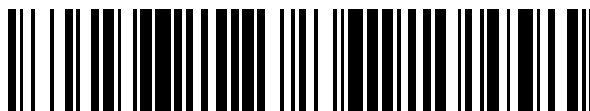


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 618**

51 Int. Cl.:
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04803420 .1**
96 Fecha de presentación: **01.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1709064**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.10.2006**

54 Título: **SECUENCIA DE ADN Y PREPARACIÓN RECOMBINANTE DE ALÉRGENO DEL POLEN DE GRAMÍNEAS LOL P 4.**

30 Prioridad:
16.12.2003 DE 10359352

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.03.2012

73 Titular/es:
**MERCK PATENT GMBH
FRANKFURTER STRASSE 250
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:
**FIEBIG, Helmut;
NANDY, Andreas y
CROMWELL, Oliver**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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).

ES 2 375 618 T3

DESCRIPCIÓN

Secuencia de ADN y preparación recombinante del alérgeno del polen de gramíneas lol p 4

Antecedentes de la invención

- 5 La presente invención se refiere a la preparación de una secuencia de ADN del alérgeno mayor de polen de gramíneas Lol p 4. La invención incluye también fragmentos y nuevas combinaciones de secuencias parciales. Las moléculas de ADN recombinante y los polipéptidos derivados, fragmentos y nuevas combinaciones de secuencias parciales se pueden utilizar para la terapia de enfermedades de alergia al polen. Las proteínas recombinantes preparadas se pueden emplear para el diagnóstico *in vitro* e *in vivo* de alergias al polen.
- 10 Las alergias del tipo 1 tienen importancia en todo el mundo. Hasta un 20% de la población de los países industrializados sufre de dolencias como rinitis alérgica, conjuntivitis o asma bronquial. Estas alergias son provocadas por alérgenos presentes en el aire (aeroalérgenos), que son liberados por fuentes de diferente procedencia, como polen de plantas, ácaros, gatos o perros. Hasta el 40% de estos alérgicos de tipo 1 muestran además reactividad IgE específica con alérgenos del polen de gramíneas (Freidhoff y col., 1986, J. Allergy Clin. Immunol. 78, 1190-2001).
- 15 Las sustancias desencadenantes de las alergias de tipo 1 son proteínas, glicoproteínas o polipéptidos. En personas sensibilizadas, tras la absorción a través de las mucosas estos alérgenos reaccionan con las moléculas IgE que están unidas a la superficie de los mastocitos. Cuando dos moléculas de IgE se enlazan a través de un alérgeno se produce la liberación de mediadores (p. ej., histamina, prostaglandinas) y citoquinas mediante las células efectoras y con ello se desencadenan los correspondientes síntomas clínicos.
- 20 Dependiendo de la frecuencia relativa con la que las moléculas de alérgeno individuales reaccionan con los anticuerpos IgE de los alérgicos, se diferencia entre alérgenos mayores y menores.
- 25 Para el ballico (*Lolium perenne*) se identificó Lol p 1 como un alérgeno mayor (Freidhoff y col., 1986, J. Allergy Clin. 78:1190-1201) y se resolvió su estructura primaria (Perez y col., 1990, J. Biol. Chem. 265:16210-16215). Otro alérgeno mayor es Lol p 2 (Freidhoff y col., 1986, J. Allergy Clin. 78:1190-1201) cuya estructura primaria se describió en 1993 (Ansari y col., 1989, J. Biol. Chem.: 264:11181-11185). Otro alérgeno mayor del ballico es Lol p 5 (Mattiesen y Löwenstein 1991, Clin. Exp. Allergy 21: 297-307). La estructura primaria de Lol p 5 también es conocida (Ong y col., 1993, Gene 134:235-240).
- El ballico contiene además los alérgenos mayores de los grupos 4 (Fahlbusch y col. 1998, Clin. Exp. Allergy 28: 799-807) y 13 (Petersen y col., 2001, J. Allergy Clin. Imm. 107:856-862).
- 30 Lol p 4 es una glicoproteína típica básica (Jaggi y col., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89:342-348, Jaggi y col., 1989, J. Allergy Clin. Immunol. 83:845-852) y en lo referente a la actividad cruzada con anticuerpos IgE específicos se compara con las bien conocidas Phl p 4, Cyn d 4 y Dac g 4 (Haavik y col., 1985, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 78:260-268; Su y col., 1991, Clin. Exp. Allergy 21:449-455; Leduc-Brodard y col., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98:1065-1072; 14-17).
- 35 Estas moléculas homólogas de *Poaceae* forman el grupo 4 de alérgenos, cuyas moléculas presentan entre sí una alta reactividad inmunológica cruzada, tanto con anticuerpos monoclonales de ratón como con anticuerpos IgE humanos (Fahlbusch y col., 1993 Clin. Exp. Allergy 23:51-60; Leduc-Brodard y col., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98:1065-1072; Su y col., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 97:210; Fahlbusch y col., 1998, Clin. Exp. Allergy 28:799-807; Gavrovic-Jankulovic y col., 2000, Invest. Allergol. Clin. Immunol. 10 (6):361-367; Stumvoll y col. 2002, Biol. Chem. 383:1383-1396; Grote y col., 2002, Biol. Chem. 383:1441-1445; Andersson y Lidholm, 2003, Int. Arch. Allergy Immunol. 130:87-107; Mari, 2003, Clin. Exp. Allergy, 33 (1):43-51).
- 40 Al contrario de los alérgenos mayores mencionados previamente Lol p 1, Lol p 2, Lol p 5 de *Lolium perenne*, la estructura primaria de Lol p 4 aún no está resuelta.
- De los alérgenos del grupo 4 de *Dactylus glomerata* hasta ahora solamente se han obtenido por degradación enzimática y se han secuenciado los péptidos:
- 45 DIYNYMEPYVSK (SEC ID N° 7),
VDPTDYFGNEQ (SEC ID N° 8),
ARTAWVDSGAQLGELSY (SEC ID N° 9),

y GVLFNIQYVNYWFAP (SEC ID Nº 10, Leduc-Brodard y col., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 1065-1072).

También se han obtenido por proteólisis y se han secuenciado péptidos de los alérgenos del grupo 4 de la gramínea subtropical Bermuda (*Cynodon dactylon*):

KTVKPLYIITP (SEC ID Nº 11),

5 KQVERDFTSLTKDIPQLYLKS (SEC ID Nº 12),

TVKPLYIITPITAAMI (SEC ID Nº 13),

LRKYGTAADNVIDAKVVDAQGRLL (SEC ID Nº 14),

KWQTVAPALPDPNM (SEC ID Nº 15),

VTWIESVPYIPMGDK (SEC ID Nº 16),

10 GTVRDLLXRTSNIKAFGKY (SEC ID Nº 17),

TSNIKAFGKYKSDYVLEIPKKS (SEC ID Nº 18),

YRDLDLGVNQVVG (SEC ID Nº 19),

SATPPTHRSGVLFNI (SEC ID Nº 20),

15 y AAAALPTQVTRDIYAFMTPYVSKNPRQAYVNYRDL (SEC ID Nº 21, Liaw y col., 2001, Biochem. Biophys. Research Communication 280: 738-743).

Para *Lolium perenne* se describieron fragmentos de péptidos de alérgenos básicos del grupo 4 con las secuencias siguientes: FLEPVLGLIFPAGV (SEC ID Nº 22) y GLIEFPAGV (SEC ID Nº 23, Jaggi y col., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89: 342-348).

