

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 045**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/415** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**A61K 39/36** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03740216 .1**  
 96 Fecha de presentación: **11.06.2003**  
 97 Número de publicación de la solicitud: **1515988**  
 97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.03.2005**

54 Título: **Secuencia de ADN y preparación recombinante del alérgeno del polen de gramíneas PHI P 4**

30 Prioridad:  
**25.06.2002 EP 02013953**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.06.2012**

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

72 Inventor/es:  
**FIEBIG, Helmut;  
NANDY, Andreas;  
SUCK, Roland;  
CROMWELL, Oliver;  
PETERSEN, Arnd y  
BECKER, Wolf-Meinhard**

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

ES 2 384 045 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

Secuencia de ADN y preparación recombinante del alérgeno del polen de gramíneas PHI P 4.

Antecedentes de la invención

- 5 La presente invención se refiere a la preparación de la secuencia genética del alérgeno principal del polen de gramíneas PHI p 4. La invención también incluye fragmentos, nuevas combinaciones de secuencias parciales y mutaciones puntuales con efecto hipoadérgico. Las moléculas de ADN recombinante y los polipéptidos derivados, fragmentos, nuevas combinaciones de secuencias parciales y variantes 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.
- En el caso de la hierba timotea (*Phleum pratense*) hasta el momento se han identificado como alérgenos principales PHI p 1 (Petersen y col., 1993, J. Allergy Clin. Immunol. 92: 789-796), PHI p 5 (Matthiesen y Löwenstein, 1991, Clin. Exp. Allergy 21: 297-307; Petersen y col., 1992, Int. Arch. Allergy Immunol. 98: 105-109), PHI p 6 (Petersen y col., 1995, Int. Arch. Allergy Immunol. 108, 49-54). PHI p 2/3 (Dolecek y col., 1993, FEBS 335 (3), 299-304), PHI p 4 (Haavik y col., 1985, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 78: 260-268; Valenta y col., 1992, Int. Arch. Allergy Immunol. 97: 287-294, Fischer y col., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 189-198) y PHI p 13 (Suck y col., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 324-332; Suck y col., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402).
- 25 PHI p 4 se ha descrito como una glicoproteína básica con una masa molecular de entre 50 y 60 kDa (Haavik y col., 1985, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 78: 260-268). La molécula de PHI p 4 es resistente a la tripsina (Fischer y col., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 189-198) y un 70-88 % de los alérgicos al polen de gramíneas presentan anticuerpos IgE contra esta molécula (Valenta y col., 1993, Int. Arch. Allergy Immunol. 97: 287-294; Rossi y col., 2001, Allergy 56:1180-1185; Mari, 2003, Clin. Exp. Allergy 33:43-51). Se han descrito moléculas homólogas a partir de especies de gramíneas relacionadas (Su y col., 1991, Clin. Exp. Allergy 21: 449-455; Jaggi y col., 1989, Int. Arch.
- 30 Allergy Appl. Immunol. 89: 342-348; Jaggi y col., 1989, J. Allergy Clin. Immunol. 83: 845-852; Leduc-Brodard y col., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 1065-1072; 14 – 17). 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; Gavrović-Jankulović 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).
- 35 A diferencia de los alérgenos principales previamente mencionados de *Phleum pratense* (PHI p 1, PHI p 2/3, PHI 5a y 5b, PHI p 6 y PHI p 13) la estructura primaria del PHI p 4 todavía no se ha resuelto. Igualmente, no existe ninguna secuencia completa de moléculas del grupo 4 de otras especies de gramíneas.
- 40 La determinación de la secuencia de aminoácidos N-terminal no ha tenido éxito hasta el momento. Sin embargo, no se sabe cuales son las causas. Fischer y col. (J. Allergy Clin. Immunol., 1996; 98: 189-198) suponen un bloqueo N-terminal, pero pudieron purificar un péptido interno tras la degradación con lisil-endopeptidasa y determinar la secuencia del mismo: IVALPXGMLK (SEC ID N° 7).
- 45 Este péptido presenta homologías con las secuencias peptídicas de los alérgenos de ambrosias Amb a1 y Amb a2, así como semejanzas con las secuencias de proteínas de maíz (Zm58.2), tomate (lat 59, lat 56) y tabaco (G10) (Fischer y col., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 189-198). Para *Lolium perenne* se describieron fragmentos de péptidos de alérgenos básicos del grupo 4 con la secuencia siguiente: FLEPVLGLIFPAGV (SEC ID N° 8) y GLIEFPAGV (SEC ID N° 9) (Jaggi y col., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89: 342-348).

De los alérgenos del grupo 4 de *Dactylus glomerata* hasta ahora solamente se han obtenido por degradación enzimática y se han secuenciado los péptidos:

DIYNYMEPYVSK (P15, SEC ID N° 10),

VDPTDYFGNEQ (P17, SEC ID N° 11),

5 ARTAWVDSGAQLGELSY (P20, SEC ID N° 12),

y GVLFNIQYVNYWFAP (P22, SEC ID N° 13) (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 (S, SEC ID N° 14),

10 KQVERDFLTSLTKDIPQLYLKS (V49L, SEC ID N° 15),

TVKPLYIITPITAAMI (T33S, SEC ID N° 16),

LRKYGTAADNVIDAKVVDAQGRLL (T35L, SEC ID N° 17),

KWQTVAPALPDPNM (P2, SEC ID N° 18),

VTWIESVPYIPMGDK (V26L, SEC ID N° 19),

15 GTVRDLLXRSTNIKAFGKY (L25L, SEC ID N° 20),

TSNIKAFGKYKSDYVLEPIPKKS (T22L, SEC ID N° 21),

YRDLDLGVNQVVG (P3, SEC ID N° 22),

SATPPTHRSGLVFN (V20L, SEC ID N° 23),

20 y AAAALPTQVTRDIYAFMTPYVSKNPRQAYVNYRDL (V14L, SEC ID N° 24) (Liaw y col., 2001, Biochem. Biophys. Research Communication 280: 738-743).

Sin embargo, estas secuencias peptídicas descritas para Phl p 4 y otros alérgenos del grupo 4 no han conducido hasta ahora a la resolución completa de la estructura primaria de los alérgenos del grupo 4.

25 Por lo tanto, el objeto en el que se basa la presente invención consta de la preparación de la secuencia de ADN completa del Phl p 4, así como de un ADN recombinante correspondiente sobre cuya base se pueda expresar el alérgeno Phl p 4 como proteína y se pueda hacer accesible un aprovechamiento farmacológico significativo como tal o en forma modificada.

Índice de figuras

Figura 1: Secuencia de ADN interna (SEC ID N° 25) del gen de Phl p 4

30 Con los cebadores degenerados N° 30 (sentido) y N° 37 (antisentido), ambos representados en cursiva, se clonaron y secuenciaron productos de amplificación obtenidos con ADN genómico. La secuencia presentada representa el consenso de 6 clones. El cebador sentido N° 82 específico creado a partir de esta secuencia se presenta subrayado.

Figura 2: Extremo 3' de la secuencia de ácidos nucleicos (SEC ID N° 26) del gen de Phl p 4

35 En una PCR RACE 3' con ADNc de *Phleum pratense* se obtuvieron y secuenciaron productos de amplificación con el cebador sentido N° 82 específico (en cursiva) así como un cebador de anclaje. La secuencia presentada representa el consenso de 3 secuenciaciones y comprende el extremo 3' del gen de Phl p 4 hasta el codón de parada (doblemente subrayado). Los fragmentos de la secuencia que se han preparado para la construcción de los cebadores antisentido N° 85 y N° 86 están subrayados.

Figura 3: Localización del péptido de Phl p 4 en la secuencia de aminoácidos deducida del alérgeno Phl p 4 (SEC ID N° 2)

40 Los péptidos P1 – P6 (SEC ID N° 27-32) obtenidos a partir de la secuenciación de aminoácidos del alérgeno Phl p 4 purificado y fragmentado permiten clasificar claramente la secuencia de aminoácidos del gen de Phl p 4 derivada a partir de la secuencia de ácidos nucleicos.

Figura 4: Determinación de la identidad del Phl p 4 recombinante (rPhl p 4) mediante los anticuerpos monoclonales 5H1 (transferencia A) y 3C4 (transferencia B) específicos para el nPhl p 4r por transferencia Western.

