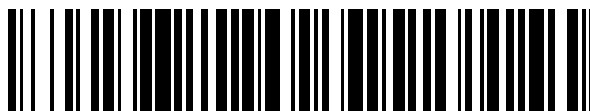


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 540**

51 Int. Cl.:

C12N 15/29 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A61K 39/36 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2001 E 01940630 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2012 EP 1285067**

54 Título: **Clonación y secuenciación del alérgeno Dac g5 y del polen de Dactylis glomerata, su preparación y su utilización**

30 Prioridad:

29.05.2000 FR 0006857

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.02.2013

73 Titular/es:

**SEITA GROUPE ALTADIS (50.0%)
182-188, AVENUE DE FRANCE
75639 PARIS CEDEX 13, FR y
STALLERGENES SA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VAN REE, RONALD;
VAN OORT, ERICA;
BONNEAU, CAROLINE;
FAYE, LOIC y
GOMORD, VÉRONIQUE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 396 540 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

Clonación y secuenciación del alérgeno Dac g5 y del polen de *Dactylis glomerata*, su preparación y su utilización.

5 La presente invención tiene por objeto la clonación y la secuenciación de alérgenos de polen de *Dactylis glomerata* y más particularmente del alérgeno Dac g5. La presente invención tiene asimismo por objeto la producción de este alérgeno recombinante para ser incorporado en preparaciones útiles para el diagnóstico o el tratamiento de las alergias.

10 Los alérgenos son las proteínas más abundantes del polen y constituyen la causa principal de alergias en los climas templados. El alérgeno objeto de la presente invención es Dac g5 del polen de *Dactylis glomerata*.

15 Ciertos individuos predispuestos genéticamente se vuelven hipersensibles (alérgicos) a unos antígenos que proceden de fuentes medioambientales muy variadas. Los antígenos capaces de inducir una reacción de hipersensibilización inmediata o retardada se denominan alérgenos. Los alérgenos pueden en particular tener su origen en los árboles, las plantas herbáceas, los insectos, los mamíferos, la comida, los medicamentos o productos químicos. Los alérgenos se clasifican en grupos I a V según sus propiedades inmunoquímicas. El alérgeno Dac G5 de *Dactylis glomerata* pertenece al grupo V, como el alérgeno Lol pV de *Lolium perenne*.

20 Los anticuerpos implicados en la alergia pertenecen a la clase de las inmunoglobulinas de tipo IgE. En presencia de un alérgeno, las IgE se unen a los mastocitos y a los basófilos, lo cual conduce a la liberación por estas células de diferentes mediadores químicos y a la manifestación de la alergia.

25 Ésta puede adoptar diferentes formas, como por ejemplo un choque anafiláctico, asma, rinitis o dermatitis atópica.

30 Cuando se ha establecido el diagnóstico de la alergia a un compuesto particular, la desensibilización del paciente frente al alérgeno implicado es el enfoque terapéutico más frecuente, en particular cuando no se puede evitar la presencia del alérgeno, como en el caso del polen y de los ácaros. Este tipo de tratamiento ha demostrado su eficacia, pero es necesario disponer de un producto eficaz y seguro. En efecto, el tratamiento presenta un riesgo de choque anafiláctico, además, el producto administrado debe estar desprovisto de cualquier impureza que pudiera constituir otro alérgeno potencial. Ahora bien, hoy en día, sólo se utilizan unas mezclas complejas de alérgenos y sin productos puros. Por lo tanto, es necesario poder disponer de alérgenos con una forma estructural lo más parecida posible al alérgeno nativo, y que presente el mayor grado de pureza posible.

35 Uno de los medios posibles para alcanzar este objetivo es la producción de alérgenos recombinantes en un organismo hospedante (Laffer, S. *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol., Septiembre 1996, volumen 98, nº 3, páginas 652-658).

40 A título de ejemplos, se pueden citar la solicitud de patente publicada con el nº 819 763, que describe la producción de alérgeno Der fII modificado. La patente europea publicada con el nº 406 286 describe la clonación de un alérgeno principal del polen de la cizaña, Lol p1, y la expresión de este gen. La solicitud de patente publicada con el nº 473 111 se refiere asimismo a la producción de alérgenos de ácaros recombinantes utilizados para la desensibilización. La solicitud de patente publicada con el nº 463 059 se refiere a alérgenos derivados de la ambrosía y la utilización de estas proteínas. Estos documentos presentan la expresión de los genes y la producción de las proteínas en *E. coli*.

45 Este sistema de expresión adolece del inconveniente de no asegurar las modificaciones post-traduccionales de las proteínas que se pueden realizar en las células eucariotas. Por ejemplo, las proteínas producidas no están glicosiladas, ahora bien, la glicosilación de ciertas proteínas alérgicas puede ser importante para su capacidad de fijación a las IgE (Van Ree *et al.*, J. Biol. Chem., 2000, volumen 275, páginas 11451-11458).

50 La presente invención se refiere a la clonación, a la secuenciación y a la preparación de una molécula de ácido nucleico purificada que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para la proteína que constituye el alérgeno Dac G5 o un derivado de ésta. La presente invención se refiere asimismo a la inserción de este ácido nucleico en un vector de expresión y a la producción de la proteína recombinante en un organismo o microorganismo hospedante, en particular en unas células vegetales y unas plantas, o parte de plantas, y preferentemente en unas suspensiones celulares y plantas de tabaco. Este alérgeno se produce para su utilización en diagnóstico e inmunoterapia.

55 La producción de los alérgenos en unas células vegetales, como por ejemplo el tabaco, presenta la ventaja de permitir la producción de proteínas recombinantes glicosiladas. Este medio de producción no se ha utilizado jamás hasta ahora para la producción de alérgenos.

60 Los trabajos realizados en el marco de la presente invención se han referido:

- 65 - a la clonación del ADNc de Dac g5,

- a la inserción de la molécula de ácido nucleico clonada en un vector de expresión apropiado,
- a la producción de Dac g5 recombinante en unos sistemas biológicos,
- a los ensayos inmunológicos del alérgeno purificado.

5 Dac g5 es una proteína de 26,5 kDa, de 265 aminoácidos, reconocida por lo menos por el 90% de los sujetos alérgicos al polen de gramíneas.

10 El alérgeno Dac g5 de *Dactylis glomerata* pertenece a los alérgenos del grupo V. Se han descrito unas secuencias nucleotídicas que codifican para los alérgenos homólogos a Dac g5 en la técnica anterior (WO 95/06728). Los inventores han definido unos oligonucleótidos degenerados a partir de estas secuencias, con el fin de amplificar específicamente mediante la técnica de RT-PCR un ADNc que codifica Dac g5. Un fragmento de ADNc de tamaño esperado se clonó a partir de una población de ARN totales de polen de *Dactylis glomerata* y después se secuenció. Este fragmento se utilizó para definir unos cebadores específicos para los protocolos 5' y 3' RACE-PCR. Estos protocolos han permitido completar los extremos 5' y 3' del fragmento. Después de la amplificación de los extremos 5' y 3', se secuenció el ADNc completo que codifica para Dac g5.