20 Sin embargo, estas secuencias peptídicas descritas para *Lolium perenne* y otros alérgenos del grupo 4 no han conducido hasta ahora a la resolución de la estructura primaria del alérgeno Lol p 4.

Como primera secuencia de un alérgeno del grupo 4 se ha resuelto por parte del inventor de la presente solicitud de patente la secuencia aún no publicada de Phl p 4 de *Phleum pratense* y se ha descrito en la solicitud internacional WO 04/000881.

25 El objetivo en el que se basa la presente invención consiste por tanto en la preparación de una secuencia de ADN del gen Lol p 4 que codifica para un alérgeno con las propiedades inmunológicas de Lol p 4, así como un ADN recombinante correspondiente, sobre cuya base el alérgeno se exprese como proteína y se pueda hacer disponible un uso farmacológico significativo como tal o en forma modificada. La secuencia de Phl p 4 fue el punto de partida para la presente invención.

Índice de secuencias según la invención

30 - Secuencia de ADN del gen Lol p 4 (SEC ID Nº 1).

- Secuencia de proteína (SEC ID Nº 2) derivada de la secuencia de ADN según SEC ID Nº 1.

- Secuencia de ADN (SEC ID Nº 3), compuesta por los nucleótidos 1- 200 de Phl p 4 (según SEC ID Nº 5), 201-1472 de Lol p 4 (según SEC ID Nº 1) así como 1473-1503 de Phl p 4 (según SEC ID Nº 5).

35 - Secuencia de proteínas (SEC ID Nº 4), compuesta por los aminoácidos 1-67 de Phl p 4 (según SEC ID Nº 6), 68-490 de Lol p 4 (según SEC ID Nº 2) así como 491-500 de Phl p 4 (según SEC ID Nº 6) con las propiedades, en particular las propiedades inmunológicas de Lol p 4, codificada por la secuencia de ADN según SEC ID Nº 3.

- Secuencia de ADN de Phl p 4 (SEC ID Nº 5) según SEC ID Nº 5 del documento WO 04/000881.

- Secuencia de proteínas de Phl p 4 (SEC ID Nº 6) según SEC ID Nº 6 del documento WO 04/000881.

Descripción de la invención

Con la presente invención se proporciona por primera vez una secuencia de ADN del alérgeno mayor del polen de gramíneas Lol p 4 (SEC ID N° 1) que codifica para un alérgeno con las propiedades inmunológicas de Lol p 4.

5 Por consiguiente, es objeto de la presente invención una molécula de ADN que codifica para un alérgeno con las propiedades de Lol p 4, correspondiente a una secuencia de nucleótidos según SEC ID N° 1.

Además, es objeto de la invención una molécula de ADN que codifica para un alérgeno con las propiedades de Lol p 4, correspondiente a una secuencia de nucleótidos SEC ID N° 3, compuesto por los nucleótidos 1-201 de Phl p 4 (según SEC ID N° 5), 202-1470 de Lol p 4 (según SEC ID N° 1) así como 1471-1500 de Phl p 4.

10 Con el conocimiento de la secuencia de ADN de los alérgenos que existen en la naturaleza ahora sólo es posible preparar estos alérgenos como proteínas recombinantes, que se pueden emplear en el diagnóstico y la terapia de enfermedades alérgicas (Scheiner y Kraft, 1995, Allergy 50: 384-391).

15 La inmunoterapia específica o hiposensibilización representa una aproximación clásica al tratamiento terapéutico eficaz de las alergias (Fiebig, 1995, Allergy J. 4 (6): 336-339, Bousquet y col., 1998, J. Allergy Clin. Immunol. 102(4): 558-562). Así, se inyectan de forma subcutánea a los pacientes extractos de alérgenos naturales en dosis crecientes. No obstante, con este método existe el peligro de reacciones alérgicas o incluso de un choque anafiláctico. Para minimizar estos riesgos se emplean preparados innovadores en forma de alergoides. Se trata de extractos de alérgenos modificados químicamente que presentan una reactividad IgE claramente reducida, aunque presentan idéntica reactividad frente a células T en comparación con el extracto no tratado (Fiebig, 1995, Allergy J. 4 (7): 377-382).

20 Sería posible una optimización aún más amplia de la terapia con alérgenos preparados de forma recombinante. Cócteles definidos, dado el caso basados en el patrón de sensibilización individual del paciente, de alérgenos recombinantes de elevada pureza podrían reemplazar a los extractos de fuentes de alérgenos naturales, ya que éstos, aparte de los diferentes alérgenos, contienen una gran cantidad de proteínas acompañantes inmunogénicas pero no alergénicas.

25 Perspectivas realistas, que podrían conducir a una hiposensibilización segura con productos de expresión, ofrecen alérgenos recombinantes mutados dirigidos en los cuales se han eliminado de forma específica epítopos IgE, sin perjudicar a los epítopos de células T esenciales para la terapia (Schramm y col., 1999, J. Immunol. 162: 2406-2414).

30 Otra posibilidad de influir terapéuticamente en el equilibrio alterado de las células TH en los alérgicos es la vacunación inmunoterapéutica con ADN. Se trata de un tratamiento con ADN con capacidad de expresión que codifica para los alérgenos relevantes. Las primeras pruebas experimentales de la influencia alergenoespecífica de la respuesta inmune se obtuvieron en roedores mediante la inyección de ADN codificante de alérgeno (Hsu y col., 1996, Nature Medicine 2 (5): 540-544).

Por consiguiente, también es objeto de la presente invención una molécula de ADN descrita previamente o a continuación, o un vector de expresión recombinante correspondiente como medicamento.

Las correspondientes proteínas preparadas de forma recombinante se pueden emplear para la terapia y para el diagnóstico *in vitro* e *in vivo* de alergias al polen.

35 Para la preparación del alérgeno recombinante, el ácido nucleico clonado se liga a un vector de expresión y esta construcción se expresa en un organismo huésped apropiado. Tras la purificación bioquímica, se obtiene este alérgeno recombinante para la detección de anticuerpos IgE en procedimientos establecidos.

40 Por consiguiente, también es objeto de la presente invención un vector de expresión recombinante que contiene una molécula de ADN descrita previamente o a continuación, unida funcionalmente con una secuencia control de expresión y un organismo huésped, transformado con la molécula de ADN indicada o el vector de expresión indicado.

Asimismo, es objeto de la invención el uso de al menos una molécula de ADN descrita anteriormente o al menos un vector de expresión descrito anteriormente para la preparación de un medicamento para la vacunación inmunoterapéutica con ADN de pacientes con alergias en cuya activación están implicados alérgenos del grupo 4 de *Poaceae*, en particular Lol p 4, y/o para la prevención de dichas alergias.

45 Como ya se ha mencionado la invención se puede emplear como un componente esencial en un preparado que contiene alérgenos o ácidos nucleicos recombinantes para la inmunoterapia específica. Así, se presentan varias posibilidades. Por un lado, la proteína no modificada en la estructura primaria puede formar parte del preparado. Por otro lado, mediante la delección dirigida de epítopos IgE de la molécula completa o mediante la preparación de fragmentos individuales que codifican para epítopos de células T, se emplea para la terapia según la invención una forma

(alergoide) hipoalérgica para evitar efectos secundarios no deseados. Finalmente, mediante el propio ácido nucleico, cuando éste se liga con un vector de expresión eucariótico, se consigue un preparado que aplicado directamente modifica el estado inmune alérgico en el sentido terapéutico.