Trayectoria 1: Extracto celular completo de *E. coli* que contiene el fragmento 1-200 del rPhl p 4

Trayectoria 2: Extracto celular completo de *E. coli* que contiene el fragmento 185-500 del rPhl p 4

Trayectoria 3: Extracto celular completo de *E. coli* que contiene el rPhl p 4

Trayectoria 4: nPhl p 4 purificado de *Phleum pratense*

5 ( ◀.....): Fragmentos de descomposición o degradación del fragmento C-terminal de rPhl p 4 o molécula íntegra de rPhl p 4

Figura 5: Determinación de la reactividad del Phl p 4 recombinante (rPhl p 4) con IgE de sueros de alérgicos al polen de gramíneas por transferencia Western.

10 Extractos de células de *E. coli* transformadas, que o bien expresan el gen de Phl p 4 completo o bien el fragmento 1-200 N-terminal o el fragmento 185-500 C-terminal, se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se incubó con sueros de donantes alérgicos al polen de gramíneas A, B o C y a continuación se detectó colorimétricamente el IgE unido sobre un anticuerpo IgE no humano, conjugado con fosfatasa alcalina.

Trayectoria 1: Extracto celular completo de *E. coli* que contiene el fragmento 1-200 del rPhl p 4

15 Trayectoria 2: Extracto celular completo de *E. coli* que contiene el fragmento 185-500 del rPhl p 4

Trayectoria 3: Extracto celular completo de *E. coli* que contiene rPhl p 4

Trayectoria 4: nPhl p 4 purificado de *Phleum pratense*

Las denominaciones utilizadas previamente y a continuación para las secuencias de nucleótidos o aminoácidos "SEC ID N°" hacen referencia al listado de secuencias que se incluye en la descripción.

20 Descripción de la invención

Con la presente invención se proporciona por primera vez la secuencia genética del alérgeno principal del polen de gramíneas Phl p 4, mediante la cual se obtienen tres secuencias dominantes (SEC ID N° 1, 3 y 5) a partir de los intercambios de nucleótido individual encontrados (polimorfismos de nucleótido individual, SNP, por sus siglas en inglés).

25 Por lo tanto, es objeto de la presente invención una molécula de ADN correspondiente a una secuencia de nucleótidos, seleccionada de un grupo compuesto por SEC ID N° 1, SEC ID N° 3 y SEC ID N° 5 o una molécula de ADN correspondiente a una secuencia de nucleótidos que codifica para el alérgeno mayor Phl P 4 de *Phleum pratense*.

30 En relación con la presente invención, aparte de los alérgenos del grupo 4 de otras especies de gramíneas, son de interés los alérgenos del grupo 13, ya que en el SDS-PAGE muestran un peso molecular muy similar a los alérgenos del grupo 4 y son difíciles de separar mediante técnicas bioquímicas (Suck y col., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 324-332; Suck y col., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402). Sin embargo, con ayuda de la secuencia de proteínas y de ADN según la invención y presentada ahora por primera vez, puede demostrarse claramente que los grupos 4 y 13 presentan secuencias de aminoácidos notablemente distintas.

35 Con el conocimiento de la secuencia de ADN de los alérgenos que existen en la naturaleza ahora 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).

40 La inmunoterapia específica o hiposensibilización representa una aproximación clásica al tratamiento terapéutico eficaz de las alergias (Fiebig, 1995, Allergo 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, Allergo J. 4 (7): 377-382).

45 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.

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 epítomos IgE, sin perjudicar a los epítomos de células T esenciales para la terapia (Schramm y col., 1999, J. Immunol. 162: 2406-2414).

5 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).

10 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.

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.

15 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, unido funcionalmente con una secuencia control de expresión y un organismo huésped, transformado con la molécula de ADN indicada o el vector de expresión indicado.

20 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 epítomos IgE de la molécula completa o mediante la preparación de fragmentos individuales que codifican para epítomos 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.

25 Por consiguiente, la invención trata de moléculas de ADN recombinantes correspondientes a la SEC ID Nº 1, 3 o 5, en las que la secuencia de nucleótidos de las posiciones 1-69 se derivó a partir de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal del Phl p 4. Para ello se emplearon codones existentes principalmente en *E. coli*. A partir de la posición 70, la secuencia de ADN corresponde a aquella que se identificó en el ADNc y genómico de *Phleum pratense*.

30 Por lo tanto, también es objeto de la presente invención una molécula de ADN que comprenda una secuencia de nucleótidos según SEC ID Nº 1, SEC ID Nº 3 o SEC ID Nº 5, empezando por la posición 70, la cual codifica para un polipéptido con las características del alérgeno mayor Phl p 4 de *Phleum pratense*.

Asimismo, la presente invención trata de polipéptidos codificados por una o varias de las moléculas de ADN descritas anteriormente.

35 Se trata en particular de polipéptidos según SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 4 o SEC ID Nº 6, mediante los cuales se determinaron las posiciones de los aminoácidos 1-33 mediante la secuenciación de aminoácidos N-terminal del alérgeno Phl p 4 natural aislado. Las posiciones 24-500 se derivaron de la secuencia de ADN según SEC ID Nº 1, 3 o 5. Los aminoácidos variables de las posiciones 6, 7, 8 y 9 proceden de la secuenciación N-terminal de la proteína de distintas preparaciones del Phl p 4 natural (Tab. 1).

40 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.

Estos polipéptidos o proteínas según la invención, los cuales actúan como alérgenos para los humanos, se encuentran en los granos de polen de *Phleum pratense*. Los granos de polen de otras especies de *Poaceae*, como por ejemplo *Lolium perenne*, *Dactylis glomerata*, *Poa pratensis*, *Cynodon dactylon*, *Holcus lanatus*, entre otras, contienen moléculas alérgicas homólogas (alérgenos del grupo 4).

45 La homología de estas moléculas se comprueba mediante su reactividad inmunológica cruzada tanto con anticuerpos monoclonales murinos como con anticuerpos IgE humanos.

50 Por consiguiente, la invención también trata de secuencias homólogas a la secuencia de ADN del Phl p 4 o moléculas de ADN correspondientes de los alérgenos del grupo 4 de otras *Poaceae*, como por ejemplo *Lolium perenne*, *Dactylis glomerata*, *Poa pratensis*, *Cynodon dactylon*, *Holcus lanatus*, *Triticum aestivum* y *Hordeum vulgare*, que hibridan bajo condiciones rigurosas a causa de la homología existente en la secuencia con el ADN del Phl p 4 y presentan una reactividad inmunológica cruzada respecto al Phl p 4.

Para la determinación de la secuencia de proteínas y ADN del Phl p 4 se procedió como sigue:

La purificación y aislamiento del alérgeno natural Phl p 4 se realizó según los métodos descritos (Fahlbusch y col. 1998, Clin. Exp. Allergy 28: 799-807; Suck y col., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402). La purificación y la eliminación de trazas del alérgeno del grupo 13 se realizó según el método descrito por Suck y col. (2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402).

5 De este Phl p 4 aislado a partir de *Phleum pratense* se determinó la secuencia de aminoácidos N-terminal mediante degradación de Edman. Con distintas cargas del Phl p 4 se determinaron las secuencias N-terminales (P1a-f) que se muestran en la Tabla 1. Como secuencia de consenso para las primeras 15 posiciones se considera la siguiente secuencia: YFPP'P'AAKEDFLGXL (SEC ID N° 33). No se pudo determinar la posición 14, posiblemente está ocupada por una cisteína. Los distintos aminoácidos de las posiciones 6, 7, 8 y 9 con las distintas cargas indican variaciones en el sentido de isoformas. Las posiciones 4 y 5 están ocupadas por hidroxiprolina (P'), lo que se comprobó de forma inequívoca mediante una analítica específica en los análisis de los preparados p1-a y b.

Mediante el tratamiento del Phl p 4 desnaturalizado por SDS con endopeptidasa Glu-C (Promega, Heidelberg, Alemania) se obtuvieron varios péptidos. De dos péptidos (P1 y P2) se determinaron las secuencias de aminoácidos que se muestran en la Tabla 1. Mediante la disociación con la endopeptidasa Lys-C (Roche, Mannheim, Alemania) se purificaron y secuenciaron 2 péptidos (P4 y P5) (Tab. 1). Mediante disociación con CNBr se aisló otro péptido (P6) y se determinó la secuencia de aminoácidos (Tab.1).