15 Las secuencias obtenidas han permitido definir nuevos cebadores específicos de Dac g5, estos cebadores se han utilizado para clonar el ADNc de la pro-forma y de la forma madura del alérgeno. Las secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizadas para las reacciones de PCR son las siguientes:

- cebador sentido (pro-forma), representado en la figura 2A (cebador C1) y con el número SEC ID nº 9 en el listado de secuencias adjunto:

20 5'GGG TCT AGA ATG GCG GTC CAG AAG TAC ACC 3'

- cebador antisentido, utilizado para clonar la pro-forma, representado en la figura 2A (cebador F1) y con el número SEC ID nº 10 en el listado de secuencias adjunto:

25 5'GGG GAG CTC TCA GAC TTT GTA GCC ACC GGC 3'

- cebador sentido (forma madura), representado en la figura 2A (cebador F2) y con el número SEC ID nº 11 en el listado de secuencias adjunto:

30 5'AAG CTC GAG AAA AGA GCC GAC GCC GGC TAC ACC 3'

- cebador antisentido, utilizado para clonar la forma madura, representado en la figura 2A (cebador R2) y con el número SEC ID nº 12 en el listado de secuencias adjunto:

35 5'GGG GGC GGC CGC TCA GAC TTT GTA GCC ACC GGC 3'

40 Se han secuenciado los clones ADNc, se ha determinado la secuencia en aminoácidos que corresponde a cada secuencia nucleotídica.

45 Los inventores por lo tanto han conseguido ahora clonar y secuenciar el ácido nucleico que codifica para el alérgeno Dac g5 del polen de *Dactylis glomerata*. En consecuencia, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico purificada constituida por, o que comprende, una secuencia nucleotídica que codifica para el alérgeno Dac g5 o un derivado de ésta. La secuencia en aminoácido de la pro-forma del alérgeno Dac g5 está representada en la figura 1 y con el número SEC ID nº 2 en el listado de secuencias adjunto. Un fragmento de esta secuencia, delimitado por los aminoácidos en posición 25 a 290, constituye la proteína madura Dac g5. La secuencia en aminoácido de la forma madura del alérgeno Dac g5 está representada en la figura 1 y con el número SEC ID nº 4 en el listado de secuencias adjunto.

50 La figura 1 adjunta da la secuencia nucleotídica y peptídica de la pro-forma del alérgeno Dac g5 (isoforma 1). La secuencia subrayada corresponde a la secuencia señal ausente de la proteína madura. Los codones y los aminoácidos que difieren en la isoforma 2 están enmarcados. La tabla 1 siguiente indica las variaciones observadas entre las isoformas 1 y 2.

Tabla 1

Posición de los aminoácidos	Isoforma 1	Isoforma 2
40	Thr (ACC)	Ala (GCT)
51	Thr (ACG)	Lys (AAG)
265	Val (GTT)	Ala (GCT)

60 La figura 2 representa en A la secuencia de los cebadores, y en B las secuencia de la pro-forma del alérgeno Dac g5 y el posicionamiento de los cebadores en esta secuencia.

Se entiende por derivado de la proteína que constituye el alérgeno Dac g5, una proteína cuya secuencia en aminoácidos difiere por la modificación, la supresión o la adición de uno o varios aminoácidos a partir del momento en el que esta proteína es funcionalmente y/o inmunológicamente equivalente a Dac g5.

5 Dichas modificaciones pueden resultar de la degeneración del código genético o de modificaciones de la secuencia en ácido nucleico mediante cualquier técnica de biología molecular. El experto en la materia está en condiciones de determinar entre estas secuencias las que presentan unas propiedades funcionales e inmunológicas idénticas o parecidas a Dac g5, por ejemplo con la ayuda de anticuerpos. Para ello, los inventores han clonado dos isoformas de Dac g5. Las secuencias en aminoácido de estas isoformas maduras del alérgeno Dac g5 están representadas con los números SEC ID nº 6 y SEC ID nº 8, del listado de secuencias adjunto. La invención prevé por lo tanto asimismo las isoformas de la proteína que constituyen el alérgeno Dac g5 y que presentan una homología de secuencias en aminoácidos superior al 50%, preferentemente superior al 70% y muy preferentemente superior al 90% con la secuencia representada con el número SEC ID nº 2 adjunta. La invención prevé más particularmente una proteína, un derivado funcional e inmunológicamente equivalente a Dac g5, cuya secuencia en aminoácidos se selecciona de entre las secuencias SEC ID nº 6 y SEC ID nº 8 del listado de secuencias adjunto.

Se entiende por fragmento de la proteína que constituye el alérgeno Dac g5, cualquier péptido o polipéptido procedente de la proteína, más particularmente útil para el diagnóstico de la alergia.

20 Una molécula de ácido nucleico purificada que comprende, o que está constituida, por una secuencia nucleotídica (ADNc) que codifica para la pro-forma del alérgeno Dac g5 está representada con el número SEC ID nº 1 en el listado de secuencias adjunto. La invención se refiere también a un derivado, y más particularmente a una molécula de ácido nucleico que codifica para la proteína madura que está delimitada por los nucleótidos en posición 75 a 870 de la secuencia nucleotídica representada con el número SEC ID nº 1 en el listado de secuencias adjunto. Esta secuencia está representada con el número SEC ID nº 3 en el listado de secuencias adjunto.

La invención se refiere asimismo a las moléculas de ácido nucleico que codifican unas isoformas de la proteína Dac g5 madura y más particularmente aquellas en las que las secuencias de aminoácidos están representadas con los números SEC ID nº 6 y SEC ID nº 8 en el listado de secuencias adjunto.

A partir de la secuencia nucleotídica que codifica para Dac g5 o una de sus isoformas, el experto en la materia puede definir unas secuencias nucleotídicas que codifican para unas proteínas o polipéptidos que corresponden a un fragmento de Dac g5 o de una de sus isoformas y que poseen por ejemplo por lo menos un epítipo de Dac g5 o un epítipo de una de las isoformas de Dac g5. Puede definir también una secuencia nucleotídica que codifica para unas proteínas equivalentes funcionalmente a Dac g5 o a una de sus isoformas pero cuya secuencia de aminoácidos no es idéntica a la de Dac g5 o a una de sus isoformas.

Por último, puede definir una secuencia nucleotídica que codifica para unas proteínas equivalentes a Dac g5 o a una de sus isoformas en el plano inmunológico. Estas proteínas son, por ejemplo, capaces de enlazarse a unos anticuerpos anti-Dac g5, pero no poseen la función enzimática del alérgeno Dac g5 nativo. Se entiende más particularmente por derivado de una molécula de ácido nucleico según la invención, una molécula de ácido nucleico capaz de hibridarse en condiciones de hibridación estándares con una de las secuencias nucleotídicas representadas con los números SEC ID nº 1 y SEC ID nº 3 en el listado de secuencias adjunto. Se trata, por ejemplo, de las secuencias nucleotídicas que codifican las isoformas de Dac g5 representadas con los números SEC ID nº 5 y SEC ID nº 7 del listado de secuencias adjunto.