Además, la presente invención trata de polipéptidos que codifican para una o varias de las moléculas de ADN descritas anteriormente, preferentemente en su calidad como medicamentos.

Los polipéptidos son una proteína correspondiente a una secuencia de aminoácidos según SEC ID N° 2 o una proteína que contiene esta secuencia de aminoácidos o una parte de esta secuencia, con las propiedades, en particular las propiedades inmunológicas de Lol p 4, así como una proteína correspondiente a una secuencia de aminoácidos según SEC ID N° 4 con las propiedades, en particular las propiedades inmunológicas de Lol p 4.

Además, la invención se refiere también a un procedimiento para la preparación de dichos polipéptidos mediante el cultivo de un organismo huésped y la obtención de los correspondientes polipéptidos a partir del cultivo.

También según la invención se emplea al menos un polipéptido o proteína descritos anteriormente para la preparación de un medicamento para el diagnóstico y/o tratamiento de alergias en cuya activación están implicados alérgenos del grupo 4 de *Poaceae*, en particular Lol p 4, así como para la prevención de dichas alergias.

Para la determinación de las secuencias de proteínas y ADN de Lol p 4 según la invención se procedió como sigue:

La secuencia de ADN de Lol p 4 según la invención según SEC ID N° 1 se amplificó, clonó y secuenció mediante PCR con cebadores específicos (Tab. 1), derivados de la secuencia Phl p 4, según SEC ID N° 5, como se describe en el documento WO 04/000881. En total se analizaron 7 clones. El análisis de los clones dio como resultado una secuencia unitaria. Se obtuvieron tres secuencias de ADN de Lol p 4 mediante PCR con los cebadores #87 y #83. La secuencia de ADN de Lol p 4 amplificada con estos cebadores codifica para los correspondientes aminoácidos 68-401, referidos a la numeración de Phl p 4 madura según SEC ID N° 6. Se obtuvieron otros dos clones mediante PCR con los cebadores #87 y #189. La secuencia de ADN de Lol p 4 amplificada con estos cebadores codifica también para los correspondientes aminoácidos 68-490 (numeración correspondiente a la secuencia de Phl p 4). Dos clones se obtuvieron mediante PCR con los cebadores #87 y #131. La secuencia de ADN de Lol p 4 amplificada codifica también para los correspondientes aminoácidos 68-490 (numeración correspondiente a la secuencia de Phl p 4). Los cebadores #131 y #189 corresponden a los codones para los últimos 10 aminoácidos de la proteína Phl p 4 y sobrepasan el codón de parada.

La secuencia de ADN según la invención según SEC ID N° 3 se obtuvo por métodos conocidos (técnica de PCR con cebadores solapados).

Para la preparación de los alérgenos recombinantes según la invención se construyeron secuencias de ADN según SEC ID N° 1 o 3 en vectores de expresión (p. ej., pProEx, pSE 380). Para los aminoácidos N-terminales conocidos a partir de la secuenciación de la proteína se emplearon codones optimizados de *E. coli*.

Tras la transformación en *E. coli*, la expresión y la purificación del alérgeno recombinante según la invención mediante diferentes técnicas de separación, la proteína obtenida se sometió a un proceso de replegado.

Ambos alérgenos se pueden emplear para el diagnóstico altamente específico de alergias al polen de gramíneas. Este diagnóstico se puede realizar *in vitro* mediante la detección de anticuerpos específicos (IgE, IgG1 - 4, IgA) y la reacción con células efectoras cargadas con IgE (p. ej., basófilos de la sangre) o *in vivo* mediante reacciones de ensayos en la piel y provocación en el órgano de reacción.

La reacción de los alérgenos según la invención con linfocitos T de alérgicos al polen de gramíneas se puede comprobar mediante la estimulación alérgeno-específica de los linfocitos T para la proliferación y síntesis de citoquina, tanto con células T en linfocitos sanguíneos de preparación reciente como en líneas y clones de células T establecidas reactivas frente a nLol p 4.

Mediante mutagénesis dirigida al sitio se modificaron los tripletes codificantes para la cisteína, de manera que codifican para otros aminoácidos, preferentemente serina. Se prepararon variantes, tanto en las que se reemplazaron cisteínas individuales como aquellas en las que se modificaron diferentes combinaciones de 2 restos cisteína o todas las cisteínas. Las proteínas expresadas de estos mutantes puntuales de cisteína presentan una reactividad fuertemente reducida o inexistente con anticuerpos IgE de alérgicos, aunque reaccionan con los linfocitos T de estos pacientes.

Por consiguiente, también es objeto de la presente invención una molécula de ADN descrita previamente o a continuación, en la que mediante mutagénesis dirigida al sitio, varios o todos los restos cisteína del polipéptido correspondiente se intercambiaron por otro aminoácido.

La actividad inmunomoduladora de los fragmentos hipoalergénicos que corresponden a polipéptidos con epítomos de células T, así como la de los intercambios de cisteína hipoalergénicos, se puede comprobar mediante su reacción con las células T de los alérgicos al polen de gramíneas.

- 5 Dichos fragmentos o mutaciones puntuales de cisteína hipoalergénicos se pueden emplear como preparados para la hiposensibilización de alérgicos, ya que reaccionan con la misma eficacia con las células T, aunque a causa de la reducida o inexistente reactividad IgE ocasionan pocos efectos secundarios producidos por IgE.

Si los ácidos nucleicos que codifican para las variantes de alérgenos hipoalergénicos según la invención o las moléculas de ADN no modificadas según la invención se ligan con un vector de expresión humano, estas construcciones se pueden emplear también como preparados para una terapia inmune (vacunación con ADN).

- 10 Finalmente, son objeto de la presente invención las preparaciones farmacéuticas que contienen al menos una molécula de ADN descrita anteriormente o al menos un vector de expresión descrito anteriormente y dado el caso otros principios activos y/o coadyuvantes para la vacunación inmunoterapéutica con ADN de pacientes con alergias, en cuya activación están implicados alérgenos del grupo 4 de *Poaceae*, en particular Lol p 4, y/o para la prevención de dichas alergias.

- 15 Otro grupo de preparaciones farmacéuticas según la invención, en lugar de ADN contiene al menos un polipéptido descrito anteriormente y es adecuado para el diagnóstico y/o tratamiento de las alergias indicadas.

- 20 Las preparaciones farmacéuticas en el sentido de la presente invención contienen como principio activo un polipéptido según la invención o un vector de expresión y/o sus respectivos derivados de uso farmacéutico, incluidas sus mezclas en todas las proporciones. Así, los principios activos según la invención pueden mezclarse con al menos un excipiente o coadyuvante sólido, líquido y/o semilíquido y, dado el caso, combinarse con uno o varios principios activos diferentes en una forma de dosificación adecuada.

Como coadyuvantes son particularmente apropiados el ADN inmunoestimulante u oligonucleótidos con motivos CpG.