Las secuencias de aminoácidos de la secuencia N-terminal y de los péptidos internos 2 y 6 se utilizaron como base para la construcción de cebadores degenerados. Con el cebador sentido N° 30 y el cebador antisentido N° 37 (Tab. 2) se prepararon amplificadores con ADN genómico de *Phleum pratense*. Los clones obtenidos a partir de estos amplificadores se secuenciaron (Fig. 1) y se utilizaron para la construcción del cebador sentido específico N° 82 (Tab. 2). Con un ADNc, que se preparó a partir de la población de ARNm representativo del polen de *Phleum pratense*, y el cebador sentido específico N° 82 según la invención, así como el cebador de anclaje AUAP (Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) se realizó una PCR bajo condiciones rigurosas. Este producto de amplificación de aprox. 450 kb se secuenció y, de este modo, se identificó la secuencia que faltaba hasta el extremo 3' del gen de Phl p 4 (Fig. 2). Basándose en esta secuencia del Phl p 4 C-terminal determinada según la invención se construyeron los cebadores antisentido específicos N° 85 y N° 86 (Tab. 2). Basándose en la secuencia de aminoácidos N-terminal del péptido P1-a de Phl p 4 (Tab. 1) se construyó el cebador sentido degenerado N° 29, derivado del ADN que codifica para las posiciones de aminoácidos 24-33 (LYAKSSPAYP (SEC ID N° 34)).

Con los cebadores N° 29 y 86 se llevó a cabo una PCR con ADN genómico de *Phleum pratense*. Este producto de PCR se utilizó como base para una segunda PCR (PCR anidada) con los cebadores N° 29 y N° 85. Los productos de amplificación se insertaron, clonaron y secuenciaron en el vector pGEM T-easy (Promega, Heidelberg, Alemania). Esta secuencia empieza en la posición 24 del extremo N, éste inclusive, o la posición 70 de la secuencia de ADN según SEC ID N° 1, 3 o 5 y llega hasta el cebador N° 85, (posición 1402 de la SEC ID N° 1, 3 o 5) que está localizado en un segmento C-terminal ya determinado del gen de Phl p 4. Con estos datos se puede construir la secuencia de aminoácidos completa de la molécula de Phl p 4 a partir de las primeras 33 posiciones de aminoácidos determinadas mediante la secuenciación de la proteína y la secuencia de aminoácidos deducida (477 posiciones), que puede derivarse a partir de los clones preparados con los cebadores N° 29/N° 85 y N° 82/cebador de anclaje. Ambos clones se solapan en 197 posiciones de su secuencia de nucleótidos. El péptido codificado por el clon N° 29/N° 85 se solapa en 10 posiciones de aminoácidos con la secuencia N-terminal (posiciones 1-33) del Phl p 4 determinada mediante secuenciación de aminoácidos directa, coincidiendo los aminoácidos determinados por ambos métodos.

La secuencia de aminoácidos del Phl p 4 basada en los aminoácidos N-terminales determinados directamente y la secuencia de aminoácidos deducida corresponde a la secuencia especificada bajo la SEC ID N° 2, 4 o 6 del listado de secuencias.

Con el cebador sentido específico N° 88 (Tab. 2) y el cebador antisentido específico N° 86 se prepararon y secuenciaron directamente los productos de la PCR tanto con ADN genómico como con ADNc de *Phleum pratense*.

De este modo es posible descartar errores de la PCR y descubrir variaciones genéticas (polimorfismos de nucleótido individual).

Los intercambios de nucleótido individual encontrados en la secuencia de ADN SEC ID N° 1 se presentan en la Tabla 3. Algunos de estos intercambios de nucleótido individual conducen a aminoácidos modificados. Estos se presentan en la Tabla 4. Además, se secuenciaron los clones de ADN que conducen a aminoácidos divergentes respecto a las secuencias dominantes SEC ID N° 2, 4 y 6 (Tab. 5).

Estas variaciones de aminoácidos deben considerarse isoformas de la molécula de Phl p 4. La existencia de tales isoformas es de esperar a causa del comportamiento isoeléctrico heterogéneo del Phl p 4 natural. Todos los alérgenos de polen conocidos hasta el momento presentan tales isoformas. Que el segmento de ADN, el cual se determinó con los cebadores N° 29 y 86, realmente codifica para una proteína, la cual es idéntica al alérgeno Phl p 4 natural, puede también demostrarse, entre otros, porque para los péptidos internos identificados P3, P4 y P5 (Tab. 1) del Phl p 4 natural se encuentran secuencias peptídicas homólogas en la secuencia de aminoácidos deducida de la molécula de Phl p 4 recombinante según la invención (Fig. 3). La secuencia de aminoácidos del Phl p 4 descrita muestra que se

trata de una molécula básica con un punto isoeléctrico calculado de 8,99 (SEC ID N° 2), 8,80 (SEC ID N° 4) o 9,17 (SEC ID N° 6) y que consta de 500 aminoácidos. La composición de aminoácidos cuantitativa se presenta en la Tabla 6. El peso molecular calculado del Phl p 4 recombinante asciende a 55.762 (SEC ID N° 2), 55.734 (SEC ID N° 4) o 55.624 (SEC ID N° 6) dalton. Esta masa molecular calculada concuerda muy bien con la masa molecular determinada mediante SDS-PAGE del Phl p 4 natural, que fue de 55 kDa (Fahlbusch y col., 1998, Clin. Exp. Allergy 28: 799-807 y Suck y col., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402).

También para los alérgenos del grupo 4 de especies de gramíneas relacionadas se han descrito masas moleculares de entre 50 y 60 kDa (Su y col., 1991, Clin. Exp. Allergy 21: 449-455; Jaggi y col., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89: 342-348; Jaggi y col., 1989, J. Allergy Clin. Immunol. 83: 845-852; Leduc-Brodard y col., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 1065-1072; 14 – 17).

Para la preparación de la proteína de Phl p 4 recombinante se construyó en vectores de expresión la secuencia de ADN según SEC ID N° 1, 3 y/o 5 que codifica para Phl p 4 (p. ej., pProEx, pCro, 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 Phl p 4 recombinante mediante diferentes técnicas de separación, la proteína obtenida se sometió a un proceso de repliegado.

Esta proteína rPhl p 4 así obtenida produce una sola banda en el SDS-PAGE, que se encuentra en la misma zona de peso molecular que el Phl p 4 natural. La reactividad inmunológica del rPhl p 4 se pudo comprobar mediante la reacción con los anticuerpos monoclonales murinos 5H1 y 3C4, que se indujeron con Phl p 4 natural y reaccionaron de forma cruzada con las proteínas homólogas (grupo 4) de *Poaceae* (Fahlbusch y col., 1998, Clin. Exp. Allergy 28:799-807; Gavrović-Jankulović y col., 2000, Invest. Allergol. Clin. Immunol. 10 (6): 361-367) (Fig. 4). El rPhl p 4 reaccionó con anticuerpos IgE de alérgicos que presentan una reactividad IgE comprobada con el Phl p 4 natural. Esta reactividad IgE y, con ello, el efecto como alérgeno pudo comprobarse tanto en el ensayo de puntos, transferencia Western, como también tras la adsorción del alérgeno en placas de microtitulación de poliestireno. La determinación por transferencia Western se muestra en la Figura 5. En la reacción del rPhl p 4 con basófilos de alérgicos al polen de gramíneas reactivos a los alérgenos del grupo 4, éstos se estimulan para una expresión amplificada del marcador de activación CD 203c. Esta activación de basófilos mediante rPhl p 4 muestra claramente que esta molécula también es funcional como alérgeno.

De esta forma, este alérgeno rPhl p 4 puede utilizarse para el diagnóstico altamente específico de alérgicos 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 del rPhl p 4 con linfocitos T de alérgicos al polen de gramíneas se pudo comprobar mediante la estimulación alergenoespecífica 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 nPhl p 4.

Basándose en la secuencia de ADN expuesta del rPhl p 4 se clonaron en vectores de expresión secuencias parciales que codifican para péptidos de 50 a 350 aminoácidos. Estas secuencias parciales cubren secuencialmente la secuencia completa del rPhl p 4, lo que produce solapamientos de al menos 12 aminoácidos. Los péptidos expresados corresponden a fragmentos de Phl p 4. Estos fragmentos de Phl p 4 no reaccionan, o lo hacen en un grado muy bajo, solos o mezclados con anticuerpos IgE de alérgicos, de modo que pueden clasificarse como hipoalérgicos. Por el contrario, la mezcla de estos fragmentos, del mismo modo que el Phl p 4 natural o completamente recombinante, es capaz de estimular linfocitos T de alérgicos al polen de gramíneas con reactividad frente a Phl p 4.

En la figura 4 se muestra como ejemplo la caracterización de dos de estos fragmentos de Phl p 4 que corresponden a los aminoácidos 1-200 y 185-500 mediante la unión a anticuerpos de ratón monoclonales específicos para Phl p 4. El fragmento 185-500 C-terminal reacciona sólo con el anticuerpo monoclonal 5H1, mientras que el fragmento 1-200 N-terminal reacciona claramente con el anticuerpo monoclonal 3C4. En la figura 5 puede verse que el fragmento 185-500 reacciona en menor grado con el IgE de sueros de alérgicos B y C, por lo que es menos alérgico que el fragmento 1-200, el cual presenta una reactividad IgE (hipoalergenidad) aumentada como mínimo frente al suero de pacientes C.