Se describe asimismo la mutagénesis de la proteína que permite introducir en ciertas posiciones definidas de la proteína uno o varios sitios que llevan una función particular. Puede tratarse, por ejemplo, de introducir un sitio de N-glicosilación sobre el alérgeno.

La invención se refiere también a una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica para el alérgeno Dac g5 o una de sus isoformas, o un derivado de éstos funcional y/o inmunológico de la proteína Dac g5, o de una de sus isoformas, un promotor unido de manera funcional a dicha secuencia, eventualmente un gen de selección dispuesto bajo el control de su propio promotor o incluso del mismo promotor que dicha secuencia, y ventajosamente una secuencia de terminación dispuesta aguas abajo de dicha secuencia. Puede tratarse de un casete o preferentemente de un vector de expresión que comprende en particular un origen de replicación eucariota o procariota, una secuencia promotora adaptada, un marcado de selección y una secuencia nucleotídica que codifica para el alérgeno Dac g5 o una de sus isoformas, o un derivado de éstos dispuesto bajo el control de dichas secuencias de regulación. El experto en la materia seleccionará sin dificultad, de entre los vectores de expresión conocidos de la técnica anterior, el vector mejor adaptado para el organismo hospedante en el que tiene previsto producir la proteína.

La invención prevé, muy particularmente, para la producción de la proteína que constituye el alérgeno Dac g5 o una de sus isoformas, un vector que permite la expresión del ácido nucleico en unas células eucariotas, y preferentemente en unas células vegetales o en unas levaduras.

- 5 También se puede construir el vector de expresión con el fin de permitir la producción de la proteína recombinante definida anteriormente en forma de una proteína de fusión. El polipéptido fusionado a la proteína de interés puede ser en particular útil para permitir o facilitar la purificación de ésta. Este polipéptido puede ser en particular una secuencia constituida por varias histidinas o "Histidine-Tag" añadidas en una región variable no crítica para la actividad y la conformación de la molécula, puede tratarse de una región interna o de un extremo N- o C-terminal. La adición de una secuencia "Histidine-Tag" permite purificar la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad sobre una columna de metal quelado.
- 10 La invención se refiere asimismo a un hospedante, eucariota o procariota, transformado por un vector de expresión como se ha definido anteriormente. Este hospedante puede por ejemplo ser *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia Pastoris*, o una célula vegetal, en particular una célula de *Nicotiana tabacum* en cuyo genoma se incorpora de manera estable la molécula de ácido nucleico que codifica para el alérgeno Dac g5 o una de sus isoformas o un derivado de éstos.
- 15 La presente invención se refiere asimismo a un organismo o microorganismo, preferentemente una célula o una planta, muy preferentemente de tabaco, que ha incorporado en su genoma, ventajosamente de manera estable, una molécula de ácido nucleico de la invención colocada bajo el control de una secuencia de regulación con el fin de expresar el alérgeno Dac g5 o una de sus isoformas en estas células, en una planta o una parte determinada de planta.
- 20 Se pueden preparar unas plantas transgénicas según la invención transformando una célula vegetal con dicha molécula de ácido nucleico y después regenerando una planta a partir de la célula transformada.
- 25 La invención se refiere a un procedimiento de obtención de la proteína Dac g5 recombinante o de una de sus isoformas, o de un derivado funcional o inmunológico de Dac g5 o de una de sus isoformas. Este procedimiento comprende el cultivo de un organismo, procariota o eucariota, transformado por un vector de expresión tal como se ha definido anteriormente, en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la expresión de dicha proteína.
- 30 Este procedimiento comprende también el aislamiento de las proteínas producidas a partir del cultivo de los organismos transformados. En el caso particular de la expresión de proteínas recombinantes en unas células de tabaco, las células que expresan el alérgeno de interés se seleccionan por inmunodetección con la ayuda de un anticuerpo dirigido contra la forma natural de Dac g5. Los alérgenos se localizan por fraccionamiento celular, y después se purifican a partir de suspensiones celulares transgénicas por inmunodetección con la ayuda de un anticuerpo dirigido contra la forma natural de Dac g5. El procedimiento según la invención comprende también el análisis estructural e inmunológico de la o de las proteínas producidas.
- 35 Se describe asimismo por lo tanto el alérgeno Dac g5 o un derivado de éste recombinante obtenido mediante dicho procedimiento. La invención se refiere a la pro-forma y a la forma madura del alérgeno Dac g5. La invención se refiere a las isoformas de la forma madura de Dac g5. Se describen asimismo unos fragmentos peptídicos o polipeptídicos de Dac g5 o de una de sus isoformas, así como unas proteínas funcionalmente o inmunológicamente equivalentes a Dac g5 o a una de sus isoformas. Las proteínas equivalentes a Dac g5 o a una de sus isoformas pueden ser obtenidas en particular mediante mutagénesis dirigida aplicada a la molécula de ADN que codifica para Dac g5 o una de sus isoformas. Se describe asimismo una proteína de fusión recombinante que comprende la proteína Dac g5 o una de sus isoformas, un fragmento de estas proteínas o un equivalente funcional o inmunológico.
- 40 Se describe asimismo por lo tanto el alérgeno Dac g5 o un derivado de éste recombinante obtenido mediante dicho procedimiento. La invención se refiere a la pro-forma y a la forma madura del alérgeno Dac g5. La invención se refiere a las isoformas de la forma madura de Dac g5. Se describen asimismo unos fragmentos peptídicos o polipeptídicos de Dac g5 o de una de sus isoformas, así como unas proteínas funcionalmente o inmunológicamente equivalentes a Dac g5 o a una de sus isoformas. Las proteínas equivalentes a Dac g5 o a una de sus isoformas pueden ser obtenidas en particular mediante mutagénesis dirigida aplicada a la molécula de ADN que codifica para Dac g5 o una de sus isoformas. Se describe asimismo una proteína de fusión recombinante que comprende la proteína Dac g5 o una de sus isoformas, un fragmento de estas proteínas o un equivalente funcional o inmunológico.
- 45 Este alérgeno recombinante, un derivado de éste, como el alérgeno natural, pueden ser utilizados para preparar unos anticuerpos monoclonales o policlonales. Los anticuerpos monoclonales se preparan según unas técnicas clásicas, bien conocidas por el experto en la materia. Se pueden obtener unos anticuerpos policlonales inmunizando unos animales con el alérgeno Dac g5 con la ayuda de un adyuvante adaptado, los anticuerpos son después purificados del suero de los animales inmunizados.
- 50 Estos anticuerpos pueden servir asimismo para detectar la presencia del alérgeno Dac g5, de un fragmento peptídico de la proteína o de una de sus isoformas o de un equivalente inmunológico de éstas, en un medio particular como por ejemplo un medio de cultivo.
- 55 La invención se refiere además a las composiciones farmacéuticas destinadas al tratamiento y/o al diagnóstico de una alergia y que comprenden como principio activo una cantidad eficaz de Dac g5, de una de las isoformas de la proteína o de un derivado funcional o inmunológico de ésta, o también de un anticuerpo dirigido contra ésta. En estas composiciones, el principio activo está asociado a un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones destinadas al tratamiento de la alergia se formulan según unos principios adaptados y conocidos por el experto en la materia con el fin de ser inyectadas por vía subcutánea o mediante cualquier otra vía de administración.
- 60 La invención se refiere asimismo a un procedimiento de detección de la sensibilidad manifestada por un individuo al polen de herbáceas y en particular al polen de *Dactylis glomerata*. Este procedimiento comprende la detección de la
- 65