- 25 Estas preparaciones se pueden emplear como agentes terapéuticos o diagnósticos en medicina humana o veterinaria. Como excipientes entran en consideración sustancias orgánicas o inorgánicas apropiadas para la aplicación parenteral y que no influyen negativamente en el efecto del principio activo según la invención. Para la aplicación parenteral se emplean en particular soluciones, preferiblemente soluciones oleosas o acuosas, otras suspensiones, emulsiones o implantes. El principio activo según la invención también se puede liofilizar y los liofilizados obtenidos se pueden emplear, por ejemplo, para la preparación de preparados inyectables. Las preparaciones indicadas se pueden esterilizar y/o pueden contener coadyuvantes como conservantes, estabilizantes y/o humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, sustancias tampón y/o varios principios activos distintos.

- 30 Además, mediante la formulación correspondiente del principio activo según la invención se pueden obtener preparados de depósito, por ejemplo mediante adsorción en hidróxido de aluminio.

Por tanto, la invención también sirve para mejorar el diagnóstico *in vitro* en el marco de una identificación de componentes alérgenos activadores del espectro de sensibilización específico de los pacientes. La invención sirve también para la preparación de preparados claramente mejorados para la inmunoterapia específica de alergias al polen de gramíneas.

- 35 **Tabla 1 Cebadores empleados**

Cebador nº	SEC ID N°	Secuencia
#83	24	GGCTCCCGGGCGAACCAGTAG
#87	25	ACCAACGCCTCCACATCCAGTC
#131	26	GATAAGCTTGAATTCTGATTAGTACTTTTTGATCAGC GGCGGGATGCTC
#189	27	GATAAGCTTCTCGAGTGATTAGTACTTTTTGATCAGC GGCGGGATGCTC

Protocolo de secuencia

<110> Merck Patent GmbH

<120> Secuencia de ADN y preparación recombinante del alérgeno del polen de gramíneas Lol p 4

<130> P 03/240

<140> DE 10359352.7

<141> 2003-12-16

<160> 27

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1272

<212> **ADN**

<213> Lol p 4

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(1270)

<223>

<400> 1
t gcc gtg gtg tgc ggc cgc cgt tac gac gtc cgc atc cgc gta cgc agc 49
Ala Val Val Cys Gly Arg Arg Tyr Asp Val Arg Ile Arg Val Arg Ser
1 5 10 15
ggc ggg cac gac tac gag ggc ctc tcg tac cgc tcc ctg cag ccc gag 97
Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gln Pro Glu
20 25 30
aac ttc gca gtc gtc gac ctc aac cag atg cgg gcg gtg ttg gtg gac 145

ES 2 375 618 T3

Asn	Phe	Ala	Val	Val	Asp	Leu	Asn	Gln	Met	Arg	Ala	Val	Leu	Val	Asp	
		35					40					45				
ggt	aag	gcc	cgc	acg	gcg	tgg	gtc	gac	tcc	ggc	gcg	cag	ctc	ggc	gag	193
Gly	Lys	Ala	Arg	Thr	Ala	Trp	Val	Asp	Ser	Gly	Ala	Gln	Leu	Gly	Glu	
	50					55				60						
ctc	tac	tac	gcc	atc	tcc	aag	tat	agc	cgc	acg	ctg	gcc	ttc	ccg	gca	241
Leu	Tyr	Tyr	Ala	Ile	Ser	Lys	Tyr	Ser	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Pro	Ala	
65					70				75						80	
ggc	gtt	tgc	ccg	acc	atc	ggc	gtg	ggc	ggc	aac	ctc	gcg	ggc	ggc	ggc	289
Gly	Val	Cys	Pro	Thr	Ile	Gly	Val	Gly	Gly	Asn	Leu	Ala	Gly	Gly	Gly	
				85				90					95			
ttc	ggt	atg	ctg	ctg	cgc	aag	tac	ggc	atc	gcc	gca	gag	aac	gtc	atc	337
Phe	Gly	Met	Leu	Leu	Arg	Lys	Tyr	Gly	Ile	Ala	Ala	Glu	Asn	Val	Ile	
			100					105					110			
gac	gtg	aag	ctc	gtc	gac	gcc	aac	ggc	aag	ctg	cac	gac	aag	aag	tcc	385
Asp	Val	Lys	Leu	Val	Asp	Ala	Asn	Gly	Lys	Leu	His	Asp	Lys	Lys	Ser	
		115					120					125				
atg	ggc	gac	gac	cat	ttc	tgg	gcc	gtg	agg	ggt	ggc	ggc	ggc	gag	agc	433
Met	Gly	Asp	Asp	His	Phe	Trp	Ala	Val	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Ser	
	130					135					140					
ttc	ggc	atc	gtg	gtc	tcg	tgg	cag	gtg	aag	ctc	ctg	ccg	gtg	cct	ccc	481
Phe	Gly	Ile	Val	Val	Ser	Trp	Gln	Val	Lys	Leu	Leu	Pro	Val	Pro	Pro	
145					150				155						160	
acg	gtg	acc	atc	ttc	aag	atc	ccc	aag	tca	gtc	agc	gag	ggc	gcc	gtg	529
Thr	Val	Thr	Ile	Phe	Lys	Ile	Pro	Lys	Ser	Val	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	
			165					170					175			
gac	atc	atc	aac	aag	tgg	caa	ctg	gtc	gcg	cct	caa	ctt	ccc	gcc	gac	577
Asp	Ile	Ile	Asn	Lys	Trp	Gln	Leu	Val	Ala	Pro	Gln	Leu	Pro	Ala	Asp	
			180				185						190			
ctc	atg	atc	cgc	atc	att	gcg	atg	ggg	ccc	aag	gcc	acg	ttc	gag	gcc	625
Leu	Met	Ile	Arg	Ile	Ile	Ala	Met	Gly	Pro	Lys	Ala	Thr	Phe	Glu	Ala	
		195					200					205				
atg	tac	ctc	ggc	acc	tgc	aaa	acc	ctg	acg	ccg	atg	atg	cag	agc	aag	673
Met	Tyr	Leu	Gly	Thr	Cys	Lys	Thr	Leu	Thr	Pro	Met	Met	Gln	Ser	Lys	
	210					215					220					
ttc	ccc	gag	ctt	ggc	atg	aac	gcc	tcg	cac	tgc	aac	gag	atg	tca	tgg	721
Phe	Pro	Glu	Leu	Gly	Met	Asn	Ala	Ser	His	Cys	Asn	Glu	Met	Ser	Trp	
225					230					235					240	
atc	gag	tcc	atc	ccc	ttc	gtc	cac	ctc	ggc	cat	agg	gat	tcc	ctg	gag	769
Ile	Glu	Ser	Ile	Pro	Phe	Val	His	Leu	Gly	His	Arg	Asp	Ser	Leu	Glu	
				245					250					255		
ggc	gac	ctc	ctc	aac	cgg	aac	aac	acc	ttc	aag	ccc	ttt	gcg	gag	tac	817
Gly	Asp	Leu	Leu	Asn	Arg	Asn	Asn	Thr	Phe	Lys	Pro	Phe	Ala	Glu	Tyr	
			260					265					270			
aaa	tcg	gac	tac	gtc	tac	gag	cca	ttc	ccc	aag	agc	gtg	tgg	gag	cag	865
Lys	Ser	Asp	Tyr	Val	Tyr	Glu	Pro	Phe	Pro	Lys	Ser	Val	Trp	Glu	Gln	
		275					280						285			