Por lo tanto, es objeto de la presente invención una molécula de ADN descrita previamente o a continuación que codifica para un fragmento 1-200, con los aminoácidos 1-200 del Phl p 4, así como una molécula de ADN que codifica para un fragmento 285-500 con los aminoácidos 285-500 del Phl 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 5 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, uno, varios o todos los restos cisteína del polipéptido correspondiente se intercambiaron por otro aminoácido.

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

Dichos fragmentos o mutantes 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.

10 Si los ácidos nucleicos que codifican para las variantes Phl p 4 hipoalergénicas o el ADN no modificado que codifica para Phl p 4 se ligan con un vector de expresión humano, estas construcciones se pueden emplear también como preparados para una terapia inmune (vacunación con ADN).

Tabla 1 Secuencia de aminoácidos de péptidos de Phl p 4

Preparado	Carga peptídica	SEC ID N°	Aminoácidos
			1 6 11 16 21 26 31
Phl p 4 intacto	P1-a	35	YFPP'P' AAKED FLGXL VKEIP PRLLY AKSSP AYP
	P1-b	36	YFPP'P' AAKED FLGXL VKE-P PRLLY AKSSP
	P1-c	37	YFPXX AAKED FLGXL
	P1-d	38	YFPXX AKKED FLGXL
	P1-e	39	YFPXX AAKDD FLGXL
	P1-f	40	YFPXX LANED F
Fragmento Glu-C	P2	41	SATPF XHRKG VLFNI QYV
	P3	42	GLXYR XLXPE
Fragmento Lys-C	P4	43	KXMGD DHFXA VR
	P5	44	APEGA VDI I
Fragmento CNBr	P6	45	MEPYV SINPV QAYAN Y

15 Tabla 2 Cebadores sentido y antisentido específicos y degenerados que se construyeron sobre la base de secuencias de péptidos y secuencias de ADN de Phl p 4

Cebado N.º	Péptido/ADN	Sentido/antisentido	SEC ID N°	Secuencia de nucleótidos
29	Phl p 4-P1	s	46	YTN TAY GCN AAR WSN WSN CCN GCN TAY CC
30	Phl p 4-P2	s	47	CAY MGN AAR GGN GTN YTN TTY AAY ATM C
37	Phl p 4-P6	as	48	TAR TTN GCR TAN GCY TGN ACN GGR TT
82	Phl p 4-DNA-NYW	s	49	ACT ACT GGT TCG CCC CGG GAG CC

(continuación)

Cebado N.º	Péptido/ADN	Sentido/antisentido	SEC ID N°	Secuencia de nucleótidos
85	Phl p 4-DNA-GLV	as	50	TGA AGT ATT TCT GGC CCC ACA CCA AAC C
86	Phl p 4-DNA-QRL	as	51	CCC TTG GTG ATG GCG AGC CTC TGG
88	Phl p 4-DNA-PSV	s	52	CTC AGT CCT GGG GCA GAC CAT CC

5 Las secuencias de nucleótidos de los cebadores 82, 85, 86 y 88 se representan en el código de 4 caracteres habitual. Para los cebadores 29, 30 y 37 se utiliza el código de ADN IUPAC-IUB; la letra N aquí representa inosina.

Tabla 3 Intercambios de nucleótido individual detectados

Posición en la secuencia	Nucleótido según SEC ID N° 1	SNP detectados
85	T	A
130	C	A
159	G	A
160	A	C
169	G	A
185	C	T
186	C	A
222	G	C
226	G	A
227	G	C
228	T	C
237	C	T
273	C	T
285	C	T
286	C	T
298	G	A
299	A	C
303	C	T

ES 2 384 045 T3

(continuación)

Posición en la secuencia	Nucleótido según SEC ID Nº 1	SNP detectados
309	C	G
318	T	C
320	G	A
333	C	G
348	G	C
369	C	G
409	C	T
411	C	T
420	T	C
421	A	C
423	A	C
424	G	A
425	T	C
456	C	G
462	C	A
522	G	C
525	C	G
567	G	A
618	C	T
655	A	C
657	G	A
662	G	A
680	C	T
684	G	C
690	C	A
691	G	A
693	G	A

# ES 2 384 045 T3

(continuación)

Posición en la secuencia	Nucleótido según SEC ID Nº 1	SNP detectados
703	C	T, A
710	A	C
711	G	A
713	C	T
743	G	A
750	G	A
768	C	T
773	A	C
790	G	A
798	G	C
801	G	A
804	C	G
809	C	A
834	G	C
844	C	A
859	A	T
865	A	G
879	G	C
895	G	C
900	G	C, A
918	G	A
961	A	G
962	A	C
964	A	C
987	G	C
994	A	T
1020	G	A

## ES 2 384 045 T3

(continuación)

Posición en la secuencia	Nucleótido según SEC ID Nº 1	SNP detectados
1023	G	C
1036	G	C
1040	C	T
1041	G	C
1047	C	A
1051	A	G
1052	G	A, C
1053	G	A, C, T
1056	G	C
1069	T	C
1073	G	A
1084	C	G
1086	G	C
1090	C	T
1098	G	C
1151	G	C
1152	G	C
1155	G	C
1161	G	C
1185	C	G
1229	G	C
1233	G	C
1239	A	C
1240	T	C
1242	G	C
1257	G	C
1266	C	T

ES 2 384 045 T3

(continuación)

Posición en la secuencia	Nucleótido según SEC ID Nº 1	SNP detectados
1269	C	T
1278	A	C, G
1305	C	G
1308	C	T
1311	C	A
1335	G	C
1350	G	C
1357	T	A
1359	A	G
1370	G	C
1377	T	C
1378	T	A
1379	T	A
1383	G	C
1398	C	T
1411	T	C
1414	C	G
1425	C	A
1428	C	T
1443	G	C
1449	C	T
1464	G	A
1485	G	A
1498	A	C

## ES 2 384 045 T3

Tabla 4 Intercambios de aminoácidos, como consecuencia de intercambios de nucleótido individual

Posición en la secuencia	Aminoácido según SEC ID N° 2	Intercambio detectado
6	A	L
7	A	K
8	K	N
9	E	D
29	S	T
54	I	L
57	V	I
62	A	V
76	G	T, N, S
100	E	T
107	S	N
137	H	Y
141	T	P
142	V	A, T
189	T	K
219	K	Q
221	R	K
227	P	L
231	V	I
235	P	T, S
237	K	T
238	A	V
248	R	K
258	D	A
264	V	I
270	T	K
282	Q	K

ES 2 384 045 T3

(continuación)

Posición en la secuencia	Aminoácido según SEC ID N° 2	Intercambio detectado
287	M	L
289	S	G
299	A	P
321	N	A
322	I	L
332	T	S
346	E	Q
347	P	L
351	R	E, T
357	F	L
358	S	N
362	L	V
364	P	S
384	W	S
410	G	A
419	E	D
456	F	Y
457	S	A, N
460	L	K
468	K	M
472	Q	E
498	K	Q

## ES 2 384 045 T3

Tabla 5 Posiciones de aminoácidos divergentes en clones de PhI p 4 recombinantes individuales en comparación con SEC ID N° 2

Ejemplo	Posiciones divergentes*
Clon 1	L54, I57, V62, S76, T100, N107, Y137, P141, T142, K189, Q219, K221, L227, I231, S235, T237, V238, K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, L357, N358, V362, S384, A410, D419, Y456, A457, K460, E472
Clon 2	L54, I57, V62, T76, T100, N107, Y137, P141, T142, K189, Q219, K221, I231, S235, T237, V238, K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, L357, N358, V362, S384, A410, D419, Y456, A457, K460, E472
Clon 3	P141, K282, L287, P299, L347, E351
Clon 4	G289, A410, D419, Y456, A457, K460, E472
Clon 5	L347, E351, S384, A410, D419, Y456, A457, K460, E472
Clon 6	N107, Y137, P141, T142, K189, Q219, K221, I231, S235, T237, V238, K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, L357, N358, V362, S384, A410, D419, Y456, A457, K460
Clon 7	K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, L357, N358, V362, S384
Clon 8	Q219, K221, I231, S235, T237, V238, K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, E351
Clon 9	M231, T246, A251, C263, G289, L307, L309, E334
Clon 10	Q219, K221, I231, S235, T237, M238, V242, V246, K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, N358, V362, S384, inserción GA entre posición 407 y 408, N452, Y456, A457, K460, E472
Clon 11	Inserción GA entre posición 407 y 408