presencia de anticuerpos que une una de las isoformas de la proteína recombinante Dac g5 o un derivado funcional y/o inmunológico de éstas, o un anticuerpo específico de éstas. Este procedimiento comprende en particular una etapa durante la cual una muestra que procede del individuo se pone en contacto con una de las isoformas de la proteína recombinante Dac g5, un derivado de éstas o un anticuerpo dirigido contra éstos, en unas condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno/anticuerpo, y después la detección de dicho complejo.

La invención se refiere por último a un agente reactivo de diagnóstico de una alergia, caracterizado porque comprende una preparación que contiene una de las isoformas de la proteína recombinante Dac g5 y/o un derivado de una de las isoformas de Dac g5, o un anticuerpo dirigido contra éstas.

Listado de secuencias

<110> SEITA
STALLERGENE

<120> Clonación y secuenciación del alérgeno Dac g5 del polen de *Dactylis glomerata*, su preparación y su utilización

<130> 7770PCTDACG5

<140> XXXXX
<141> 29-05-2001

<150> FR00/06857
<151> 29-05-2000

<160> 12
<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 873
<212> ADN
<213> *Dactylis glomerata*

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (873)
<223> pro-secuencia Dac g5

<400> 1

```

atg gcg gtc cag aag tac acc gtg gct cta ttc ctc gcc gtg gtc ctg 48
Met Ala Val Gln Lys Tyr Thr Val Ala Leu Phe Leu Ala Val Val Leu
  1                    5                    10                    15

gta gcg ggc ccg gtc gcc tcc tac gcc gcc gac gcc ggc tac acc ccg 96
Val Ala Gly Pro Val Ala Ser Tyr Ala Ala Asp Ala Gly Tyr Thr Pro
                20                    25                    30

gcc gcc gcg gcc acc ccg gct acc gct gga ggg aag gcg atg acc gag 144
Ala Ala Ala Ala Thr Pro Ala Thr Ala Gly Gly Lys Ala Met Thr Glu
                35                    40                    45

gag cag acg cta atc gag gac gtc aat gct ggt ttc aag gcg gcc gtg 192
Glu Gln Thr Leu Ile Glu Asp Val Asn Ala Gly Phe Lys Ala Ala Val
                50                    55                    60

gcc gcc gcc tcc agt gcc cct ccg gcg gac aag ttc aag acc ttc gag 240
Ala Ala Ala Ser Ser Ala Pro Pro Ala Asp Lys Phe Lys Thr Phe Glu
                65                    70                    75                    80

gcc acc ttc act gcg gcc tgc aag gct aac atc gcc gcc gcc gcc acc 288
Ala Thr Phe Thr Ala Ala Cys Lys Ala Asn Ile Ala Ala Ala Ala Thr
                85                    90                    95

aag gtg ccc ctg ttc gtc gcc aag ctc gac gcc gcc tac gcc gtc gcc 336
Lys Val Pro Leu Phe Val Ala Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Ala Val Ala
                100                    105                    110

tac aag acc gcc acg ggc ccc acc ccc gag gcc aag tac gac gcc ttc 384
Tyr Lys Thr Ala Thr Gly Pro Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Phe

```

ES 2 396 540 T3

115	120	125	
gtc gcc gcc ctc acc gaa gcg ctc cgc gtt atc gcc gcc gcc ctc gaa			432
Val Ala Ala Leu Thr Glu Ala Leu Arg Val Ile Ala Gly Ala Leu Glu			
130	135	140	
gtc cat gcc gtc aag ccc gct gcc gag gag gtt ccc gcc gcc aag atc			480
Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Pro Ala Ala Lys Ile			
145	150	155	160
ccc gcc ggt gag ctg cag att gtc gac aag atc gac gcc gcc tac aag			528
Pro Ala Gly Glu Leu Gln Ile Val Asp Lys Ile Asp Ala Ala Tyr Lys			
	165	170	175
atc gca gcc acc gct gca aac gcc gcc ccc gcc aac gac aag ttc acc			576
Ile Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr			
	180	185	190
gtc ttc gag gcc gcc ttc aac aag gcc atc aag gag agc acc gcc gcc			624
Val Phe Glu Gly Ala Phe Asn Lys Ala Ile Lys Glu Ser Thr Gly Gly			
	195	200	205
gca tac gag agt tac aag ttc atc ccc acg ctt gag gcc gcc gtc aag			672
Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Thr Leu Glu Ala Ala Val Lys			
	210	215	220
cag gct tac gcc gcc acc gtg gcc gcc gcg ccg gag gtc aag tac gcc			720
Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Ala Ala Pro Glu Val Lys Tyr Ala			
	225	230	235
gtc ttt gag gcc gcg ctg acc aag gcc atc acc gcc atg tcc gag gca			768
Val Phe Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala			
	245	250	255
cag aag gtc gcc acc cct gcc gcc gtt gct aca ggt gcg gca acc gcc			816
Gln Lys Val Ala Thr Pro Ala Ala Val Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala			
	260	265	270
gct gcc agt gct gct acc gcc gct gcc acc gcc gct gcc ggt gcc tac			864
Ala Ala Ser Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly Gly Tyr			
	275	280	285
aaa gtc tga			873
Lys Val			
290			

<210> 2
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> *Dactylis glomerata*

5

<400> 2

ES 2 396 540 T3

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

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

<210> 3

<211> 798

5 <212> ADN

<213> *Dactylis glomerata*

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(798)

