

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 463 828**

51 Int. Cl.:

A61K 39/35 (2006.01)
C07K 16/16 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 39/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2010 E 10752799 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014 EP 2475386**

54 Título: **Polipéptidos híbridos hipoalergénicos para el tratamiento de alergia**

30 Prioridad:

10.09.2009 EP 09169958
10.09.2009 US 241049 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2014

73 Titular/es:

BIOMAY AG (100.0%)
Lazarettgasse 19
1090 Wien , AT

72 Inventor/es:

VALENTA, RUDOLF;
LINHART, BIRGIT;
FOCKE-TEJKL, MARGARETE;
NEUBAUER, ANGELA;
VALENT, PETER y
BLATT, KATHARINA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 463 828 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

Polipéptidos híbridos hipoalergénicos para el tratamiento de alergia

Antecedentes de la invención

Más del 10 % de la población mundial sufre alergia al polen de gramíneas. Aquí, los presentes inventores describen el desarrollo de una vacuna basada en moléculas híbridas hipoalergénicas recombinantes que se construyeron a partir de elementos derivados de los cuatro principales alérgenos del polen de hierba timotea Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 6 para el tratamiento de alergia al polen de gramíneas. Los genes sintéticos de codones optimizados que codifican bloques de construcción y combinaciones de los cuatro alérgenos se diseñaron según estudios de mapeo de epítopes y datos estructurales y posteriormente se expresaron en *Escherichia coli*. Diecisiete moléculas híbridas recombinantes se purificaron por cromatografía de afinidad y se evaluaron con respecto a la expresión, pureza y plegamiento, solubilidad y actividad alérgica reducida. Se identificaron cuatro moléculas híbridas hipoalergénicas que consisten en elementos reensamblados de los cuatro alérgenos del polen de gramíneas que tras la inmunización en diferentes modelos animales indujeron anticuerpos IgG que bloquean el reconocimiento de IgE de los alérgenos del polen de gramíneas por pacientes alérgicos. Estas moléculas híbridas hipoalergénicas representan vacunas seguras para la inmunoterapia de la alergia al polen de gramíneas.

Las alergias mediadas por IgE representan un problema de salud en el mundo con prevalencia creciente (1). El distintivo de la enfermedad alérgica es la producción de anticuerpos IgE específicos para alérgenos medioambientales, principalmente del polen, ácaros, caspa animal y mohos (1). Los síntomas alérgicos se producen cuando la IgE unida al receptor sobre mastocitos o basófilos se entrecruza por alérgeno multivalente, conduciendo a la liberación de mediadores inflamatorios (2). Además, la presentación facilitada por IgE mediante FcεRI y FcεRII sobre células presentadoras de antígeno potencia fuertemente la activación de linfocitos T específicos para alérgenos que contribuye a inflamación alérgica mediada por linfocitos T (3, 4). La inmunoterapia específica para alérgenos actualmente representa el único tratamiento etiológico de alergias con efecto a largo plazo, aunque su éxito está alterado por el uso de extractos de alérgeno en bruto (5, 6). Estas preparaciones contienen material alérgico y no alérgico en cantidades variables, por lo que la presencia de compuestos biológicamente activos aumenta el riesgo de efectos secundarios anafilácticos. Además, la falta de o escasa inmunogenicidad de alérgenos clínicamente relevantes reduce la eficacia de vacunas basadas en extractos (7). Se ha hecho un progreso sustancial en el campo de la caracterización de alérgenos durante los últimos 20 años mediante la aplicación de técnicas inmunoquímicas y de biología molecular. Hoy en día, los alérgenos más comunes e importantes se han caracterizado con respecto a su estructura y propiedades inmunológicas. Se han producido alérgenos recombinantes que se parecen mucho a las propiedades de los alérgenos naturales y pueden ahora usarse para el diagnóstico y terapia de alergia (5). Además, se ha mostrado que pueden manipularse los derivados de alérgenos con propiedades inmunológicas beneficiosas (8). Se han generado variantes modificadas de alérgenos con actividad alérgica con el fin de evitar los efectos secundarios mediados por IgE en el transcurso de la inmunoterapia y ya se han usado fragmentos derivados de Bet v 1 recombinantes con capacidad de unión a IgE fuertemente reducida en un ensayo clínico (9). Moléculas híbridas que consisten en combinaciones de diferentes alérgenos han mostrado que aumentan la inmunogenicidad de sus componentes individuales (10-12).

Linhart y col. (Ref. 21) prepararon una molécula híbrida hipoalérgica con elevada inmunogenicidad combinando derivados hipoalérgicos de los dos principales alérgenos del polen de gramíneas Phl p 2 y Phl p 6, concretamente una molécula del mosaico de Phl p 2 y un mutante de delección de Phl p 6, lo cual no fue sorprendente en vista de datos previos (Ref. 15, 17).