\*[aminoácidos según SEC ID N° 2 / posición en la secuencia / aminoácidos divergentes]

5 Tabla 6 Composición de aminoácidos del PhI p 4

Aminoácidos	Cantidad	% en peso
Cargados	138/138/138	33,89/33,86/33,93
Ácidos	45/46/43	9,82/10,05/9,38
Básicos	54/53/55	13,67/13,39/13,78
Polares	120/119/124	24,88/24,71/25,89
Hidrófobos	180/180/180	35,64/35,66/35,43
A Ala	40/40/41	5,10/5,10/5,24
C Cys	5/5/5	0,92/0,93/0,93

ES 2 384 045 T3

(continuación)

Aminoácidos	Cantidad	% en peso
D Asp	24/24/24	4,95/4,96/4,97
E Glu	21/22/19	4,86/5,10/4,41
F Phe	24/24/22	6,33/6,34/5,82
G Gly	42/42/40	4,30/4,30/4,10
H His	10/10/9	2,46/2,46/2,22
I Ile	29/29/30	5,88/5,89/6,10
K Lys	29/29/33	6,67/6,67/7,60
L Leu	33/33/35	6,70/6,70/7,12
M Met	11/11/10	2,59/2,59/2,36
N Asn	22/22/23	4,50/4,50/4,72
P Pro*	38/39/39	6,62/6,80/6,81
Q Gln	15/15/15	3,45/3,45/3,46
R Arg	25/24/22	7,00/6,73/6,18
S Ser	32/32/33	5,00/5,00/5,17
T Thr	22/21/22	3,99/3,81/4,00
V Val	41/41/40	7,29/7,29/7,13
W Trp	13/13/12	4,34/4,34/4,02
Y Tyr	24/24/26	7,02/7,03/7,63

\* incluido hidroxiprolina

5 Los valores se indican para las tres secuencias dominantes en el orden SEC ID N° 2 / SEC ID N° 4 / SEC ID N° 6

# ES 2 384 045 T3

## Listado de secuencias

<110> Merck Patent GmbH

<120> **Secuencia de ADN y preparación del alérgeno del polen de gramíneas Phl p 4 mediante métodos recombinantes**

<130> P 02/101

<140> EP 02 013953.1

<141> 2002-06-25

<160> 52

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1503

<212> **ADN**

<213> Phleum pratense

<220>

<221> artificial\_DNA\_sequence

<222> (1)..(69)

<223> **Secuencia de ADN derivada de la proteína secuenciada**

<220>

<221> native\_DNA\_sequence

<222> (70)..(1503)

<223>

ES 2 384 045 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1503)

<223>

<400> 1

tac ttc ccg ccg gct gct aaa gaa gac ttc ctg ggt tgc ctg gtt Tyr Phe Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val 1 5 10 15	48
aaa gaa atc ccg ccg cgt ctg ttg tac gcg aaa tcg tcg ccg gcg tat Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr 20 25 30	96
ccc tca gtc ctg ggg cag acc atc cgg aac tcg cgg 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 atc tac atc gtc acc ccc acc aac gcc tcc cac Asp Asn Val Lys Pro Ile Tyr Ile Val Thr Pro Thr Asn Ala Ser His 50 55 60	192
atc cag tcc gcc gtg gtg tgc ggc cgc cgg cac ggt gtc cgc atc cgc Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg His Gly Val Arg Ile Arg 65 70 75 80	240
gtg cgc agc ggc ggg cac gac tac gag ggc ctc tcg tac cgg 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 gag ttc gcc gtc gtc gac ctt agc aag atg cgg gcc gtg Gln Pro Glu Glu Phe Ala Val Val Asp Leu Ser Lys Met Arg Ala Val 100 105 110	336
tgg gtg gac ggg aag gcc cgc acg gcg tgg gtc 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 cac aag gcg agt aca gtg ctg gcg Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile His Lys Ala Ser Thr Val Leu Ala 130 135 140	432
ttc ccg gcc ggc gtg tgc ccg acc atc ggc 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 gcg gcc 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 acg ctg cac gac Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Thr Leu His Asp 180 185 190	576
aag aag tcc atg ggc gac gac cat ttc tgg gcc gtc agg ggc ggc ggg Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly 195 200 205	624

ES 2 384 045 T3

ggc gag agc ttc ggc atc gtg gtc gcg tgg aag gtg agg ctc ctg ccg Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ala Trp Lys Val Arg Leu Leu Pro 210 215 220	672
gtg ccg ccc acg gtg acc gtg ttc aag atc ccc aag aag gcg agc gag Val Pro Pro Thr Val Thr Val Phe Lys Ile Pro Lys Lys Ala Ser Glu 225 230 235 240	720
ggc gcc gtg gac atc atc aac agg tgg cag gtg gtc gcg ccg cag ctc Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Arg Trp Gln Val Val Ala Pro Gln Leu 245 250 255	768
ccc gac gac ctc atg atc cgc gtc atc gcg cag ggc ccc acg gcc acg Pro Asp Asp Leu Met Ile Arg Val Ile Ala Gln Gly Pro Thr Ala Thr 260 265 270	816
ttc gag gcc atg tac ctg ggc acc tgc caa acc ctg acg ccg atg atg Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Gln Thr Leu Thr Pro Met Met 275 280 285	864
agc agc aag ttc ccg gag ctc ggc atg aac gcc tcg cac tgc aac gag Ser Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Ala Ser His Cys Asn Glu 290 295 300	912
atg tcg 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
aac atc gag gac gac ctc ctc aac cgg aac aac acc ttc aag ccc ttc Asn Ile Glu Asp Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Thr Phe Lys Pro Phe 325 330 335	1008
gcc gaa tac aag tcg gac tac gtc tac gag ccg ttc ccc aag agg gtg Ala Glu Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Glu Pro Phe Pro Lys Arg Val 340 345 350	1056
tgg gag cag atc ttc agc acc tgg ctc ctg aag ccc ggc gcg ggg atc Trp Glu Gln Ile Phe Ser Thr Trp Leu Leu Lys Pro Gly Ala Gly Ile 355 360 365	1104
atg atc ttc gac ccc tac ggc gcc acc atc agc gcc acc ccg gag tgg Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Trp 370 375 380	1152
gcg acg ccg ttc cct cac cgc aag ggc gtc ctc ttc aac atc cag tac Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr 385 390 395 400	1200
gtc aac tac tgg ttc gcc ccg gga gcc ggc gcg gcg cca ttg tcg tgg Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Gly Ala Ala Pro Leu Ser Trp 405 410 415	1248
agc aag gag atc tac aac tac atg gag cca tac gtg agc aag aac ccc Ser Lys Glu Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro 420 425 430	1296
agg cag gcc tac gcc aac tac agg gac atc gac ctc ggg agg aac gag Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu 435 440 445	1344
gtg gtg aac gac gtc tcc acc ttc agc agc ggt ttg gtg tgg ggc cag	1392



ES 2 384 045 T3

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 Thr 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 Lys Val Arg Leu Leu Pro  
 210 215 220

Val Pro Pro Thr Val Thr Val Phe Lys Ile Pro Lys Lys Ala Ser Glu  
 225 230 235 240

Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Arg Trp Gln Val Val Ala Pro Gln Leu  
 245 250 255

Pro Asp Asp Leu Met Ile Arg Val Ile Ala Gln Gly Pro Thr Ala Thr  
 260 265 270

Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Gln Thr Leu Thr Pro Met Met  
 275 280 285

Ser Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Ala 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

Asn Ile Glu Asp 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 Arg Val  
 340 345 350

Trp Glu Gln Ile Phe Ser Thr Trp Leu Leu Lys Pro Gly Ala Gly Ile  
 355 360 365

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

ES 2 384 045 T3

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 Asp Val Ser Thr Phe Ser Ser Gly Leu Val Trp Gly Gln  
 450 455 460

Lys Tyr Phe Lys Gly Asn Phe Gln 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> 3

<211> 1503

<212> DNA  
 ADN

<213> Phleum pratense

<220>

<221> artificial\_DNA\_sequence

<222> (1)..(69)

<223> DNA sequence derived from sequenced protein  
 Secuencia de ADN derivada de la proteina secuenciada

<220>

<221> native\_DNA\_sequence

<222> (70)..(1503)