<223> Dac g5 secuencia madura

<400> 3

gcc gac gcc gcc tac acc ccg gcc gcc gcg gcc acc ccg gct acc gct 48
 Ala Asp Ala Gly Tyr Thr Pro Ala Ala Ala Thr Pro Ala Thr Ala
 1 5 10 15

gga ggg aag gcg atg acc gag gag cag acg cta atc gag gac gtc aat 96
 Gly Gly Lys Ala Met Thr Glu Glu Gln Thr Leu Ile Glu Asp Val Asn
 20 25 30

gct ggt ttc aag gcg gcc gtg gcc gcc gcc tcc agt gcc cct ccg gcg 144
 Ala Gly Phe Lys Ala Ala Val Ala Ala Ala Ser Ser Ala Pro Pro Ala
 35 40 45

gac aag ttc aag acc ttc gag gcc acc ttc act gcg gcc tgc aag gct 192
 Asp Lys Phe Lys Thr Phe Glu Ala Thr Phe Thr Ala Ala Cys Lys Ala
 50 55 60

aac atc gcc gcc gcc gcc acc aag gtg ccc ctg ttc gtc gcc aag ctc 240
 Asn Ile Ala Ala Ala Thr Lys Val Pro Leu Phe Val Ala Lys Leu
 65 70 75 80

gac gcc gcc tac gcc gtc gcc tac aag acc gcc acg ggc ccc acc ccc 288

ES 2 396 540 T3

```

Asp Ala Ala Tyr Ala Val Ala Tyr Lys  Inr Ala Thr Gly Pro Thr Pro
      85                               90                               95

gag gcc aag tac gac gcc ttc gtc gcc gcc ctc acc gaa gcg ctc cgc 336
Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Phe Val Ala Ala Leu Thr Glu Ala Leu Arg
      100                               105                               110

ggt atc gcc ggc gcc ctc gaa gtc cat gcc gtc aag ccc gct gcc gag 384
Val Ile Ala Gly Ala Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu
      115                               120                               125

gag gtt ccc gcg gcc aag atc ccc gcc ggt gag ctg cag att gtc gac 432
Glu Val Pro Ala Ala Lys Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Ile Val Asp
      130                               135                               140

aag atc gac gcc gcc tac aag atc gca gcc acc gct gca aac gcc gcc 480
Lys Ile Asp Ala Ala Tyr Lys Ile Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala
      145                               150                               155                               160

ccc gcc aac gac aag ttc acc gtc ttc gag ggc gcc ttc aac aag gcc 528
Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu Gly Ala Phe Asn Lys Ala
      165                               170                               175

atc aag gag agc acc ggc ggc gca tac gag agt tac aag ttc atc ccc 576
Ile Lys Glu Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro
      180                               185                               190

acg ett gag gcc gcg gtc aag cag gct tac gcc gcc acc gtg gcc gcc 624
Thr Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Ala
      195                               200                               205

gcg ccg gag gtc aag tac gcc gtc ttt gag gcc gcg ctg acc aag gcc 672
Ala Pro Glu Val Lys Tyr Ala Val Phe Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala
      210                               215                               220

atc acc gcc atg tcc gag gca cag aag gtc gcc acg cct gcc gcc gtt 720
Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Val Ala Thr Pro Ala Ala Val
      225                               230                               235                               240

gct aca ggt gcg gca acc gcc gct gcc agt gct gct acc ggc gct gcc 768
Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ser Ala Ala Thr Gly Ala Ala
      245                               250                               255

acc gcc gct gcc ggt ggc tac aaa gtc tga 798
Thr Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Lys Val
      260                               265

```

<210> 4

<211> 265

5 <212> PRT

<213> *Dactylis glomerata*

<400> 4

ES 2 396 540 T3

Ala Asp Ala Gly Tyr Thr Pro Ala Ala Ala Ala Thr Pro Ala Thr Ala
 1 5 10 15
 Gly Gly Lys Ala Met Thr Glu Glu Gln Thr Leu Ile Glu Asp Val Asn
 20 25 30
 Ala Gly Phe Lys Ala Ala Val Ala Ala Ala Ser Ser Ala Pro Pro Ala
 35 40 45
 Asp Lys Phe Lys Thr Phe Glu Ala Thr Phe Thr Ala Ala Cys Lys Ala
 50 55 60
 Asn Ile Ala Ala Ala Ala Thr Lys Val Pro Leu Phe Val Ala Lys Leu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Tyr Ala Val Ala Tyr Lys Thr Ala Thr Gly Pro Thr Pro
 85 90 95
 Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Phe Val Ala Ala Leu Thr Glu Ala Leu Arg
 100 105 110
 Val Ile Ala Gly Ala Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu
 115 120 125
 Glu Val Pro Ala Ala Lys Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Ile Val Asp
 130 135 140
 Lys Ile Asp Ala Ala Tyr Lys Ile Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala
 145 150 155 160
 Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu Gly Ala Phe Asn Lys Ala
 165 170 175
 Ile Lys Glu Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro
 180 185 190
 Thr Ieu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Ala
 195 200 205
 Ala Pro Glu Val Lys Tyr Ala Val Phe Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala
 210 215 220
 Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Val Ala Thr Pro Ala Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ser Ala Ala Thr Gly Ala Ala
 245 250 255
 Thr Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Lys Val
 260 265

<210> 5

<211> 798

5 <212> ADN

<213> *Dactylis glomerata*

<220>

<221> CDS

10 <222> (1) .. (798)

<223> Dac g5 secuencia madura isoforma 1

<400> 5

gcc gac gcc gcc tac acc ccg gcc gcc gcg gcc acc ccg gct acc gct 48
 Ala Asp Ala Gly Tyr Thr Pro Ala Ala Ala Thr Pro Ala Thr Ala
 1 5 10 15
 gga ggg aag gcg atg acc gag gag cag acg cta atc gag gac gtc aat 96
 Gly Gly Lys Ala Met Thr Glu Glu Gln Thr Leu Ile Glu Asp Val Asn
 20 25 30
 gct ggt ttc aag gcg gcc gtg gcc gcc gcc tcc agt gcc cct ccg gcg 144
 Ala Gly Phe Lys Ala Ala Val Ala Ala Ala Ser Ser Ala Pro Pro Ala
 35 40 45
 gac aag ttc aag acc ttc gag gcc acc ttc acc gcg gcc tgc aag gct 192
 Asp Lys Phe Lys Thr Phe Glu Ala Thr Phe Thr Ala Ala Cys Lys Ala
 50 55 60
 aac atc gcc gcc gcc gcc acc aag gtg ccc ctg ttc gtc gcc aag ctc 240
 Asn Ile Ala Ala Ala Ala Thr Lys Val Pro Leu Phe Val Ala Lys Leu
 65 70 75 80
 gac gcc gcc tac gcc gtc gcc tac aag acc gcc acg gcc ccc acc ccc 288
 Asp Ala Ala Tyr Ala Val Ala Tyr Lys Thr Ala Thr Gly Pro Thr Pro
 85 90 95