El documento EP 1219301 A1 desvela polipéptidos híbridos que consisten en al menos dos proteínas alérgicas diferentes o fragmentos de las mismas.

El documento WO 2007/124526 A1 describe procedimientos para producir derivados del alérgeno de proteína natural Phl p 1 con actividad alérgica reducida que comprenden fragmentar el alérgeno de proteína natural y volver a unir los fragmentos en un orden diferente.

El documento EP 1440979 A1 desvela un procedimiento para la preparación de proteínas de mosaico hipoalérgicas que comprende fragmentar el alérgeno en fragmentos sin reactividad de IgE y volver a unir los fragmentos en un orden diferente.

Schramm y col. (1999) The Journal of Immunology, 162, páginas 2406-2414, describen la producción de variantes del alérgeno Phl p 5 con capacidad de unión a IgE reducida, pero reactividad de linfocitos T conservada.

Westritschnig y col. (2007) The Journal of Immunology, 179, páginas 7624-7634, investigan una vacuna hipoalérgica obtenida por reestructuración de la cola a la cabeza de Phl p 12 para el tratamiento de sensibilización cruzada a profilina.

Los presentes inventores han encontrado ahora que una combinación de la tecnología híbrida y la tecnología de mosaico

no conduce en todos los casos a moléculas hipoalergénicas. Sorprendentemente, se ha observado que dos polipéptidos de fusión que consistieron en los mismos fragmentos, pero en un orden diferente, presentaron reactividades de IgE muy diferentes. Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar polipéptidos que tienen propiedades hipoalergénicas y pueden servir de posible vacuna.

5 Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un polipéptido hipoalergénico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 22, 23, 24, 25, 36 y 37.

En una realización, el polipéptido hipoalergénico consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 39, 40, 41, 42, 53 y 54.

- 10 Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la invención y un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención es el uso del polipéptido de la invención para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de alergia, preferentemente de alergia al polen de gramíneas.

Otro aspecto de la invención es un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente invención.

15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa el diseño de moléculas híbridas por el ensamblaje de fragmentos de alérgenos derivados de los principales alérgenos del polen de la hierba timotea Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 6 (véase el Ejemplo 1).

La Figura 2 muestra un gel de PAA teñido con Coomassie que contiene las proteínas híbridas purificadas A-Q (véase el Ejemplo 1). Los pesos moleculares se indican en el margen izquierdo (m, marcador de peso molecular).

- 20 La Figura 3 muestra los espectros de CD en el UV lejano de las proteínas B, C, P y Q disueltas en agua recogidos en un espectropolarímetro Jasco J-810 (Japan Spectroscopic Co., Tokio, Japón), véase el Ejemplo 2.

La Figura 4 representa la reactividad de IgE sobre híbridos unidos a nitrocelulosa y proteínas de control para tres pacientes alérgicos al polen de gramíneas representativos (véase el Ejemplo 3).

- 25 La Figura 5 representa reactividad alérgica reducida de híbridos en comparación con los alérgenos naturales como se detecta por expresión de CD203c (véase el Ejemplo 4).

La Figura 6 representa reactividad de IgG después de la inmunización de ratones con una mezcla de Phl p 1 y Phl p 5, o una mezcla de Phl p 2 y Phl p 6, o una mezcla de B y C, o P o Q. El desarrollo de niveles de anticuerpos IgG₁ específicos para Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 6 se comparó por medidas de ELISA (véase el Ejemplo 6).

- 30 La Figura 7 muestra los resultados del Ejemplo 7. La figura representa la reactividad de IgG después de la inmunización de conejos con B, C, P o Q, concretamente respuestas de anticuerpos IgG a los alérgenos naturales Phl p 1 (Figura 7A), Phl p 5 (Figura 7B), Phl p 2 y Phl p 6 (Figura 7C).

La Figura 8 representa la reactividad de IgG después de la inmunización de conejos con B, C, P o HPG (un híbrido derivado de alérgenos del polen de gramíneas descrito en la Ref. 11), concretamente respuestas de anticuerpos IgG al alérgeno natural Phl p 1 (véase el Ejemplo 8).

35 Descripción detallada de la invención

El procedimiento de la presente divulgación es un procedimiento para identificar polipéptidos hipoalergénicos. Alternativamente, el procedimiento de la presente divulgación es un procedimiento de cribado para identificar polipéptidos hipoalergénicos. El término "hipoalergénico", como se usa en el presente documento, significa la reducción de la reactividad y capacidad de IgE para inducir desgranulación de mastocitos o basófilos mediada por IgE.

- 40 En su primera etapa, el procedimiento de la presente divulgación comprende proporcionar un grupo de polipéptidos, en el que cada polipéptido dentro de dicho grupo comprende independientemente N fragmentos derivados de al menos dos alérgenos diferentes.

