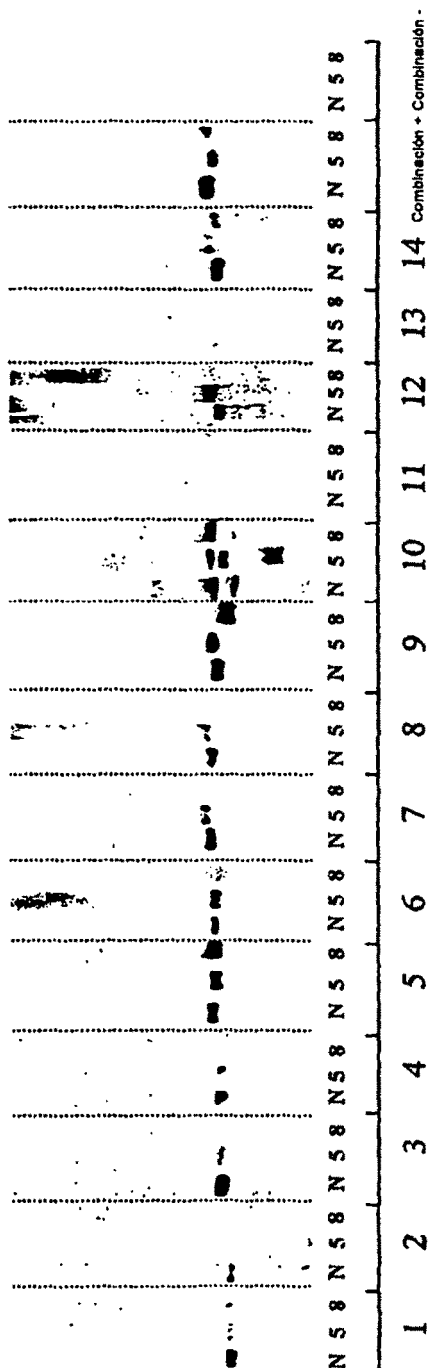
55

60

65

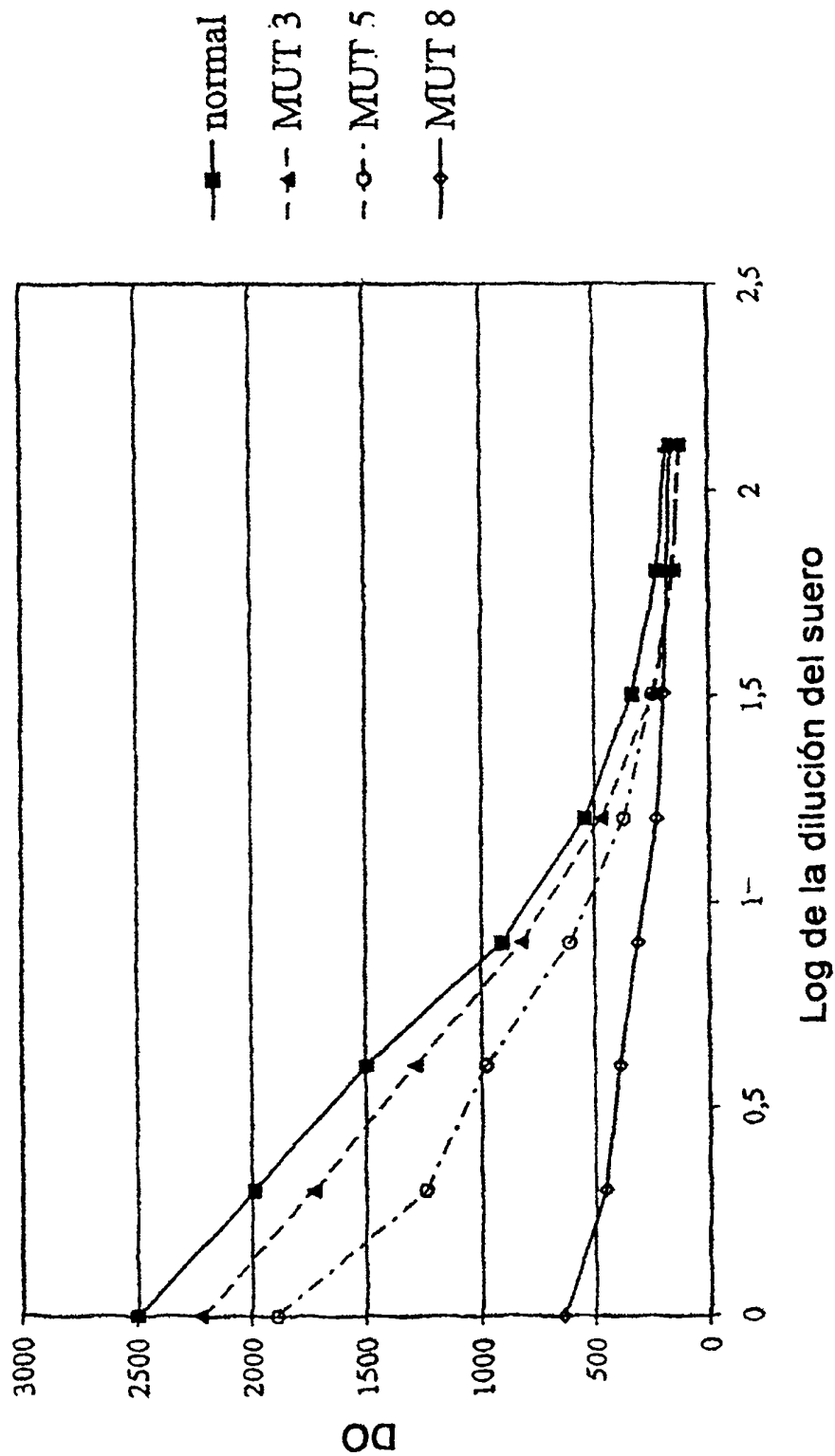
Figura 1

Reactividad alérgica IgE de Par j 2 y de dos variantes modificadas



N: Par j 2 recombinante normal
 5: Par j 2 con 5 modificaciones aminoacídicas: Gln19, Ala23, Ala27, Ala41, Ala46.
 8: Par j 2 con 8 modificaciones aminoacídicas: Gln19, Ala23, Ala27, Gly35, Ala41, Ala46, Gly73, Ser78.
 1-14: sueros individuales de sujetos alérgicos a Parietaria
 Combinación+: sueros positivos a la combinación
 Combinación-: sueros negativos a la combinación

Figura 2
Análisis de la reactividad IgE de las variantes del alérgeno Par j 2



ES 2 286 150 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

5 <120> VARIANTES DEL ALERGENO PRINCIPAL PAR J 2 DE *PARIETARIA JUDAICA*

<130> cnr

10 <140>

<141>

<160> 3

15

<170> PatentIn Ver. 2,1

<210> 1

20

<211> 306

<212> ADN

<213> *Parietaria judaica*

25

<400> 1

30 **gaggaggctt gcgggaaagt ggtgcaggat ataatgccgt gctgcattt cgtgcagggg 60**
gaggaggcgg agccgtcggc ggagtgctgc agcggcacga aggggctgag cgaggagggtg 120
gcgacgacgg agcagggcgg ggaggcctgc aagtgcatag tgcgcgccac gaagggcatc 180
tccggtatca aaaatgaact tgtcgccgag gtccccggga agtgcgatat tagcaccact 240
ctcccgccca tcaccgccga cttcgactgc tccaagatcc aaagtactat tttcagagggt 300
tactat 306

35

<210> 2

<211> 102

40

<212> PRT

<213> *Parietaria judaica*

45

50

55

60

65

ES 2 286 150 T3

<400> 2

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

 Phe Val Gln Gly Glu Glu Ala Glu Pro Ser Ala Glu Cys Cys Ser Gly
 20 25 30

10 Thr Lys Gly Leu Ser Glu Glu Val Ala Thr Thr Glu Gln Ala Arg Glu
 35 40 45

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

20 Asn Glu Leu Val Ala Glu Val Pro Gly Lys Cys Asp Ile Ser 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

25

 Ile Phe Arg Gly Tyr Tyr
 100

<210> 3

<211> 102

<212> PRT

<213> *Parietaria judaica*

<400> 3

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

45 Phe Val Gln Gly Glu Glu Ala Glu Pro Ser Ala Glu Cys Cys Ser Gly
 20 25 30

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

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

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

65 Ile Phe Arg Gly Tyr Tyr
 100