<223>

ES 2 384 045 T3

<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 Tyr Phe Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val 1 5 10 15	48
aaa gaa atc ccg ccg cgt ctg ttg tac gcg aaa tcg tcg ccg gcg tat Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr 20 25 30	96
ccc tca gtc ctg ggg cag acc atc cgg aac tcg cgg 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 atc tac atc gtc acc ccc acc aac gcc tcc cac Asp Asn Val Lys Pro Ile Tyr Ile Val Thr Pro Thr Asn Ala Ser His 50 55 60	192
atc cag tcc gcc gtg gtg tgc ggc cgc cgg cac ggt gtc cgc atc cgc Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg His Gly Val Arg Ile Arg 65 70 75 80	240
gtg cgc agc ggc ggg cac gac tac gag ggc ctc tcg tac cgg 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 gag ttc gcc gtc gtc gac ctt agc aag atg cgg gcc gtg Gln Pro Glu Glu Phe Ala Val Val Asp Leu Ser Lys Met Arg Ala Val 100 105 110	336
tgg gtg gac ggg aag gcc cgc acg gcg tgg gtc 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 cac aag gcg agt cca gtg ctg gcg Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile His Lys Ala Ser Pro Val Leu Ala 130 135 140	432
ttc ccg gcc ggc gtg tgc ccg acc atc ggc 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 gcg gcc 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 acg ctg cac gac Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Thr Leu His Asp 180 185 190	576
aag aag tcc atg ggc gac gac cat ttc tgg gcc gtc agg ggc ggc ggg Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly 195 200 205	624

ES 2 384 045 T3

ggc gag agc ttc ggc atc gtg gtc gcg tgg aag gtg agg ctc ctg ccg Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ala Trp Lys Val Arg Leu Leu Pro 210 215 220	672
gtg ccg ccc acg gtg acc gtg ttc aag atc ccc aag aag gcg agc gag Val Pro Pro Thr Val Thr Val Phe Lys Ile Pro Lys Lys Ala Ser Glu 225 230 235 240	720
ggc gcc gtg gac atc atc aac agg tgg cag gtg gtc gcg ccg cag ctc Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Arg Trp Gln Val Val Ala Pro Gln Leu 245 250 255	768
ccc gac gac ctc atg atc cgc gtc atc gcg cag gcc ccc acg gcc acg Pro Asp Asp Leu Met Ile Arg Val Ile Ala Gln Gly Pro Thr Ala Thr 260 265 270	816
ttc gag gcc atg tac ctg ggc acc tgc caa acc ctg acg ccg atg atg Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Gln Thr Leu Thr Pro Met Met 275 280 285	864
agc agc aag ttc ccc gag ctc ggc atg aac gcc tcg cac tgc aac gag Ser Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Ala Ser His Cys Asn Glu 290 295 300	912
atg tcg tgg atc cag tcc atc ccc ttc gtc cac ctc gcc cac agg gac Met Ser Trp Ile Gln Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp 305 310 315 320	960
aac atc gag gac gac ctc ctc aac cgg aac aac acc ttc aag ccc ttc Asn Ile Glu Asp Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Thr Phe Lys Pro Phe 325 330 335	1008
gcc gaa tac aag tcg gac tac gtc tac gag ccg ttc ccc aag gaa gtg Ala Glu Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Glu Pro Phe Pro Lys Glu Val 340 345 350	1056
tgg gag cag atc ttc agc acc tgg ctc ctg aag ccc gcc gcg ggg atc Trp Glu Gln Ile Phe Ser Thr Trp Leu Leu Lys Pro Gly Ala Gly Ile 355 360 365	1104
atg atc ttc gac ccc tac ggc gcc acc atc agc gcc acc ccg gag tgg Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Trp 370 375 380	1152
gcg acg ccg ttc cct cac cgc aag gcc gtc ctc ttc aac atc cag tac Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr 385 390 395 400	1200
gtc aac tac tgg ttc gcc ccg gga gcc gcc gcg gcg cca ttg tcg tgg Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Gly Ala Ala Pro Leu Ser Trp 405 410 415	1248
agc aag gag atc tac aac tac atg gag cca tac gtg agc aag aac ccc Ser Lys Glu Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro 420 425 430	1296
agg cag gcc tac gcc aac tac agg gac atc gac ctc ggg agg aac gag Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu 435 440 445	1344
gtg gtg aac gac gtc tcc acc ttc agc agc ggt ttg gtg tgg gcc cag	1392

ES 2 384 045 T3

Val	Val	Asn	Asp	Val	Ser	Thr	Phe	Ser	Ser	Gly	Leu	Val	Trp	Gly	Gln		
	450					455					460						
aaa	tac	ttc	aag	ggc	aat	ttc	cag	agg	ctc	gcc	atc	acc	aag	ggc	aag		1440
Lys	Tyr	Phe	Lys	Gly	Asn	Phe	Gln	Arg	Leu	Ala	Ile	Thr	Lys	Gly	Lys		
465					470					475					480		
gtg	gat	ccc	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>	4																
<211>	500																
<212>	PRT																
<213>	Phleum pratense																
<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	Ile	Tyr	Ile	Val	Thr	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser	His		
	50					55					60						
Ile	Gln	Ser	Ala	Val	Val	Cys	Gly	Arg	Arg	His	Gly	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	Glu	Phe	Ala	Val	Val	Asp	Leu	Ser	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	His	Lys	Ala	Ser	Pro	Val	Leu	Ala		
	130					135					140						

ES 2 384 045 T3

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 Thr 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 Lys Val Arg Leu Leu Pro  
 210 215 220  
 Val Pro Pro Thr Val Thr Val Phe Lys Ile Pro Lys Lys Ala Ser Glu  
 225 230 235 240  
 Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Arg Trp Gln Val Val Ala Pro Gln Leu  
 245 250 255  
 Pro Asp Asp Leu Met Ile Arg Val Ile Ala Gln Gly Pro Thr Ala Thr  
 260 265 270  
 Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Gln Thr Leu Thr Pro Met Met  
 275 280 285  
 Ser Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Ala 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  
 Asn Ile Glu Asp 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 Glu Val  
 340 345 350  
 Trp Glu Gln Ile Phe Ser Thr Trp Leu Leu Lys Pro Gly Ala Gly Ile  
 355 360 365  
 Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Trp  
 370 375 380

ES 2 384 045 T3

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 Asp Val Ser Thr Phe Ser Ser Gly Leu Val Trp Gly Gln  
450 455 460

Lys Tyr Phe Lys Gly Asn Phe Gln 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> DNA  
ADN

<213> Phleum pratense

<220>

<221> artificial\_DNA\_sequence

<222> (1)..(69)

<223> DNA sequence derived from sequenced protein  
Secuencia de ADN derivada de la proteína secuenciada

<220>

<221> native\_DNA\_sequence

<222> (70)..(1503)

<223>

ES 2 384 045 T3

<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	
tgg gtg gac ggc aag gcc cgc acg gcg tgg gtg gac tcc ggc gcg cag	384
Trp Val Asp Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln	
115 120 125	
ctc ggc gag ctc tac tac gcc atc tat aag gcg agc ccc acg ctg gcg	432
Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile Tyr Lys Ala Ser Pro Thr Leu Ala	
130 135 140	
ttc ccg gcc ggc gtg tgc ccg acg atc gga gtg ggc ggc aac ttc gcg	480
Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Phe Ala	
145 150 155 160	
ggc ggc ggc ttc ggc atg ctg ctg cgc aag tac ggc atc gcc gcg gag	528
Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu	
165 170 175	
aac gtc atc gac gtg aag ctc gtc gac gcc aac ggc aag ctg cac gac	576
Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Lys Leu His Asp	
180 185 190	
aag aag tcc atg ggc gac gac cat ttc tgg gcc gtc agg ggc ggc ggg	624
Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly	
195 200 205	

ES 2 384 045 T3

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 ggg 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 ggg atc Trp Glu Gln Ile Leu Asn Thr Trp Leu Val Lys Pro Gly Ala Gly Ile 355 360 365	1104
atg atc ttc gac ccc tac ggc gcc acc atc agc gcc acc ccg gag tcc Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Ser 370 375 380	1152
gcc acg ccc ttc cct cac cgc aag ggc gtc ctc ttc aac atc cag tac Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr 385 390 395 400	1200
gtc aac tac tgg ttc gcc ccg gga gcc gcc gcc gcg ccc ctc tcg tgg Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Ala Ala Ala Pro Leu Ser Trp 405 410 415	1248
agc aag gac atc tac aac tac atg gag ccc tac gtg agc aag aac ccc Ser Lys Asp Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro 420 425 430	1296
agg cag gcg tac gca aac tac agg gac atc gac ctc ggc agg aac gag Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu 435 440 445	1344
gtg gtc aac gac gtc tcc acc tac gcc agc ggc aag gtc tgg ggc cag	1392

ES 2 384 045 T3

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> Phleum pratense

<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					
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						