Los polipéptidos

- 45 El grupo de polipéptidos consiste en al menos dos polipéptidos diferentes. Preferentemente, el grupo de polipéptidos consiste en 2 a 100, preferentemente de 3 a 75, más preferentemente de 4 a 50, lo más preferentemente de 5 a 30 polipéptidos diferentes.

Cada polipéptido comprende, o consiste independientemente en, N fragmentos derivados de al menos dos alérgenos diferentes. N es un número entero superior a 3, preferentemente N es 4 a 25, más preferentemente 4 a 20, todavía más preferentemente 4 a 15, lo más preferentemente 4 a 10 (por ejemplo 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10). Los polipéptidos dentro del grupo pueden comprender o consistir en el mismo número de fragmentos o un número diferente. Es decir, N puede ser igual o diferente para los polipéptidos respectivos dentro del grupo. Preferentemente, todos los fragmentos dentro de un polipéptido dado son diferentes entre sí.

Cada fragmento consiste en al menos 8, preferentemente de 8 a 100, más preferentemente de 10 a 90, todavía más preferentemente de 12 a 80, más preferentemente de 15 a 70, más preferentemente de 20 a 60 aminoácidos consecutivos de una secuencia de aminoácidos del alérgeno.

El polipéptido preparado según la presente invención no consiste necesariamente solo en secuencias de aminoácidos derivadas de los alérgenos. Es posible que secuencias no nativas (por ejemplo, secuencias espaciadoras) se inserten entre los fragmentos (fragmentos que son secuencias de aminoácidos consecutivos de diferentes alérgenos). También es posible que los polipéptidos comprendan una secuencia de marca que facilita la purificación del polipéptido tras la expresión en una célula huésped. Un ejemplo de una secuencia de marca tal es una marca de hexahistidina que permite la purificación por cromatografía en quelato de Ni^{2+} . Otras marcas son conocidas para aquellos expertos en la materia. Además, el polipéptido puede contener un residuo de metionina extraño en la posición de aminoácido 1 que resulta de la expresión en células huésped. La metionina estará frecuentemente presente si la porción del extremo N del polipéptido es un fragmento de alérgeno interno o del extremo C.

En una realización de la presente divulgación, el polipéptido puede consistir en una cualquiera de las siguientes estructuras (I) a (VII):

(I) Met-F1-F2- ... -FN-marca,

(II) Met-F1-F2- ... -FN,

(III) F1-F2- ... -FN-marca,

(IV) Met-marca-F1-F2- ... -FN,

(V) marca-F1-F2- ... -FN,

(VI) marca-F1-F2- ... -FN-marca,

(VII) F1-F2- ... -FN

en las que Met es un residuo de metionina del extremo N, F1, F2 y FN son el primer, segundo y enésimo fragmento, respectivamente, y marca es una secuencia de marca (por ejemplo, una marca de hexahistidina (His_6)). En las realizaciones (I) a (VII) anteriores no hay aminoácidos extraños entre los fragmentos. Es decir, F1-F2- ... -FN es una secuencia consecutiva de fragmentos de alérgenos. En otras realizaciones, puede haber uno o más (por ejemplo 1, 2 ó 3) aminoácidos extraños entre los fragmentos. Sin embargo, lo cual no se prefiere.

El polipéptido según la presente invención puede prepararse por diversos procedimientos. En una realización el polipéptido se prepara expresando un polinucleótido en una célula huésped. La célula huésped puede ser una célula procariota o eucariota. Si se usan células procariotas la célula huésped es preferentemente *E. coli*. Ejemplos de células eucariotas incluyen levadura, células de insecto o líneas celulares tales como células CHO. Después de introducir un polinucleótido adecuado que codifica el polipéptido de la invención en una célula huésped la célula huésped se cultiva en condiciones tales que el polipéptido se exprese en la célula. El polipéptido puede ser secretado por la célula o se acumula dentro de la célula. Pueden usarse técnicas de purificación conocidas para recuperar el polipéptido de la célula o del medio de cultivo.

En otra realización el polipéptido se prepara por síntesis química, por ejemplo, por síntesis en fase sólida según técnicas que son por sí conocidas.

Alérgenos

El término "alérgeno" como se usa en el presente documento indica una sustancia que puede provocar una reacción de hipersensibilidad tipo I en individuos atópicos. La mayoría de los seres humanos organizan respuestas de inmunoglobulina E (IgE) significativas solo como defensa contra las infecciones parasíticas. Sin embargo, algunos individuos organizan una respuesta de IgE contra antígenos medioambientales comunes. Esta predisposición hereditaria se llama atopía. En individuos atópicos, los antígenos no parasíticos estimulan la producción de IgE inapropiada, conduciendo a hipersensibilidad tipo I.