ES 2 396 540 T3

gag gcc aag tac gac gcc ttc gtc gcc gcc ctc acc gaa gcg ctc cgc 336
 Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Phe Val Ala Ala Leu Thr Glu Ala Leu Arg
 100 105 110

ggt atc gcc gcc gcc ctc gaa gtc cac gcc gtc aag ccc gct gcc gag 384
 Val Ile Ala Gly Ala Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu
 115 120 125

gag gtt ccc gcg gcc aag atc ccc gcc ggt gag ctg cag att gtc gac 432
 Glu Val Pro Ala Ala Lys Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Ile Val Asp
 130 135 140

aag atc gac gcc gcc tac aag atc gca gcc acc gcc gca aac gcc gcc 480
 Lys Ile Asp Ala Ala Tyr Lys Ile Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala
 145 150 155 160

ccc gcc aac gac aag ttc acc gtc ttc gag gcc gcc ttc aac aag gcc 528
 Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu Gly Ala Phe Asn Lys Ala
 165 170 175

atc aag gag agc acc gcc gcc gca tac gag agt tac aag ttc atc ccc 576
 Ile Lys Glu Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro
 180 185 190

acg ctt gag gcc gcg gtc aag cag gcc tac gcc gcc acc gtg gcc gcc 624
 Thr Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Ala
 195 200 205

gcg ccc gag gtc aag tac gcc gtc ttt gag gcc gcg ctg acc aag gcc 672
 Ala Pro Glu Val Lys Tyr Ala Val Phe Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala
 210 215 220

atc acc gcc atg tcc gag gca cag aag gtc gcc acg cct gcc gcc gtt 720
 Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Val Ala Thr Pro Ala Ala Val
 225 230 235 240

gct aca ggt gcg gca acc gcc gct gcc agt gct gct acc gcc gct gcc 768
 Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ser Ala Ala Thr Gly Ala Ala
 245 250 255

acc gcc gct gcc ggt gcc tac aaa gtc tga 798
 Thr Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Lys Val
 260 265

<210> 6
 <211> 265
 5 <212> PRT
 <213> *Dactylis glomerata*

<400> 6

ES 2 396 540 T3

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

Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Phe Val Ala Ala Leu Thr Glu Ala Leu Arg
 100 105 110
 Val Ile Ala Gly Ala Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu
 115 120 125
 Glu Val Pro Ala Ala Lys Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Ile Val Asp
 130 135 140
 Lys Ile Asp Ala Ala Tyr Lys Ile Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala
 145 150 155 160
 Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu Gly Ala Phe Asn Lys Ala
 165 170 175
 Ile Lys Glu Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro
 180 185 190
 Thr Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Ala
 195 200 205
 Ala Pro Glu Val Lys Tyr Ala Val Phe Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala
 210 215 220
 Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Val Ala Thr Pro Ala Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ser Ala Ala Thr Gly Ala Ala
 245 250 255
 Thr Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Lys Val
 260 265

- <210> 7
- <211> 798
- 5 <212> ADN
- <213> *Dactylis glomerata*

- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1)..(798)
- <223> Dac g5 secuencia madura isoforma 2

<400> 7
 gcc gac gcc ggc tac acc ccg gcc gcc gcg gcc acc ccg gct gct gct 48
 Ala Asp Ala Gly Tyr Thr Pro Ala Ala Ala Ala Thr Pro Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 gga ggg aag gcg atg acc gag gag cag aag cta atc gag gac gtc aac 96
 Gly Gly Lys Ala Met Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Asp Val Asn
 20 25 30
 gct gcc ttc aag gcg gcc gtg gcc gcc gcc tcc agt gcc cct ccg gcg 144
 Ala Gly Phe Lys Ala Ala Val Ala Ala Ala Ser Ser Ala Pro Pro Ala
 35 40 45
 gac aag ttc aag acc ttc gag gcc acc ttc acc gcg gcc tgc aag gct 192
 Asp Lys Phe Lys Thr Phe Glu Ala Thr Phe Thr Ala Ala Cys Lys Ala
 50 55 60
 aac atc gcc gcc gcc gcc acc aag gtg ccc ctg ttc gtc gcc aag ctc 240
 Asn Ile Ala Ala Ala Thr Lys Val Pro Leu Phe Val Ala Lys Leu
 65 70 75 80
 gac gcc gcc tac gcc gtc gcc tac aag acc gcc gcg gcc ccc acc ccc 288
 Asp Ala Ala Tyr Ala Val Ala Tyr Lys Thr Ala Ala Gly Pro Thr Pro
 85 90 95
 gag gcc aag tac gac gcc ttt gtc gcc gcc ctc acc gaa gca ctc cgc 336
 Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Phe Val Ala Ala Leu Thr Glu Ala Leu Arg
 100 105 110

ES 2 396 540 T3

gtt atc gcc ggc gcc ctc gaa gtc cac gcc gtc aag ccc gct gcc gag 384
 Val Ile Ala Gly Ala Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu
 115 120 125

gag gtt ccc gcg gcc aag atc ccc gcc ggt gag ctg cag att gtc gac 432
 Glu Val Pro Ala Ala Lys Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Ile Val Asp
 130 135 140

aag atc gac gcc gcc tac aag atc gca gcc acc gcc gca aac gcc gcc 480
 Lys Ile Asp Ala Ala Tyr Lys Ile Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala
 145 150 155 160

ccc gcc aac gac aag ttc acc gtc ttc gag ggc gcc ttc aac aag gcc 528
 Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu Gly Ala Phe Asn Lys Ala
 165 170 175

atc aag gag agc acc ggc gcc gca tac gag agt tac aag ttc atc ccc 576
 Ile Lys Glu Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro
 180 185 190

acg ctt gag gcc gcg gtc aag cag gcc tac gcc gcc acc gtg gcc gcc 624
 Thr Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Ala
 195 200 205

gcg ccc gag gtc aag tac gcc gtc ttt gag gcc gcg ctg acc aag gcc 672
 Ala Pro Glu Val Lys Tyr Ala Val Phe Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala
 210 215 220

atc acc gcc atg tcc gag gca cag aag gtc gcc acg ccc gcc gcc gct 720
 Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Val Ala Thr Pro Ala Ala Ala
 225 230 235 240

gct aca ggt gcg gca acc gcc gct gcc agt gct gct acc ggc gct gcc 768
 Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ser Ala Ala Thr Gly Ala Ala
 245 250 255

acc gcc gct gcc ggt ggc tac aaa gtc tga 798
 Thr Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Lys Val
 260 265

- <210> 8
- <211> 265
- 5 <212> PRT
- <213> *Dactylis glomerata*
- <400> 8

ES 2 396 540 T3

Ala Asp Ala Gly Tyr Thr Pro Ala Ala Ala Ala Thr Pro Ala Ala Ala
 1 5 10
 Gly Gly Lys Ala Met Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Asp Val Asn
 20 25 30
 Ala Gly Phe Lys Ala Ala Val Ala Ala Ala Ser Ser Ala Pro Pro Ala
 35 40 45
 Asp Lys Phe Lys Thr Phe Glu Ala Thr Phe Thr Ala Ala Cys Lys Ala
 50 55 60
 Asn Ile Ala Ala Ala Ala Thr Lys Val Pro Leu Phe Val Ala Lys Leu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Tyr Ala Val Ala Tyr Lys Thr Ala Ala Gly Pro Thr Pro
 85 90 95
 Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Phe Val Ala Ala Leu Thr Glu Ala Leu Arg
 100 105 110
 Val Ile Ala Gly Ala Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu
 115 120 125
 Glu Val Pro Ala Ala Lys Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Ile Val Asp
 130 135 140
 Lys Ile Asp Ala Ala Tyr Lys Ile Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala
 145 150 155 160
 Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu Gly Ala Phe Asn Lys Ala
 165 170 175
 Ile Lys Glu Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro
 180 185 190
 Thr Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Ala
 195 200 205
 Ala Pro Glu Val Lys Tyr Ala Val Phe Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala
 210 215 220
 Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Val Ala Thr Pro Ala Ala Ala
 225 230 235 240
 Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ser Ala Ala Thr Gly Ala Ala
 245 250 255
 Thr Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Lys Val
 260 265