ES 2 375 618 T3

atc ttc ggc acc tgg ctc gtg aag cct ggt gcg ggg att atg atc ttt Ile Phe Gly Thr Trp Leu Val Lys Pro Gly Ala Gly Ile Met Ile Phe 290 295 300	913
gac ccc tac ggt gcc acc atc agc gct acc cca gaa gcg gcg acg ccg Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Ala Ala Thr Pro 305 310 315 320	961
ttc cct cac cgc aag gga gtc ctc ttc aac atc cag tac gtc aac tac Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr Val Asn Tyr 325 330 335	1009
tgg ttc gct ccg gga gcc ggc gcc gcg ccc ttg tca tgg agc aag gaa Trp Phe Ala Pro Gly Ala Gly Ala Ala Pro Leu Ser Trp Ser Lys Glu 340 345 350	1057
atc tac aac tac atg gag ccg tac gtg agc aag aac ccc agg cag gcc Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro Arg Gln Ala 355 360 365	1105
tac gcc aac tac agg gac atc gac ctc ggg agg aac gag gtg gtg aat Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu Val Val Asn 370 375 380	1153
ggc gtc tcc acc tac agc agt ggt aag gtc tgg gga cag aaa tat ttc Gly Val Ser Thr Tyr Ser Ser Gly Lys Val Trp Gly Gln Lys Tyr Phe 385 390 395 400	1201
aag ggt aac ttc gag agg ctc gcc att acc aag ggc aag gtg gat cct Lys Gly Asn Phe Glu Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys Val Asp Pro 405 410 415	1249
acg gat tac ttc agg aac gag ca Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu 420	1272

<210> 2

<211> 423

<212> PRT

<213> Lol p 4

<400> 2

Ala Val Val Cys Gly Arg Arg Tyr Asp Val Arg Ile Arg Val Arg Ser 1 5 10 15
Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gln Pro Glu 20 25 30
Asn Phe Ala Val Val Asp Leu Asn Gln Met Arg Ala Val Leu Val Asp 35 40 45

ES 2 375 618 T3

Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln Leu Gly Glu
 50 55 60
 Leu Tyr Tyr Ala Ile Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Leu Ala Phe Pro Ala
 65 70 75 80
 Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Leu Ala Gly Gly Gly
 85 90 95
 Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu Asn Val Ile
 100 105 110
 Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Lys Leu His Asp Lys Lys Ser
 115 120 125
 Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly Gly Glu Ser
 130 135 140
 Phe Gly Ile Val Val Ser Trp Gln Val Lys Leu Leu Pro Val Pro Pro
 145 150 155 160
 Thr Val Thr Ile Phe Lys Ile Pro Lys Ser Val Ser Glu Gly Ala Val
 165 170 175
 Asp Ile Ile Asn Lys Trp Gln Leu Val Ala Pro Gln Leu Pro Ala Asp
 180 185 190
 Leu Met Ile Arg Ile Ile Ala Met Gly Pro Lys Ala Thr Phe Glu Ala
 195 200 205
 Met Tyr Leu Gly Thr Cys Lys Thr Leu Thr Pro Met Met Gln Ser Lys
 210 215 220
 Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Ala Ser His Cys Asn Glu Met Ser Trp
 225 230 235 240
 Ile Glu Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp Ser Leu Glu
 245 250 255
 Gly Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Thr Phe Lys Pro Phe Ala Glu Tyr
 260 265 270
 Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Glu Pro Phe Pro Lys Ser Val Trp Glu Gln
 275 280 285
 Ile Phe Gly Thr Trp Leu Val Lys Pro Gly Ala Gly Ile Met Ile Phe
 290 295 300

ES 2 375 618 T3

Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Ala Ala Thr Pro
305 310 315 320

Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr Val Asn Tyr
325 330 335

Trp Phe Ala Pro Gly Ala Gly Ala Ala Pro Leu Ser Trp Ser Lys Glu
340 345 350

Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro Arg Gln Ala
355 360 365

Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu Val Val Asn
370 375 380

Gly Val Ser Thr Tyr Ser Ser Gly Lys Val Trp Gly Gln Lys Tyr Phe
385 390 395 400

Lys Gly Asn Phe Glu Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys Val Asp Pro
405 410 415

Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu
420

<210> 3

<211> 1503

<212> **ADN**

<213> Lol p 4

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1503)

<223>

<400> 3

tac ttc ccg ccg ccg gct gct aaa gaa gac ttc ctg ggt tgc ctg gtt	48
Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val	
1 5 10 15	

aaa gaa atc ccg ccg cgt ctg ttg tac gcg aaa tcg tcg ccg gcg tat	96
Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr	
20 25 30	

ES 2 375 618 T3

ccc tca gtc ctg ggg cag acc atc cgg aac tcg agg tgg tcg tcg ccg Pro Ser Val Leu Gly Gln Thr Ile Arg Asn Ser Arg Trp Ser Ser Pro 35 40 45	144
gac aac gtg aag ccg ctc tac atc atc acc ccc acc aac gtc tcc cac Asp Asn Val Lys Pro Leu Tyr Ile Ile Thr Pro Thr Asn Val Ser His 50 55 60	192
atc cag tct gcc gtg gtg tgc ggc cgc cgt tac gac gtc cgc atc cgc Ile Gln Ser Ala Val Cys Gly Arg Arg Tyr Asp Val Arg Ile Arg 65 70 75 80	240
gta cgc agc ggc ggg cac gac tac gag ggc ctc tcg tac cgc tcc ctg Val Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu 85 90 95	288
cag ccc gag aac ttc gca gtc gtc gac ctc aac cag atg cgg gcg gtg Gln Pro Glu Asn Phe Ala Val Val Asp Leu Asn Gln Met Arg Ala Val 100 105 110	336
ttg gtg gac ggt aag gcc cgc acg gcg tgg gtc gac tcc ggc gcg cag Leu Val Asp Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln 115 120 125	384
ctc ggc gag ctc tac tac gcc atc tcc aag tat agc cgc acg ctg gcc Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Leu Ala 130 135 140	432
ttc ccg gca ggc gtt tgc ccg acc atc ggc gtg ggc ggc aac ctc gcg Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Leu Ala 145 150 155 160	480
ggc ggc ggc ttc ggt atg ctg ctg cgc aag tac ggc atc gcc gca gag Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu 165 170 175	528
aac gtc atc gac gtg aag ctc gtc gac gcc aac ggc aag ctg cac gac Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Lys Leu His Asp 180 185 190	576
aag aag tcc atg ggc gac gac cat ttc tgg gcc gtg agg ggt ggc ggc Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly 195 200 205	624
ggc gag agc ttc ggc atc gtg gtc tcg tgg cag gtg aag ctc ctg ccg Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ser Trp Gln Val Lys Leu Leu Pro 210 215 220	672
gtg cct ccc acg gtg acc atc ttc aag atc ccc aag tca gtc agc gag Val Pro Pro Thr Val Thr Ile Phe Lys Ile Pro Lys Ser Val Ser Glu 225 230 235 240	720
ggc gcc gtg gac atc atc aac aag tgg caa ctg gtc gcg cct caa ctt Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Lys Trp Gln Leu Val Ala Pro Gln Leu 245 250 255	768
ccc gcc gac ctc atg atc cgc atc att gcg atg ggg ccc aag gcc acg Pro Ala Asp Leu Met Ile Arg Ile Ile Ala Met Gly Pro Lys Ala Thr 260 265 270	816
ttc gag gcc atg tac ctc ggc acc tgc aaa acc ctg acg ccg atg atg	864