Alérgenos en el sentido de la presente divulgación incluyen alérgenos de plantas y animales (base de datos Allergome: www.allergome.org). Los alérgenos son normalmente alérgenos naturales. Los alérgenos pueden ser alérgenos de una o más de las siguientes especies: *Acarus siro*, *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides microceras*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Euroglyphus maynei*, *Glycyphagus domesticus*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Blattella germanica*, *Periplaneta americana*, *Harmonia axyridis*, *Archaeopotamobius sibiricus*, *Artemia franciscana*, *Charybdis feriatus*, *Crangon crangon*, *Homarus americanus*, *Litopenaeus vannamei*, *Metapenaeus ensis*, *Panulirus stimpsoni*, *Penaeus aztecus*, *Penaeus indicus*, *Penaeus monodon*, *Pontastacus leptodactylus*, *Aedes aegypti*, *Chironomus kiensis*, *Chironomus thummi thummi*, *Forcipomyia taiwana*, *Triatoma protracta*, *Apis cerana*, *Apis dorsata*, *Apis mellifera*, *Bombus pennsylvanicus*, *Bombus terrestris*, *Dolichovespula arenaria*, *Dolichovespula maculata*, *Myrmecia pilosula*, *Polistes annularis*, *Polistes dominulus*, *Polistes exclamans*, *Polistes fuscatus*, *Polistes gallicus*, *Polistes metricus*, *Polybia paulista*, *Polybia scutellaris*, *Solenopsis geminata*, *Solenopsis invicta*, *Solenopsis richteri*, *Solenopsis saevissima*, *Vespa crabro*, *Vespa mandarinia*, *Vespula flavopilosa*, *Vespula germanica*, *Vespula maculifrons*, *Vespula pensylvanica*, *Vespula squamosa*, *Vespula vidua*, *Vespula vulgaris*, *Argas reflexus*, *Thaumetopoea pityocampa*, *Ctenocephalides felis felis*, *Lepisma saccharina*, *Rana esculenta*, *Canis familiaris*, *Felis domesticus*, *Bos domesticus*, *Sardinops sagax*, *Gadus callarias*, *Gallus domesticus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Xiphias gladius*, *Equus caballus*, *Lepidorrhombus whiffiagonis*, *Cavia porcellus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Salmo salar*, *Dendronephthya nipponica*, *Todarodes pacificus*, *Helix aspersa*, *Halotis midae*, *Anisakis simplex*, *Ascaris suum*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia lunata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium oxalicum*, *Fusarium culmorum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Candida albicans*, *Candida boidinii*, *Epicoccum purpurascens*, *Coprinus comatus*, *Psilocybe cubensis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis*, *Chamaecyparis obtusa*, *Cryptomeria japonica*, *Cupressus arizonica*, *Cupressus sempervirens*, *Juniperus ashei*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus sabinoides*, *Juniperus virginiana*, *Phoenix dactylifera*, *Asparagus officinalis*, *Crocus sativus*, *Ananas comosus*, *Anthoxanthum odoratum*, *Cynodon dactylon*, *Dactylis glomerata*, *Festuca pratensis*, *Holcus lanatus*, *Hordeum vulgare*, *Lolium perenne*, *Oryza sativa*, *Paspalum notatum*, *Phalaris aquatica*, *Phleum pratense*, *Poa pratensis*, *Secale cereale*, *Sorghum halepense*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Musa acuminata*, *Apium graveolens*, *Daucus carota*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Ambrosia psilostachya*, *Ambrosia trifida*, *Artemisia vulgaris*, *Helianthus annuus*, *Lactuca sativa*, *Brassica juncea*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Sinapis alba*, *Beta vulgaris*, *Chenopodium album*, *Salsola kali*, *Cucumis melo*, *Actinidia chinensis*, *Actinidia deliciosa*, *Bertholletia excelsa*, *Arachis hypogaea*, *Glycine max*, *Lens culinaris*, *Lupinus angustifolius*, *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna radiata*, *Alnus glutinosa*, *Betula verrucosa*, *Carpinus betulus*, *Castanea sativa*, *Corylus avellana*, *Juglans nigra*, *Juglans regia*, *Quercus alba*, *Catharanthus roseus*, *Fraxinus excelsior*, *Ligustrum vulgare*, *Olea europea*, *Plantago lanceolata*, *Sesamum indicum*, *Syringa vulgaris*, *Persea americana*, *Hevea brasiliensis*, *Mercurialis annua*, *Ricinus communis*, *Platanus acerifolia*, *Platanus orientalis*, *Fragaria ananassa*, *Humulus japonicus*, *Malus domestica*, *Morus nigra*, *Parietaria judaica*, *Parietaria officinalis*, *Prunus armeniaca*, *Prunus avium*, *Prunus domestica*, *Prunus dulcis*, *Prunus persica*, *Pyrus communis*, *Rubus idaeus*, *Ziziphus mauritiana*, *Vitis vinifera*, *Anacardium occidentale*, *Citrus limon*, *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis*, *Litchi chinensis*, *Pistacia vera*, *Capsicum annum*, *Lycopersicon esculentum*, *Solanum tuberosum*.