<210> 9
 <211> 30
 5 <212> ADN
 <213> *Dactylis glomerata*

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1) .. (30)
 <223> cebador sentido prosequencia

<400> 9

15 gggctagaa tggcgtcca gaagtacacc

30

<210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 20 <213> *Dactylis glomerata*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (30)
 25 <223> Cebador antisentido prosequencia

<400> 10

30 ggggagctct cagacttgt agccaccggc

30

<210> 11
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Dactylis glomerata*

35 <220>
 <221> misc_feature

ES 2 396 540 T3

<222> (1) .. (33)
<223> Cebador sentido secuencia madura

<400> 11

5 aagctcgaga aaagagccga cgccggctac acc 33

<210> 12
<211> 33
10 <212> ADN
<213> *Dactylis glomerata*

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (1) .. (33)
<223> Cebador antisentido secuencia madura

<400> 12

20 gggggcggcc gctcagactt tntagccacc ggc 33

REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula de ácido nucleico purificada, caracterizada porque comprende o está constituida por una secuencia nucleotídica que codifica para
- 10 i) el alérgeno Dac g5 cuya secuencia en aminoácidos está representada con el número SEC ID nº 2 en el listado de secuencias adjunto; o
- 10 ii) una de las isoformas maduras del alérgeno Dac g5 cuya secuencia en aminoácidos se selecciona de entre las secuencias SEC ID nº 4, SEC ID nº 6 o SEC ID nº 8, del listado de secuencias adjunto, o un derivado funcional y/o inmunológico de éste que presenta una homología de secuencias de aminoácidos superior al 90% con la secuencia presentada con el número SEC ID nº 2 adjunta, y capaz de unirse a unos anticuerpos anti-Dac g5.
- 15 2. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, caracterizada porque comprende o está constituida por una secuencia nucleotídica seleccionada de entre las secuencias SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 5 o SEC ID nº 7 del listado de secuencias adjunto.
- 20 3. Molécula de ácido nucleico recombinante, caracterizada porque comprende una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, un promotor unido de manera funcional a dicha molécula de ácido nucleico, eventualmente un gen de selección colocado bajo el control de su propio promotor o del mismo promotor que dicha molécula de ácido nucleico, y ventajosamente una secuencia de terminación colocada aguas abajo de dicha molécula de ácido nucleico.
- 25 4. Vector de expresión, caracterizado porque comprende un origen de replicación eucariota o procariota, una secuencia promotora adaptada, un marcador de selección y una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, colocada bajo el control de dichas secuencias de regulación.
- 30 5. Hospedante eucariota no humano o procariota transformado por una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 3, o por un vector de expresión según la reivindicación 4.
- 35 6. Hospedante según la reivindicación 5, caracterizado porque está constituido por una célula vegetal en cuyo genoma se incorpora, ventajosamente de manera estable, una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 40 7. Planta y muy preferentemente planta de tabaco, que ha incorporado de manera estable en su genoma una molécula de ácido nucleico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, colocada bajo el control de una secuencia de regulación de manera que el alérgeno Dac g5 se exprese en una parte determinada de la planta.
- 45 8. Suspensión celular, muy particularmente de tabaco, cuyas células han incorporado de manera estable en su genoma una molécula de ácido nucleico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, colocada bajo el control de una secuencia de regulación de manera que el alérgeno Dac g5 se exprese en dichas células.
- 50 9. Levadura que ha incorporado de manera estable en su genoma una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, colocada bajo el control de una secuencia de regulación de manera que se exprese el alérgeno Dac g5.
- 55 10. Procedimiento de obtención de la proteína Dac g5 recombinante, de una isoforma o de un derivado funcional o inmunológico de ésta, tales como se han definido en la reivindicación 1, caracterizado porque comprende el cultivo de un organismo, procariota o eucariota, transformado por una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 3, o por un vector de expresión según la reivindicación 4, en unas condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la expresión de dicha proteína, y después el aislamiento de las proteínas producidas a partir del cultivo de los organismos transformados.
- 60 11. Proteína recombinante que comprende o que está constituida por el alérgeno Dac g5 de secuencia SEC ID nº 2, una isoforma de éste de secuencia seleccionada de entre las secuencias SEC ID nº 4, SEC ID nº 6 o SEC ID nº 8, o un derivado de éste que presenta una homología de secuencias de aminoácidos superior al 90% con la secuencia presentada con el número SEC ID nº 2 y capaz de unirse a unos anticuerpos anti-Dac g5.
- 65 12. Composición farmacéutica para el tratamiento o el diagnóstico de una alergia, caracterizada porque comprende como principio activo una cantidad eficaz de una proteína según la reivindicación 11 o de un anticuerpo obtenido mediante inmunización de un animal con esta proteína y dirigido contra esta proteína.
13. Procedimiento *in vitro* de detección de la sensibilidad manifestada por un individuo al polen de herbáceas y en particular al polen de *Dactylis glomerata*, caracterizado porque comprende la puesta en contacto de una muestra que procede de un individuo con la proteína según la reivindicación 11 o un anticuerpo obtenido por inmunización de

un animal con esta proteína y dirigido contra esta proteína, en unas condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno/anticuerpo, y después la detección de dicho complejo.

- 5 14. Agente reactivo de diagnóstico de una alergia, caracterizado porque comprende una proteína según la reivindicación 11 o un anticuerpo obtenido por inmunización de un animal con esta proteína y dirigido contra esta proteína.