ES 2 375 618 T3

Phe	Glu	Ala	Met	Tyr	Leu	Gly	Thr	Cys	Lys	Thr	Leu	Thr	Pro	Met	Met		
		275					280					285					
cag	agc	aag	ttc	ccc	gag	ctt	ggc	atg	aac	gcc	tcg	cac	tgc	aac	gag	912	
Gln	Ser	Lys	Phe	Pro	Glu	Leu	Gly	Met	Asn	Ala	Ser	His	Cys	Asn	Glu		
		290				295					300						
atg	tca	tgg	atc	gag	tcc	atc	ccc	ttc	gtc	cac	ctc	ggc	cat	agg	gat	960	
Met	Ser	Trp	Ile	Glu	Ser	Ile	Pro	Phe	Val	His	Leu	Gly	His	Arg	Asp		
					310					315					320		
tcc	ctg	gag	ggc	gac	ctc	ctc	aac	cgg	aac	aac	acc	ttc	aag	ccc	ttt	1008	
Ser	Leu	Glu	Gly	Asp	Leu	Leu	Asn	Arg	Asn	Asn	Thr	Phe	Lys	Pro	Phe		
				325				330						335			
gcg	gag	tac	aaa	tcg	gac	tac	gtc	tac	gag	cca	ttc	ccc	aag	agc	gtg	1056	
Ala	Glu	Tyr	Lys	Ser	Asp	Tyr	Val	Tyr	Glu	Pro	Phe	Pro	Lys	Ser	Val		
			340				345						350				
tgg	gag	cag	atc	ttc	ggc	acc	tgg	ctc	gtg	aag	cct	ggc	gcg	ggg	att	1104	
Trp	Glu	Gln	Ile	Phe	Gly	Thr	Trp	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Gly	Ile		
		355					360					365					
atg	atc	ttt	gac	ccc	tac	ggc	gcc	acc	atc	agc	gct	acc	cca	gaa	gcg	1152	
Met	Ile	Phe	Asp	Pro	Tyr	Gly	Ala	Thr	Ile	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ala		
		370				375					380						
gcg	acg	ccg	ttc	cct	cac	cgc	aag	gga	gtc	ctc	ttc	aac	atc	cag	tac	1200	
Ala	Thr	Pro	Phe	Pro	His	Arg	Lys	Gly	Val	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln	Tyr		
					390					395				400			
gtc	aac	tac	tgg	ttc	gct	ccg	gga	gcc	ggc	gcc	gcg	ccc	ttg	tca	tgg	1248	
Val	Asn	Tyr	Trp	Phe	Ala	Pro	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Pro	Leu	Ser	Trp		
				405				410						415			
agc	aag	gaa	atc	tac	aac	tac	atg	gag	ccg	tac	gtg	agc	aag	aac	ccc	1296	
Ser	Lys	Glu	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Met	Glu	Pro	Tyr	Val	Ser	Lys	Asn	Pro		
			420				425						430				
agg	cag	gcc	tac	gcc	aac	tac	agg	gac	atc	gac	ctc	ggg	agg	aac	gag	1344	
Arg	Gln	Ala	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Arg	Asp	Ile	Asp	Leu	Gly	Arg	Asn	Glu		
		435				440						445					
gtg	gtg	aat	ggc	gtc	tcc	acc	tac	agc	agt	ggc	aag	gtc	tgg	gga	cag	1392	
Val	Val	Asn	Gly	Val	Ser	Thr	Tyr	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Trp	Gly	Gln		
		450				455					460						
aaa	tat	ttc	aag	ggc	aac	ttc	gag	agg	ctc	gcc	att	acc	aag	ggc	aag	1440	
Lys	Tyr	Phe	Lys	Gly	Asn	Phe	Glu	Arg	Leu	Ala	Ile	Thr	Lys	Gly	Lys		
		465			470					475					480		
gtg	gat	cct	acg	gat	tac	ttc	agg	aac	gag	cag	agc	atc	ccg	ccg	ctc	1488	
Val	Asp	Pro	Thr	Asp	Tyr	Phe	Arg	Asn	Glu	Gln	Ser	Ile	Pro	Pro	Leu		
				485				490						495			
atc	aaa	aag	tac	tga												1503	
Ile	Lys	Lys	Tyr														
			500														

<210> 4

ES 2 375 618 T3

<211> 500

<212> PRT

<213> Lol p 4

<400> 4

Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val
1 5 10 15

Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr
20 25 30

Pro Ser Val Leu Gly Gln Thr Ile Arg Asn Ser Arg Trp Ser Ser Pro
35 40 45

Asp Asn Val Lys Pro Leu Tyr Ile Ile Thr Pro Thr Asn Val Ser His
50 55 60

Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg Tyr Asp Val Arg Ile Arg
65 70 75 80

Val Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu
85 90 95

Gln Pro Glu Asn Phe Ala Val Val Asp Leu Asn Gln Met Arg Ala Val
100 105 110

Leu Val Asp Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln
115 120 125

Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Leu Ala
130 135 140

Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Leu Ala
145 150 155 160

Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu
165 170 175

Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Lys Leu His Asp
180 185 190

Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly
195 200 205

ES 2 375 618 T3

Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ser Trp Gln Val Lys Leu Leu Pro
 210 215 220
 Val Pro Pro Thr Val Thr Ile Phe Lys Ile Pro Lys Ser Val Ser Glu
 225 230 235 240
 Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Lys Trp Gln Leu Val Ala Pro Gln Leu
 245 250 255
 Pro Ala Asp Leu Met Ile Arg Ile Ile Ala Met Gly Pro Lys Ala Thr
 260 265 270
 Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Lys Thr Leu Thr Pro Met Met
 275 285
 Gln Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Ala Ser His Cys Asn Glu
 290 295 300
 Met Ser Trp Ile Glu Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp
 305 310 315 320
 Ser Leu Glu Gly Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Thr Phe Lys Pro Phe
 325 330 335
 Ala Glu Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Glu Pro Phe Pro Lys Ser Val
 340 345 350
 Trp Glu Gln Ile Phe Gly Thr Trp Leu Val Lys Pro Gly Ala Gly Ile
 355 360 365
 Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Ala
 370 375 380
 Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr
 385 390 395 400
 Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Gly Ala Ala Pro Leu Ser Trp
 405 410 415
 Ser Lys Glu Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro
 420 425 430
 Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu
 435 440 445
 Val Val Asn Gly Val Ser Thr Tyr Ser Ser Gly Lys Val Trp Gly Gln
 450 455 460

ES 2 375 618 T3

Lys Tyr Phe Lys Gly Asn Phe Glu Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys
465 470 475 480

Val Asp Pro Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu Gln Ser Ile Pro Pro Leu
485 490 495

Ile Lys Lys Tyr
500

<210> 5

<211> 1503

<212> **ADN**

<213> Ph1 p 4

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1503)