Preferentemente, uno o más alérgenos de la presente divulgación son alérgenos de las especies *Phleum pratense*, *Betula verrucosa*, *Dermatophagoides pteronyssinus*. Lo más preferentemente, uno o más alérgenos son alérgenos de las especies *Phleum pratense*.

En una realización preferida del procedimiento de la presente divulgación, todos los alérgenos de los que se derivan fragmentos son de una única especie de la lista citada anteriormente. Es decir, los diferentes 'alérgenos fuente' se derivan todos de las mismas especies.

Un grupo preferido de alérgenos según esta divulgación son alérgenos del polen de gramíneas, por ejemplo, alérgenos de la especie *Phleum pratense*. Preferentemente, los alérgenos están seleccionados del grupo que consiste en Phl p 1, Phl p 2, Phl p 3, Phl p 4, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 11, Phl p 12 y Phl p 13. Los alérgenos de la presente invención están seleccionados del grupo que consiste en Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 6.

Los fragmentos se derivan de al menos dos alérgenos diferentes, preferentemente de 2 a 10 alérgenos diferentes, más preferentemente de 2 a 5 alérgenos diferentes, por ejemplo, de 2, 3, 4 ó 5 alérgenos diferentes.

En una realización especial, el grupo de polipéptidos comprende al menos 2 polipéptidos que consisten en los mismos fragmentos pero en los que los fragmentos se ensamblan en un orden diferente.

Determinación de la reactividad de IgE

En otra etapa, el procedimiento de la presente divulgación comprende determinar la reactividad de IgE de los polipéptidos. En un sentido más amplio, el término "reactividad de IgE" indica la capacidad de una sustancia para unirse a anticuerpos IgE. Más específicamente, como se usa en el presente documento, el término "reactividad de IgE" se refiere a la capacidad del polipéptido para unirse a anticuerpos IgE de individuos que son alérgicos a uno o más de los alérgenos de

los que se derivan los fragmentos dentro del polipéptido.

La reactividad de IgE puede medirse determinando el grado de unión entre (1) IgE de suero de individuos que son alérgicos a uno o más de los alérgenos de los que se derivan los fragmentos y (2) el polipéptido. Esto puede hacerse mediante el procedimiento descrito en la referencia (18) o (19).

- 5 Alternativamente, la reactividad de IgE y actividad alergénica pueden determinarse analizando la expresión de CD203c sobre basófilos humanos que se aislaron de individuos alérgicos a uno o más de dichos alérgenos. Véase el Ejemplo 4 y la referencia (20).

Determinación de la reactividad de linfocitos T

- 10 En otra etapa, el procedimiento de la presente divulgación comprende determinar la reactividad de linfocitos T de los polipéptidos. El término "reactividad de linfocitos T" como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad de una sustancia para unirse específicamente a receptores de linfocitos T. Más específicamente, "reactividad de linfocitos T" significa la capacidad del polipéptido para inducir proliferación de linfocitos T.

- 15 La reactividad de linfocitos T de los polipéptidos puede medirse (1) proporcionando células mononucleares de sangre periférica (CMSP) aisladas de individuos alérgicos a uno o más de los alérgenos de los que se derivan los fragmentos, y (2) determinando el grado de proliferación de linfocitos T contenidos en dichas CMSP. Véase el Ejemplo 5 y la referencia (16).

Inducción de una respuesta de IgG protectora

- 20 En otra etapa, el procedimiento de la presente divulgación comprende determinar la capacidad de los polipéptidos para inducir una respuesta de IgG contra uno o más de los alérgenos de los que se derivan los fragmentos. Esto puede hacerse (1) inmunizando un mamífero no humano (por ejemplo, un ratón, rata o conejo) con el polipéptido y (2) determinando la cantidad de anticuerpos IgG producidos en dicho mamífero no humano que son específicos para dicho uno o más alérgenos de los que se derivan los fragmentos. Los anticuerpos IgG medidos son preferentemente anticuerpos IgG1. Preferentemente, la etapa (2) se realiza usando un ensayo de ELISA. Véase el Ejemplo 6.