Fig.1

ATG GCG GTC CAG AAG TAC ACC GTG GCT CTA TTC CTC GCC GTG GTC CTG GTA GCG	54
M A V Q K Y T V A L F L A V V L V A	18
GGC CCG GTC GCC TCC TAC GCC GCC GAC GCC GGC TAC ACC CCG GCC GCC GCG GCC	108
G P V A S Y A A D A G Y T P A A A A	36
ACC CCG GCT ACC GCT GGA GGG AAG GCG ATG ACC GAG GAG CAG ACC CTA ATC GAG	162
T P A T A G G K A M T E E Q T L I E	54
GAC GTC AAT GCT GGT TTC AAG GCG GCC GTG GCC GCC GCC TCC AGT GCC CCT CCG	216
D V N A G F K A A V A A A S S A P P	72
GCG GAC AAG TTC AAG ACC TTC GAG GCC ACC TTC ACT GCG GCC TGC AAG GCT AAC	270
A D K F K T F E A T F T A A C K A N	90
ATC GCC GCC GCC GCC ACC AAG GTG CCC CTG TTC GTC GCC AAG CTC GAC GCC GCC	324
I A A A A T K V P L F V A K L D A A	108
TAC GCC GTC GCC TAC AAG ACC GCC ACG GGC CCC ACC CCC GAG GCC AAG TAC GAC	378
Y A V A Y K T A T G P T P E A K Y D	126
GCC TTC GTC GCC GCC CTC ACC GAA GCG CTC CGC GTT ATC GCC GGC GCC CTC GAA	432
A F V A A L T E A L R V I A G A L E	144
GTC CAT GCC GTC AAG CCC GCT GCC GAG GAG GTT CCC GCG GCC AAG ATC CCC GCC	486
V H A V K P A A E E V P A A K I P A	162
GGT GAG CTG CAG ATT GTC GAC AAG ATC GAC GCC GCC TAC AAG ATC GCA GCC ACC	540
G E L Q I V D K I D A A Y K I A A T	180
GCT GCA AAC GCC GCC CCC GCC AAC GAC AAG TTC ACC GTC TTC GAG GGC GCC TTC	594
A A N A A P A N D K F T V F E G A F	198
AAC AAG GCC ATC AAG GAG AGC ACC GGC GGC GCA TAC GAG AGT TAC AAG TTC ATC	648
N K A I K E S T G G A Y E S Y K F I	216
CCC ACG CTT GAG GCC GCG GTC AAG CAG GCT TAC GCC GCC ACC GTG GCC GCC GCG	702
P T L E A A V K Q A Y A A T V A A A	234
CCG GAG GTC AAG TAC GCC GTC TTT GAG GCC GCG CTG ACC AAG GCC ATC ACC GCC	756
P E V K Y A V F E A A L T K A I T A	252
ATG TCC GAG GCA GAG AAG GTC GCC ACG CCT GCC GCC GTT GCT ACA GGT GCG GCA	810
M S E A Q K V A T P A A V A T G A A	270
ACC GCC GCT GCC AGT GCT GCT ACC GGC GCT GCC ACC GCC GCT GCC GGT GGC TAC	864
T A A A S A A T G A A T A A A G G Y	288
AAA GTC TGA	873
K V *	

Fig.2

A

Cebador F1: ggg tct aga atc ccg gtc cag aag tac acc
 Cebador F2: aag ctc gag aaa aga gcc gac gcc ggc tac acc
 Cebador R1: ggg gag ctc tca gac ttt gta gcc acc ggc
 Cebador R2: ggg ggc ggc cgc tca gac ttt gta gcc acc ggc

B

																		54
F1 →																		
ATG	GCG	GTC	CAG	AAG	TAC	ACC	GTG	GCT	CTA	TTC	CTC	GCC	GTG	GTC	CTG	GTA	GCG	18
M	A	V	Q	K	Y	T	V	A	L	F	L	A	V	V	L	V	A	
																		108
← F2																		
GGC	CCG	GTC	GCC	TCC	TAC	GCC	GCC	GAC	GCC	GGC	TAC	ACC	CCG	GCC	GCC	GCG	GCC	36
G	P	V	A	S	Y	A	A	D	A	G	Y	T	P	A	A	A	A	
																		162
ACC	CCG	GCT	ACC	GCT	GGA	GGG	AAG	GCG	ATG	ACC	GAG	GAG	CAG	ACG	CTA	ATC	GAG	54
T	P	A	T	A	G	G	K	A	M	T	E	E	Q	T	L	I	E	
																		216
GAC	GTC	AAT	GCT	GGT	TTC	AAG	GCG	GCC	GTG	GCC	GCC	GCC	TCC	AGT	GCC	CCT	CCG	72
D	V	N	A	G	F	K	A	A	V	A	A	A	S	S	A	P	P	
																		270
GCG	GAC	AAG	TTC	AAG	ACC	TTC	GAG	GCC	ACC	TTC	ACT	GCG	GCC	TGC	AAG	GCT	AAC	90
A	D	K	F	K	T	F	E	A	T	F	T	A	A	C	K	A	N	
																		324
ATC	GCC	GCC	GCC	GCC	ACC	AAG	GTG	CCC	CTG	TTC	GTC	GCC	AAG	CTC	GAC	GCC	GCC	108
I	A	A	A	A	T	K	V	P	L	F	V	A	K	L	D	A	A	
																		378
TAC	GCC	GTC	GCC	TAC	AAG	ACC	GCC	ACG	GGC	CCC	ACC	CCC	GAG	GCC	AAG	TAC	GAC	126
Y	A	V	A	Y	K	T	A	T	G	P	T	P	E	A	K	Y	D	
																		432
GCC	TTC	GTC	GCC	GCC	CTC	ACC	GAA	GCG	CTC	CGC	GTT	ATC	GCC	GGC	GCC	CTC	GAA	144
A	F	V	A	A	L	T	E	A	L	R	V	I	A	G	A	L	E	
																		486
GTC	CAT	GCC	GTC	AAG	CCC	GCT	GCC	GAG	GAG	GTT	CCC	GCG	GCC	AAG	ATC	CCC	GCC	162
V	H	A	V	K	P	A	A	E	E	V	P	A	A	K	I	P	A	
																		540
GGT	GAG	CTG	CAG	ATT	GTC	GAC	AAG	ATC	GAC	GCC	GCC	TAC	AAG	ATC	GCA	GCC	ACC	180
G	E	L	Q	I	V	D	K	I	D	A	A	Y	K	I	A	A	T	
																		594
GCT	GCA	AAC	GCC	GCC	CCC	GCC	AAC	GAC	AAG	TTC	ACC	GTC	TTC	GAG	GGC	GCC	TTC	198
A	A	N	A	A	P	A	N	D	K	F	T	V	F	E	G	A	F	
																		648
AAC	AAG	GCC	ATC	AAG	GAG	AGC	ACC	GGC	GGC	GCA	TAC	GAG	AGT	TAC	AAG	TTC	ATC	216
N	K	A	I	K	E	S	T	G	G	A	Y	E	S	Y	K	F	I	
																		702
CCC	ACG	CTT	GAG	GCC	GCG	GTC	AAG	CAG	GCT	TAC	GCC	GCC	ACC	GTG	GCC	GCC	GCG	234
P	T	L	E	A	A	V	K	Q	A	Y	A	A	T	V	A	A	A	
																		756
CCG	GAG	GTC	AAG	TAC	GCC	GTC	TTT	GAG	GCC	GCG	CTG	ACC	AAG	GCC	ATC	ACC	GCC	252
P	E	V	K	Y	A	V	F	E	A	A	L	T	K	A	I	T	A	
																		810
ATG	TCC	GAG	GCA	CAG	AAG	GTC	GCC	ACG	CCT	GCC	GCC	GTT	GCT	ACA	GGT	GCG	GCA	270
M	S	E	A	Q	K	V	A	T	P	A	A	V	A	T	G	A	A	
																		864
ACC	GCC	GCT	GCC	AGT	GCT	GCT	ACC	GGC	GCT	GCC	ACC	GCC	GCT	GCC	GGT	GGC	TAC	288
T	A	A	A	S	A	A	T	G	A	A	T	A	A	A	G	G	Y	
																		873
AAA	GTC	TGA																
K	V	*																

R1 y R2