<223>

<400> 5

tac ttc ccg ccg ccg gct gct aaa gaa gac ttc ctg ggt tgc ctg gtt 48
Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val
1 5 10 15

aaa gaa atc ccg ccg cgt ctg ttg tac gcg aaa tcg tcg ccg gcg tat 96
Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr
20 25 30

ccc tca gtc ctg ggg cag acc atc ccg aac tcg agg tgg tcg tcg ccg 144
Pro Ser Val Leu Gly Gln Thr Ile Arg Asn Ser Arg Trp Ser Ser Pro
35 40 45

gac aac gtg aag ccg ctc tac atc atc acc ccc acc aac gtc tcc cac 192
Asp Asn Val Lys Pro Leu Tyr Ile Ile Thr Pro Thr Asn Val Ser His
50 55 60

atc cag tcc gcc gtg gtg tgc ggc cgc cgc cac agc gtc cgc atc cgc 240
Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg His Ser Val Arg Ile Arg
65 70 75 80

gtg cgc agc ggc ggg cac gac tac gag ggc ctc tcg tac cgg tct ttg 288
Val Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu
85 90 95

cag ccc gag acg ttc gcc gtc gtc gac ctc aac aag atg cgg gcg gtg 336
Gln Pro Glu Thr Phe Ala Val Val Asp Leu Asn Lys Met Arg Ala Val
100 105 110

ES 2 375 618 T3

tgg gtg gac ggc aag gcc cgc acg gcg tgg gtg gac tcc ggc gcg cag Trp Val Asp Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln 115 120 125	384
ctc ggc gag ctc tac tac gcc atc tat aag gcg agc ccc acg ctg gcg Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile Tyr Lys Ala Ser Pro Thr Leu Ala 130 135 140	432
ttc ccg gcc ggc gtg tgc ccg acg atc gga gtg ggc ggc aac ttc gcg Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Phe Ala 145 150 155 160	480
ggc ggc ggc ttc ggc atg ctg ctg cgc aag tac ggc atc gcc gcg gag Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu 165 170 175	528
aac gtc atc gac gtg aag ctc gtc gac gcc aac ggc aag ctg cac gac Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Lys Leu His Asp 180 185 190	576
aag aag tcc atg ggc gac gac cat ttc tgg gcc gtc agg ggc ggc ggc Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly 195 200 205	624
ggc gag agc ttc ggc atc gtg gtc gcg tgg cag gtg aag ctc ctg ccg Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ala Trp Gln Val Lys Leu Leu Pro 210 215 220	672
gtg ccg ccc acc gtg aca ata ttc aag atc tcc aag aca gtg agc gag Val Pro Pro Thr Val Thr Ile Phe Lys Ile Ser Lys Thr Val Ser Glu 225 230 235 240	720
ggc gcc gtg gac atc atc aac aag tgg caa gtg gtc gcg ccg cag ctt Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Lys Trp Gln Val Val Ala Pro Gln Leu 245 250 255	768
ccc gcc gac ctc atg atc cgc atc atc gcg cag ggc ccc aag gcc acg Pro Ala Asp Leu Met Ile Arg Ile Ile Ala Gln Gly Pro Lys Ala Thr 260 265 270	816
ttc gag gcc atg tac ctc ggc acc tgc aaa acc ctg acg ccg ttg atg Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Lys Thr Leu Thr Pro Leu Met 275 280 285	864
agc agc aag ttc ccg gag ctc ggc atg aac ccc tcc cac tgc aac gag Ser Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Pro Ser His Cys Asn Glu 290 295 300	912
atg tca tgg atc cag tcc atc ccc ttc gtc cac ctc ggc cac agg gac Met Ser Trp Ile Gln Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp 305 310 315 320	960
gcc ctc gag gac gac ctc ctc aac cgg aac aac tcc ttc aag ccc ttc Ala Leu Glu Asp Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Ser Phe Lys Pro Phe 325 330 335	1008
gcc gaa tac aag tcc gac tac gtc tac cag ccc ttc ccc aag acc gtc Ala Glu Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Gln Pro Phe Pro Lys Thr Val 340 345 350	1056
tgg gag cag atc ctc aac acc tgg ctc gtc aag ccc ggc gcc ggc atc	1104

ES 2 375 618 T3

Trp	Glu	Gln	Ile	Leu	Asn	Thr	Trp	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Gly	Ile		
		355					360					365					
atg	atc	ttc	gac	ccc	tac	ggc	gcc	acc	atc	agc	gcc	acc	ccg	gag	tcc	1152	
Met	Ile	Phe	Asp	Pro	Tyr	Gly	Ala	Thr	Ile	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser		
	370					375				380							
gcc	acg	ccc	ttc	cct	cac	cgc	aag	ggc	gtc	ctc	ttc	aac	atc	cag	tac	1200	
Ala	Thr	Pro	Phe	Pro	His	Arg	Lys	Gly	Val	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln	Tyr		
	385				390					395				400			
gtc	aac	tac	tgg	ttc	gcc	ccg	gga	gcc	gcc	gcc	gcg	ccc	ctc	tgc	tgg	1248	
Val	Asn	Tyr	Trp	Phe	Ala	Pro	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro	Leu	Ser	Trp		
			405					410						415			
agc	aag	gac	atc	tac	aac	tac	atg	gag	ccc	tac	gtg	agc	aag	aac	ccc	1296	
Ser	Lys	Asp	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Met	Glu	Pro	Tyr	Val	Ser	Lys	Asn	Pro		
			420					425					430				
agg	cag	gcg	tac	gca	aac	tac	agg	gac	atc	gac	ctc	ggc	agg	aac	gag	1344	
Arg	Gln	Ala	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Arg	Asp	Ile	Asp	Leu	Gly	Arg	Asn	Glu		
		435					440					445					
gtg	gtc	aac	gac	gtc	tcc	acc	tac	gcc	agc	ggc	aag	gtc	tgg	ggc	cag	1392	
Val	Val	Asn	Asp	Val	Ser	Thr	Tyr	Ala	Ser	Gly	Lys	Val	Trp	Gly	Gln		
	450					455					460						
aaa	tac	ttc	aag	ggc	aac	ttc	gag	agg	ctc	gcc	att	acc	aag	ggc	aag	1440	
Lys	Tyr	Phe	Lys	Gly	Asn	Phe	Glu	Arg	Leu	Ala	Ile	Thr	Lys	Gly	Lys		
	465				470					475				480			
gtc	gat	cct	acc	gac	tac	ttc	agg	aac	gag	cag	agc	atc	ccg	ccg	ctc	1488	
Val	Asp	Pro	Thr	Asp	Tyr	Phe	Arg	Asn	Glu	Gln	Ser	Ile	Pro	Pro	Leu		
				485					490					495			
atc	aaa	aag	tac	tga												1503	
Ile	Lys	Lys	Tyr														
			500														

<210> 6

<211> 500

<212> PRT

<213> Pbl p 4

<400> 6

Tyr	Phe	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Lys	Glu	Asp	Phe	Leu	Gly	Cys	Leu	Val
1				5				10					15		
Lys	Glu	Ile	Pro	Pro	Arg	Leu	Leu	Tyr	Ala	Lys	Ser	Ser	Pro	Ala	Tyr
			20				25						30		
Pro	Ser	Val	Leu	Gly	Gln	Thr	Ile	Arg	Asn	Ser	Arg	Trp	Ser	Ser	Pro
		35				40						45			