- 25 El procedimiento comprende además determinar a qué grado los polipéptidos pueden inducir una respuesta de IgG protectora. Esto puede hacerse (1) proporcionando una composición que contiene anticuerpos IgG inmunizando un mamífero no humano (por ejemplo, un ratón, rata o conejo) con el polipéptido; (2) proporcionando una composición que contiene anticuerpos IgE de individuos que son alérgicos a uno o más de dichos alérgenos de los que se derivan los fragmentos del polipéptido, y (3) midiendo si y/o a qué grado dicha composición que contiene anticuerpos IgG puede bloquear la unión de dichos anticuerpos IgE a uno o más de dichos alérgenos.

- 30 Esta prueba se realiza preferentemente usando un ensayo de ELISA. Por ejemplo, los alérgenos naturales de los que se derivan los fragmentos pueden inmovilizarse sobre una placa de ELISA. La placa de ELISA así pretratada puede entonces ponerse en contacto con dicha composición que contiene los anticuerpos IgG para permitir la unión de anticuerpos IgG a dichos alérgenos inmovilizados. Después de lavar la composición que contiene dichos anticuerpos IgE se pone en contacto con la placa de ELISA. Después de lavar se determina la cantidad de anticuerpos IgE. Véase el Ejemplo 7.

Selección del polipéptido

El procedimiento de la presente divulgación comprende la etapa final de seleccionar aquellos polipéptidos que presentan propiedades favorables y así son útiles para el posible uso como vacuna. Para seleccionar un polipéptido debe tener las siguientes propiedades:

- 40 (i) menor reactividad de IgE que uno o más de los alérgenos de los que se derivan los fragmentos del polipéptido;
- (ii) reactividad de linfocitos T
- (iii) capacidad para inducir una respuesta de IgG dirigida contra los alérgenos de los que se derivan los fragmentos del polipéptido; y
- 45 (iv) capacidad para inducir una respuesta de IgG protectora que bloquee la unión de IgE de pacientes alérgicos a dichos alérgenos de los que se derivan los fragmentos del polipéptido.

Con respecto al punto (i) anterior, el polipéptido se selecciona si su reactividad de IgE es inferior a la de al menos un alérgeno del que se deriva. Preferentemente, el polipéptido se selecciona solo si su reactividad de IgE es inferior a la de cada alérgeno del que se deriva. Por ejemplo, si el polipéptido consiste en fragmentos derivados de Phl p 2 y Phl p 5, el polipéptido debe tener una menor reactividad de IgE que Phl p 2, y debe tener una menor reactividad de IgE que Phl p 5

para seleccionarse.

Para ser seleccionado, la reactividad de IgE y la actividad alergénica se reducen preferentemente al menos el 25 %, más preferentemente al menos el 50 %, lo más preferentemente al menos el 90 %, determinado por mediciones de IgE cuantitativas como se describe en la Ref. 16, y como se describe en el Ejemplo 4.

- 5 Con respecto al requisito (ii), el polipéptido se selecciona solo si puede provocar la activación de linfocitos T específica para alérgenos (Ejemplo 5).

Con respecto a la condición (iii), el polipéptido se selecciona solo si puede inducir una respuesta de IgG específica para alérgenos tras la inmunización (véase, por ejemplo, el Ejemplo 6).

- 10 Con respecto a la condición (iv), el polipéptido se selecciona solo si los anticuerpos IgG inducidos por inmunización pueden inhibir la unión de IgE de pacientes alérgicos al alérgeno natural (véase, por ejemplo, el Ejemplo 7).

Polipéptidos hipoalergénicos identificados mediante el procedimiento descrito en el presente documento

En otro aspecto la presente divulgación se refiere a un polipéptido hipoalergénico identificado y producido según esta divulgación.

- 15 El polipéptido hipoalergénico puede comprender o consistir en al menos cuatro fragmentos derivados de al menos dos alérgenos diferentes, en el que la secuencia de aminoácidos de cualquiera de dos fragmentos adyacentes dentro del polipéptido no está presente como una secuencia de aminoácidos consecutiva en dicho alérgeno, caracterizado porque al menos un fragmento se deriva de Phl p 1 o Phl p 5. El número de fragmentos puede ser N, en el que N tiene el significado que se ha definido anteriormente.

- 20 En otra realización, el polipéptido hipoalergénico de la presente divulgación puede comprender o consistir en al menos cuatro fragmentos derivados de al menos dos alérgenos diferentes, en el que la secuencia de aminoácidos de cualquier par de dos fragmentos adyacentes dentro del polipéptido de fusión no está presente como una secuencia de aminoácidos consecutiva en dicho alérgeno, caracterizado porque cada uno de dichos fragmentos consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 55 a 76. Estas secuencias de aminoácidos están comprendidas en los fragmentos usados en los ejemplos de la presente solicitud. El número de fragmentos puede ser N, en el que N tiene el significado que se ha definido anteriormente. Preferentemente, el polipéptido hipoalergénico puede consistir en una cualquiera de las siguientes estructuras (VIII) a (XIV):