ES 2 384 045 T3

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

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

ES 2 384 045 T3

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> 10

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> undetermined amino acid  
aminoácido indeterminado

<400> 7

Ile Val Ala Leu Pro Xaa Gly Met Leu Lys  
1 5 10

<210> 8

<211> 14

ES 2 384 045 T3

<212> PRT

<213> Lolium perenne

<400> 8

Phe Leu Glu Pro Val Leu Gly Leu Ile Phe Pro Ala Gly Val  
1 5 10

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Lolium perenne

<400> 9

Gly Leu Ile Glu Phe Pro Ala Gly Val  
1 5

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Dactylus glomerata

<400> 10

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

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Dactylus glomerata

<400> 11

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

<210> 12

ES 2 384 045 T3

<211> 17

<212> PRT

<213> *Dactylus glomerata*

<400> 12

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

Tyr

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> *Dactylus glomerata*

<400> 13

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

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> *Cynodon dactylon*

<400> 14

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

<210> 15

<211> 22

<212> PRT

<213> *Cynodon dactylon*

<400> 15

ES 2 384 045 T3

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> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 16

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

<210> 17

<211> 24

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 17

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> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 18

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

<210> 19

ES 2 384 045 T3

<211> 15

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 19

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

<210> 20

<211> 19

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> undetermined amino acid  
aminoácido indeterminado

<400> 20

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

Gly Lys Tyr

<210> 21

<211> 23

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 21

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

ES 2 384 045 T3

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 22

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

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 23

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

<210> 24

<211> 36

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 24

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> 25

<211> 149

ES 2 384 045 T3

<212> DNA  
ADN

<213> Phleum pratense

<400> 25  
caccggaagg gggtgctggt caacatccag tacgtcaact actggttcgc cccgggagcc 60  
ggcgcggcgc cattgtcgtg gagcaaggag atctacaact acatggagcc gtacgtgagc 120  
aaggaccccg tccaggccta cgccaacta 149

<210> 26

<211> 299

<212> DNA  
ADN

<213> Phleum pratense

<400> 26  
actactgggt cgccccggga gccggcgcgg cgccattgtc gtggagcaag gagatctaca 60  
actacatgga gccatacgtg agcaagaacc ccaggcaggc ctacgccaac tacagggaca 120  
tcgacctcgg gaggaacgag gtggtgaacg acgtctccac cttcagcagc ggtttggtgt 180  
ggggccagaa atacttcaag ggcaacttcc agaggctcgc catcaccaag ggcaagggtg 240  
atcccccgga ctacttcagg aacgagcaga gcatcccgcc gctcatcaaa aagtactga 299

<210> 27

<211> 33

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> undetermined amino acid  
aminoácido indeterminado

<400> 27

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

ES 2 384 045 T3

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

Pro

<210> 28

<211> 18

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> undetermined amino acid  
aminoácido indeterminado

<400> 28

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

Tyr Val

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(8)

<223> undetermined amino acid  
aminoácido indeterminado

<400> 29

Gly Leu Xaa Tyr Arg Xaa Leu Xaa Pro Glu  
1 5 10

ES 2 384 045 T3

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(9)

<223> undetermined amino acid  
aminoacido non determinato

<400> 30

Lys Xaa Met Gly Asp Asp His Phe Xaa Ala Val Arg  
1 5 10

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 31

Ala Pro Glu Gly Ala Val Asp Ile Ile  
1 5

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 32

Met Glu Pro Tyr Val Ser Ile Asn Pro Val Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr  
1 5 10 15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> undetermined amino acid  
aminoácido indeterminado

<400> 33

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

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 34

Leu	Tyr	Ala	Lys	Ser	Ser	Pro	Ala	Tyr	Pro
1			5						10

<210> 35

<211> 33

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> undetermined amino acid  
aminoácido indeterminado

<400> 35

ES 2 384 045 T3

Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Xaa 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

<210> 36

<211> 29

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> undetermined amino acid  
aminoácido indeterminado

<400> 36

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

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

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(14)

<223> undetermined amino acid  
aminoácido indeterminado

ES 2 384 045 T3

<400> 37

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

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(14)

<223> undetermined amino acid  
aminoácido indeterminado

<400> 38

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

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(14)

<223> undetermined amino acid  
aminoácido indeterminado

<400> 39

Tyr Phe Pro Xaa Xaa Ala Ala Lys Asp Asp Phe Leu Gly Xaa Leu  
1 5 10 15

<210> 40

<211> 11

ES 2 384 045 T3

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> undetermined amino acid  
aminoácido indeterminado

<400> 40

Tyr Phe Pro Xaa Xaa Leu Ala Asn Glu Asp Phe  
1 5 10

<210> 41

<211> 18

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> undetermined amino acid  
aminoácido indeterminado

<400> 41

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

Tyr Val

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(8)

<223> undetermined amino acid  
aminoácido indeterminado

<400> 42

Gly Leu Xaa Tyr Arg Xaa Leu Xaa Pro Glu  
1 5 10

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(9)

<223> undetermined amino acid  
aminoácido indeterminado

<400> 43

Lys Xaa Met Gly Asp Asp His Phe Xaa Ala Val Arg  
1 5 10

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Phleum pratense.

<400> 44

Ala Pro Glu Gly Ala Val Asp Ile Ile  
1 5

<210> 45

<211> 16

ES 2 384 045 T3

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 45

Met Glu Pro Tyr Val Ser Ile Asn Pro Val Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr  
1                   5                   10                   15

<210> 46

<211> 29

<212> DNA  
ADN

<213> Phleum pratense

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(29)

<223> 'n' means inosin  
'n' significa inosina

<400> 46

ytntaygcna arwsnwsncc ngcntaycc

29

<210> 47

<211> 28

<212> DNA  
ADN

<213> Phleum pratense

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(28)

<223> 'n' means inosin  
'n' significa inosina

<400> 47

caymgnarg gngtnytntt yaayatmc

28

<210> 48

<211> 26  
 <212> DNA  
 ADN  
 <213> Phleum pratense  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(26)  
 <223> 'n' means inosin  
 'n' significa inosina  
  
 <400> 48 26  
 tarttngcrt angcytgnac nggrtt  
  
 <210> 49  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 ADN  
 <213> Phleum pratense  
  
 <400> 49 23  
 actactgggtt cgccccggga gcc  
  
 <210> 50  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 ADN  
 <213> Phleum pratense  
  
 <400> 50 28  
 tgaagtattt ctggccccac accaaacc  
  
 <210> 51  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 ADN  
 <213> Phleum pratense  
  
 <400> 51 24  
 cccttggtga tggcgagcct ctgg

ES 2 384 045 T3

<210> 52

<211> 23

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 52

ctcagtcctg ggcagacca tcc

23

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN correspondiente a una secuencia de nucleótidos, seleccionada de un grupo consistente en SEC ID N° 1, SEC ID N° 3 y SEC ID N° 5.
- 5 2. Una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1 y empieza con la posición 70, la cual codifica para un polipéptido con las características del alérgeno mayor Phl p 4 de *Phleum pratense*.
- 10 3. Una molécula de ADN con una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1 que empieza con la posición 70, la cual codifica para un polipéptido con las características del alérgeno mayor Phl p 4 de *Phleum pratense*.
4. Una molécula de ADN que hibrida con una molécula de ADN según la reivindicación 1 o 2 bajo condiciones rigurosas y deriva de secuencias de ADN de la especie *Poaceae*.
- 15 5. Una molécula de ADN, que codifica para un polipéptido, que se caracteriza porque el polipéptido se selecciona del grupo consistente en
- un polipéptido con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente en SEC ID N° 2, SEC ID N° 4 y SEC ID N° 6.
  - un polipéptido con la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 2 con divergencias en los aminoácidos según los clones del 1 al 11:
    - Clon 1 L54, I57, V62, S76, T100, N107, Y137, P141, T142, K189, Q219, K221, L227, 1231, S235, T237, V238, K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, L357, N358, V362, S384, A410, D419, Y456, A457, K460, E472,
    - 25 – Clon 2: L54, I57, V62, T76, T100, N107, Y137, P141, T142, K189, Q219, K221, 1231, S235, T237, V238, K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, L357, N358, V362, S384, A410, D419, Y456, A457, K460, E472,
    - Clon 3: P141, K282, L287, P299, L347, E351,
    - Clon 4: G289, A410, D419, Y456, A457, K460, E472,
    - Clon 5: L347, E351, S384, A410, D419, Y456, A457, K460, E472,
    - 30 – Clon 6: N107, Y137, P141, T142, K189, Q219, K221,1231, S235, T237, V238, K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, L357, N358, V362, S384, A410, D419, Y456, A457, K460,
    - Clon 7: K248, A258,1264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, L357, N358, V362, S384,
    - 35 – Clon 8: Q219, K221,1231, S235, T237, V238, K248, A258,1264, K270, K282, L287, P299, E351,
    - Clon 9: M231, T246, A251, C263, G289, L307, L309, E334,
    - Clon 10: Q219, K221, I231, S235, T237, M238, V242, V246, K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, N358, V362, S384, inserción de GA entre las posiciones 407 y 408, N452, Y456, A457, K460, E472,
    - 40 – Clon 11: Inserción de GA entre las posiciones 407 y 408.
6. Una molécula de ADN, correspondiente a una secuencia parcial o una combinación de secuencias parciales según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 5, la cual codifica para un fragmento de Phl p 4 inmunomodulador y reactivo frente a células T, seleccionado del grupo consistente en
- fragmento 1-200, con los aminoácidos 1-200 del Phl p 4 y
  - 45 – fragmento 185-500, con los aminoácidos 185-500 del Phl p 4.
7. Una molécula de ADN, correspondiente a una secuencia de nucleótidos según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 6, que codifica para un fragmento inmunomodulador y reactivo frente a células T, caracterizada porque dicha secuencia de nucleótidos se modificó de forma dirigida mediante un intercambio dirigido de una, varias o todas las cisteínas del polipéptido frente a otro aminoácido.
- 50 8. Un vector de expresión de ADN recombinante que contiene una molécula de ADN según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 7, unido funcionalmente con una secuencia control de