ES 2 375 618 T3

Asp Asn Val Lys Pro Leu Tyr Ile Ile Thr Pro Thr Asn Val Ser His
 50 55 60
 Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg His Ser Val Arg Ile Arg
 65 70 75 80
 Val Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu
 85 90 95
 Gln Pro Glu Thr Phe Ala Val Val Asp Leu Asn Lys Met Arg Ala Val
 100 105 110
 Trp Val Asp Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln
 115 120 125
 Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile Tyr Lys Ala Ser Pro Thr Leu Ala
 130 135 140
 Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Phe Ala
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu
 165 170 175
 Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Lys Leu His Asp
 180 185 190
 Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly
 195 200 205
 Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ala Trp Gln Val Lys Leu Leu Pro
 210 215 220
 Val Pro Pro Thr Val Thr Ile Phe Lys Ile Ser Lys Thr Val Ser Glu
 225 230 235 240
 Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Lys Trp Gln Val Val Ala Pro Gln Leu
 245 250 255
 Pro Ala Asp Leu Met Ile Arg Ile Ile Ala Gln Gly Pro Lys Ala Thr
 260 265 270
 Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Lys Thr Leu Thr Pro Leu Met
 275 280 285

ES 2 375 618 T3

Ser Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Pro Ser His Cys Asn Glu
290 295 300

Met Ser Trp Ile Gln Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp
305 310 315 320

Ala Leu Glu Asp Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Ser Phe Lys Pro Phe
325 330 335

Ala Glu Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Gln Pro Phe Pro Lys Thr Val
340 345 350

Trp Glu Gln Ile Leu Asn Thr Trp Leu Val Lys Pro Gly Ala Gly Ile
355 360 365

Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Ser
370 375 380

Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr
385 390 395 400

Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Ala Ala Ala Pro Leu Ser Trp
405 410 415

Ser Lys Asp Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro
420 425 430

Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu
435 440 445

Val Val Asn Asp Val Ser Thr Tyr Ala Ser Gly Lys Val Trp Gly Gln
450 455 460

Lys Tyr Phe Lys Gly Asn Phe Glu Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys
465 470 475 480

Val Asp Pro Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu Gln Ser Ile Pro Pro Leu
485 490 495

Ile Lys Lys Tyr
500

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Dactylus glomerata

<400> 7

Asp Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys
1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Dactylus glomerata

<400> 8

Val Asp Pro Thr Asp Tyr Phe Gly Asn Glu Gln
1 5 10

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Dactylus glomerata

<400> 9

Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln Leu Gly Glu Leu Ser
1 5 10 15

Tyr

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Dactylus glomerata

<400> 10

Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro
1 5 10 15

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 11

Lys	Thr	Val	Lys	Pro	Leu	Tyr	Ile	Ile	Thr	Pro
1			5						10	

<210> 12

<211> 22

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 12

Lys	Gln	Val	Glu	Arg	Asp	Phe	Leu	Thr	Ser	Leu	Thr	Lys	Asp	Ile	Pro
1			5						10					15	

Gln	Leu	Tyr	Leu	Lys	Ser
			20		

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 13

Thr	Val	Lys	Pro	Leu	Tyr	Ile	Ile	Thr	Pro	Ile	Thr	Ala	Ala	Met	Ile
1				5					10					15	

<210> 14

<211> 24

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 14

Leu Arg Lys Tyr Gly Thr Ala Ala Asp Asn Val Ile Asp Ala Lys Val
1 5 10 15

Val Asp Ala Gln Gly Arg Leu Leu
20

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 15

Lys Trp Gln Thr Val Ala Pro Ala Leu Pro Asp Pro Asn Met
1 5 10

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 16

Val Thr Trp Ile Glu Ser Val Pro Tyr Ile Pro Met Gly Asp Lys
1 5 10 15

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Aminoácido indeterminado

ES 2 375 618 T3

<400> 17

Gly Thr Val Arg Asp Leu Leu Xaa Arg Thr Ser Asn Ile Lys Ala Phe
1 5 10 15

Gly Lys Tyr

<210> 18

<211> 23

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 18

Thr Ser Asn Ile Lys Ala Phe Gly Lys Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Leu
1 5 10 15

Glu Pro Ile Pro Lys Lys Ser
20

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 19

Tyr Arg Asp Leu Asp Leu Gly Val Asn Gln Val Val Gly
1 5 10

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 20

Ser Ala Thr Pro Pro Thr His Arg Ser Gly Val Leu Phe Asn Ile
1 5 10 15

ES 2 375 618 T3

<210> 21
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Cynodon dactylon

<400> 21
 Ala Ala Ala Ala Leu Pro Thr Gln Val Thr Arg Asp Ile Tyr Ala Phe
 1 5 10 15
 Met Thr Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro Arg Gln Ala Tyr Val Asn Tyr
 20 25 30
 Arg Asp Leu Asp
 35

<210> 22
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Lolium perenne

<400> 22
 Phe Leu Glu Pro Val Leu Gly Leu Ile Phe Pro Ala Gly Val
 1 5 10

<210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Lolium perenne

<400> 23
 Gly Leu Ile Glu Phe Pro Ala Gly Val
 1 5

<210> 24
 <211> 22
 <212> **ADN**

ES 2 375 618 T3

<213> Lolium perenne

<400> 24
ggctcccggg gcgaaccagt ag 22

<210> 25

<211> 23

<212> **ADN**

<213> Lolium perenne

<400> 25
accaacgcct cccacatcca gtc 23

<210> 26

<211> 49

<212> **ADN**

<213> Lolium perenne

<400> 26
gataagcttg aattctgatt agtacttttt gatcagcggc gggatgctc 49

<210> 27

<211> 49

<212> **ADN**

<213> Lolium perenne

<400> 27
gataagcttc tcgagtgatt agtacttttt gatcagcggc gggatgctc 49

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN que codifica para un alérgeno con las propiedades de Lol p 4, correspondiente a una secuencia de nucleótidos seleccionada entre una de las secuencias según SEC ID N° 1 y 3.
- 5 2. Una molécula de ADN, correspondiente a una secuencia parcial de la molécula de ADN según la reivindicación 1, la cual codifica para un fragmento de Lol p 4 inmunomodulador, reactivo frente a células T.
3. Una molécula de ADN, correspondiente a una combinación de secuencias parciales de la molécula de ADN según la reivindicación 1, la cual codifica para un fragmento de Lol p 4 inmunomodulador, reactivo frente a células T.
- 10 4. Una molécula de ADN, correspondiente a una secuencia de nucleótidos según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 3, caracterizada porque una mutación conduce al intercambio de una, varias o todas las cisteínas del polipéptido correspondiente por otro aminoácido.
- 5 5. Un vector de expresión de ADN recombinante o un sistema de clonación que contiene una molécula de ADN según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 4, unido funcionalmente con una secuencia control de expresión.
6. Un organismo huésped, transformado con una molécula de ADN según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 4 o un vector de expresión según la reivindicación 5.
- 15 7. Un procedimiento para la preparación de un polipéptido, codificado mediante una secuencia de ADN según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 4, mediante cultivo de un organismo huésped según la reivindicación 6 y obtención del correspondiente polipéptido a partir del cultivo.
8. Un polipéptido recombinante que codifica para una secuencia de ADN según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 4.
9. Un polipéptido según la reivindicación 8 como medicamento.
- 20 10. Una preparación farmacéutica que contiene al menos un polipéptido según la reivindicación 9 y dado el caso otros principios activos y/o coadyuvantes para el diagnóstico y/o tratamiento de alergias en cuya activación están implicados alérgenos del grupo 4 de *Poaceae*.
- 25 11. Uso de al menos un polipéptido según la reivindicación 9 para la preparación de un medicamento para el diagnóstico y/o tratamiento de alergias en cuya activación están implicados alérgenos del grupo 4 de *Poaceae* y/o para la prevención de dichas alergias.
12. Una molécula de ADN según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 4 como medicamento.