(VIII) Met-F1-F2- ... -FN-marca,

(IX) Met-F1-F2- ... -FN,

(X) F1-F2- ... -FN-marca,

- 30 (XI) Met-marca-F1-F2- ... -FN,

(XII) marca-F1-F2- ... -FN,

(XIII) marca-F1-F2- ... -FN-marca,

(XIV) F1-F2- ... -FN

- 35 en las que Met es un residuo de metionina del extremo N, F1, F2 y FN son el primer, segundo y enésimo fragmento, respectivamente, y marca es una secuencia de marca (por ejemplo (His)₆), consistiendo cada fragmento en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 55 a 76. La secuencia de marca tiene normalmente 5 a 10 aminoácidos de longitud.

- 40 El polipéptido hipoalergénico de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 22, 23, 24, 25, 36 y 37. Estas secuencias de aminoácidos están comprendidas en las construcciones B, C, D, E, P y Q, respectivamente (véanse los ejemplos). El polipéptido hipoalergénico puede consistir en una cualquiera de las siguientes estructuras (XV) a (XXI):

(XV) Met-SEC-marca,

(XVI) Met-SEC,

(XVII) SEC-marca,

- 45 (XVIII) Met-marca-SEC,

(XIX) marca-SEC,

(XX) marca-SEC-marca,

(XXI) SEC

- 5 en la que Met es un residuo de metionina del extremo N, SEC es una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 22, 23, 24, 25, 36 y 37, y marca es una secuencia de marca (por ejemplo (His)₆). La secuencia de marca tiene normalmente 5 a 10 aminoácidos de longitud.

El polipéptido puede consistir en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 39, 40, 41, 42, 53 y 54. Las construcciones B, C, D, E, P y Q consisten en estas secuencias de aminoácidos, respectivamente (véanse los ejemplos). Estas realizaciones se corresponden con la estructura (VIII) o (XV) anterior.

- 10 Todas las realizaciones descritas anteriormente a propósito del procedimiento de la presente divulgación son aplicables al polipéptido hipoalergénico de la invención y viceversa.

Otros aspectos de la invención

- 15 La invención se refiere adicionalmente a un polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención. Debido a la degeneración del código genético, muchas moléculas de polinucleótidos diferentes pueden codificar un único polipéptido. El polinucleótido de la invención es preferentemente una construcción de expresión para obtener el polipéptido después de la expresión en células huésped. La construcción de expresión puede comprender además componentes que generalmente son conocidos en la técnica tales como secuencias promotoras, genes que codifican factores de resistencia contra antibióticos, un origen de replicación y similares.

- 20 La presente divulgación se refiere adicionalmente a una célula transfectada o transformada con un polinucleótido de la presente invención. Células adecuadas incluyen células eucariotas y células procariotas. Las células eucariotas pueden transfectarse mediante procedimientos conocidos en la técnica tales como transfección mediada por fosfato de calcio, electroporación, lipofección, etc.

- 25 La invención se refiere además a una composición farmacéutica que contiene el polipéptido según la presente invención. La composición farmacéutica puede contener adicionalmente uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables tales como un tampón o disolución de sal. Preferentemente, la composición farmacéutica de la invención es una composición de vacuna. En una realización particular, la composición farmacéutica contiene además un adyuvante tal como hidróxido de aluminio.

- 30 La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para la preparación del polipéptido de la invención. El procedimiento comprende proporcionar un polinucleótido que codifica el polipéptido, introducir dicho polinucleótido en una célula huésped, cultivar la célula huésped así obtenida en condiciones tales que el polipéptido híbrido se exprese, recuperar el producto de expresión de la célula. El polinucleótido puede prepararse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Puede preferirse usar tecnología de PCR para preparar el polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención. Las secuencias de ADNc de los alérgenos del polen de gramíneas Phl p 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12 y 13 se muestran en SEC ID N°: 11 a 20, respectivamente. Basándose en estas secuencias y en la divulgación en la presente solicitud, el experto puede diseñar fácilmente ácidos nucleicos adecuados que codifican polipéptidos de la presente divulgación.

- 35 La invención se refiere además al uso del polipéptido descrito en el presente documento para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno alérgico. Un medicamento tal puede estar compuesto por el polinucleótido que codifica una vacuna que puede usarse directamente para la vacunación basada en ADN contra alergia tipo 1. El polipéptido recombinante o sintético puede usarse para preparar formulaciones para el tratamiento oral, sublingual o parenteral de trastornos alérgicos de tipo 1 ya que se usan ahora rutinariamente para inmunoterapia. Ejemplos de formulaciones para inmunoterapia sublingual o polipéptido híbrido unido a adyuvante para inmunoterapia de inyección. Posibles aplicaciones también incluyen formas basadas en células de inmunoterapia que pueden basarse en, por ejemplo, células dendríticas u otras células presentadoras de antígeno. Aquellas células se transforman y se expresan en antígeno *in vivo*. Preferentemente se usan células ortólogas transformadas con vectores adecuados. Un modo de aplicación puede ser la inyección subcutánea de polipéptido unido a adyuvante. Otra posibilidad es administración oral o nasal del polipéptido con el fin de inducir tolerancia inmunológica o anergia contra los componentes del polipéptido. Todas las posibles formulaciones pueden prepararse según medidas que son conocidas para aquellos expertos en la materia (esquema de administración de adyuvantes de dosificación).