expresión.

9. Un organismo huésped, transformado con una molécula de ADN según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 7 o un vector de expresión según la reivindicación 8.
- 5 10. Un polipéptido preparado de forma recombinante, el cual es codificado por una secuencia de ADN según una o varias de las reivindicaciones 1, 3, 4, 5, 6, y 7.

**Fig. 1      Secuencia de ADN interna del gen de Phi p 4**

C A C C G G A A G G G G G T G C T G T T C A A C A T C C A G T A C G T C A A  
C T A C T G G T T C G C C C C G G G A G C C G G C G C G G C C A T T G T  
C G T G G A G C A A G G A G A T C T A C A A C T A C A T G G A G C C G T A C  
G T G A G C A A G G A C C C C G T C C A G G C C T A C G C C A A C T A

**Fig. 2 Extremo 3' de la secuencia de ácidos nucleicos del gen de Phi p 4**

A C T A C T G G T T C G C C C C G G G A G C C G G C G C G G C  
 G C C A T T G T C G T G G A G C A A G G A G A T C T A C A A C  
 T A C A T G G A G C C A T A C G T G A G C A A G A A C C C C A  
 G G C A G G C C T A C G C C A A C T A C A G G G A C A T C G A  
 C C T C G G G A G G A A C G A G G T G G T G A A C G A C G T C  
 T C C A C C T T C A G C A G C G G T T T G G T G T G G G G C C  
A G A A A T A C T T C A A G G G C A A C T T C C A G A G G C T  
C G C C A T C A C C A A G G G C A A G G T G G A T C C C A C C  
G A C T A C T T C A G G A A C G A G C A G A G C A T C C C G C  
 C G C T C A T C A A A A A G T A C T G A

**Fig. 3 Localización de los péptidos de Phl p 4 en la secuencia de aminoácidos deducida del alérgeno Phl p 4**

1 Y F P P P A A K E D F L G C L V K E I P P R L L Y A K S S P A Y P S V L G Q T I  
Y F P P P A A K E D F L G X L V K E I P P R L L Y A K S S P A Y P  
***Péptido P1***

41 R N S R W S S P D N V K P I Y I V T P T N A S H I Q S A V V C G R R H G V R I R

81 V R S G G H D Y E G L S Y R S L Q P E E F A V V D L S K M R A V W V D G K A R T  
G L X Y R X L X P E  
***Péptido P3***

121 A W V D S G A Q L G E L Y Y A I H K A S T V L A F P A G V C P T I G V G G N F A

161 G G G F G M L L R K Y G I A A E N V I D V K L V D A N G T L H D K K S M G D D H  
K X M G D D H  
***Péptido P4***

201 F W A V R G G G G E S F G I V V A W K V R L L P V P P T V T V F K I P K K A S E  
F X A V R A P E

241 G A V D I I N R W Q V V A P Q L P D D L M I R V I A Q G P T A T F E A M Y L G T  
G A V D I I  
***Péptido P5***

281 C Q T L T P M M S S K F P E L G M N A S H C N E M S W I Q S I P F V H L G H R D

321 N I E D D L L N R N N T F K P F A E Y K S D Y V Y E P F P K R V W E Q I F S T W

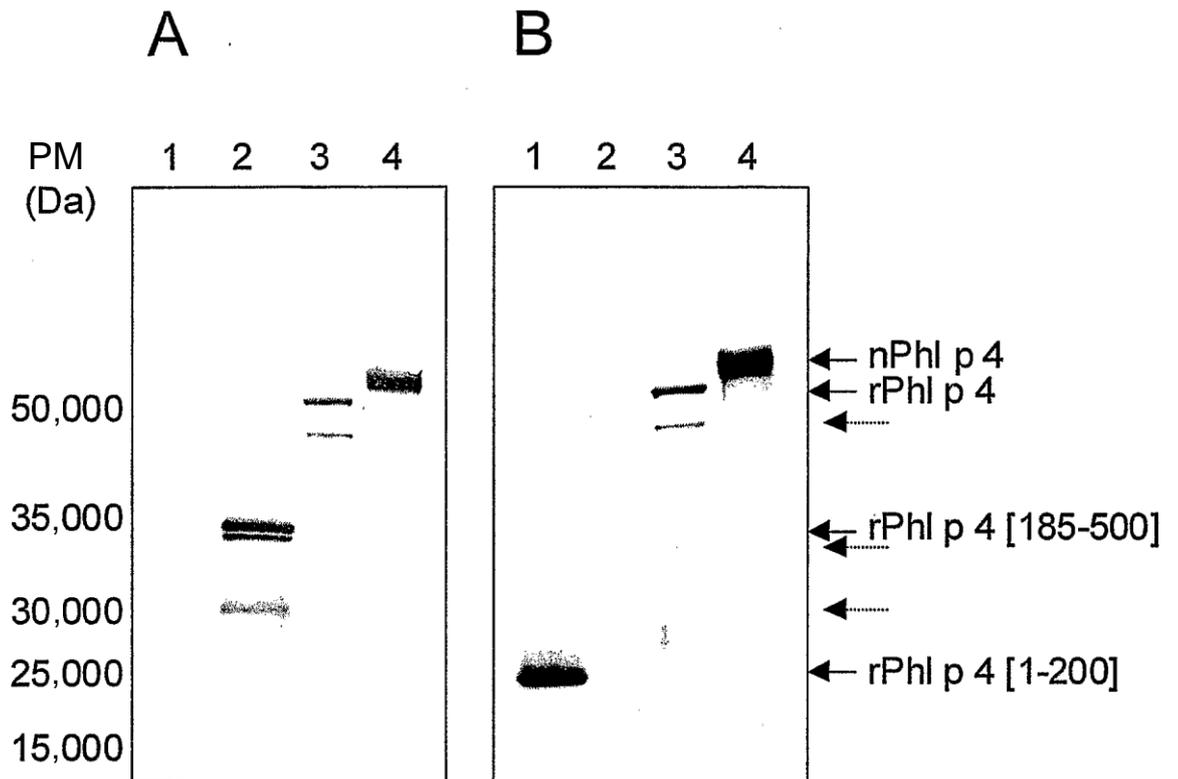
361 L L K P G A G I M I F D P Y G A T I S A T P E W A T P F P H R K G V L F N I Q Y  
S A T P F X H R K G V L F N I Q Y  
***Péptido P2***

401 V N Y W F A P G A G A A P L S W S K E I Y N Y M E P Y V S K N P R Q A Y A N Y R  
V M E P Y V S I N P V Q A Y A N Y  
***Péptido P6***

441 D I D L G R N E V V N D V S T F S S G L V W G Q K Y F K G N F Q R L A I T K G K

481 V D P T D Y F R N E Q S I P P L I K K Y .

**Fig. 4** Determinación de la identidad del Phl p 4 recombinante (rPhl p 4) mediante los anticuerpos monoclonales específicos 5H1 (transferencia A) y 3C4 (transferencia B) por transferencia Western



**Fig. 5** Determinación de la reactividad del Phl p 4 recombinante (rPhl p 4) con IgE de sueros de alérgicos al polen de gramíneas por transferencia Western