- 50 La presente divulgación se refiere además al uso del polipéptido descrito en el presente documento o de un polipéptido o una célula descrita en el presente documento para la preparación de un medicamento para vacunación profiláctica o inducción de tolerancia. Administración profiláctica de polipéptidos híbridos significa la administración del polipéptido a individuos, preferentemente niños que todavía no sufren alergia tipo 1 con el fin de inducir un estado de tolerancia

inmunológica, anergia o no sensibilidad, o una inmunidad protectora contra los componentes de la vacuna híbrida. Esto puede lograrse por los diversos protocolos explicados brevemente para el tratamiento de un trastorno alérgico establecido. El tratamiento profiláctico puede realizarse con los polipéptidos o polinucleótidos descritos en el presente documento anteriormente.

- 5 En otra realización, la presente divulgación se refiere al uso de un polipéptido descrito en el presente documento para la detección de anticuerpos contra una proteína alergénica en una muestra. El anticuerpo puede ser un anticuerpo IgM, IgE, IgG o IgA. La concentración del anticuerpo puede determinarse a partir de una muestra que ha sido obtenida de un líquido corporal. La muestra puede derivarse de animales o seres humanos. Tales pruebas pueden basarse en un polipéptido inmovilizado en fase sólida o el polipéptido en la fase líquida. Ejemplos de tales pruebas incluyen pruebas de ELISA,
- 10 pruebas de transferencia Western o cualquier otra prueba en la que el polipéptido se inmovilice para unirse a anticuerpos específicos fuera de la muestra. Alternativamente, el polipéptido se añade directamente al líquido que contiene anticuerpos con el fin de adsorber anticuerpos específicos como, por ejemplo, en ensayos inmunológicos competitivos.

El polipéptido de la invención también puede usarse para pruebas celulares tales como una prueba de proliferación de linfocitos T, etc.

- 15 Resumen de las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos mostradas en el listado de secuencias:

SEC ID N°:	secuencia / construcción
1	secuencia de aminoácidos de Phl p 1
2	secuencia de aminoácidos de Phl p 2
3	secuencia de aminoácidos de Phl p 3
4	secuencia de aminoácidos de Phl p 4
5	secuencia de aminoácidos de Phl p 5
6	secuencia de aminoácidos de Phl p 6
7	secuencia de aminoácidos de Phl p 7
8	secuencia de aminoácidos de Phl p 11
9	secuencia de aminoácidos de Phl p 12
10	secuencia de aminoácidos de Phl p 13
11	ADNc de Phl p 1
12	ADNc de Phl p 2
13	ADNc de Phl p 3
14	ADNc de Phl p 4
15	ADNc de Phl p 5
16	ADNc de Phl p 6
17	ADNc de Phl p 7
18	ADNc de Phl p 11
19	ADNc de Phl p 12
20	ADNc de Phl p 13

(continuación)

SEC ID N°:	secuencia / construcción
21	construcción A sin Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
22	construcción B sin Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
23	construcción C sin Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
24	construcción D sin Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
25	construcción E sin Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
26	construcción F sin Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
27	construcción G sin Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
28	construcción H sin Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
29	construcción I sin Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
30	construcción J sin Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
31	construcción K sin Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
32	construcción L sin Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
33	construcción M sin Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
34	construcción N sin Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
35	construcción O sin Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
36	construcción P sin Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
37	construcción Q sin Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
38	construcción A con Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
39	construcción B con Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
40	construcción C con Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
41	construcción D con Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
42	construcción E con Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
43	construcción F con Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
44	construcción G con Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
45	construcción H con Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
46	construcción I con Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
47	construcción J con Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
48	construcción K con Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
49	construcción L con Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
50	construcción M con Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
51	construcción N con Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
52	construcción O con Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
53	construcción P con Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C

(continuación)

SEC ID N°:	secuencia / construcción
54	construcción Q con Met del extremo N y (His) ₆ del extremo C
55	P1a
56	P1b
57	P1c
58	P1d
59	P1a1
60	P1a2
61	P1c1
62	P1c2
63	P2A
64	P2B
65	P2a
66	P2b
67	P2c
68	P2a1
69	P2b2
70	P5a
71	P5b
72	P5c
73	P5d
74	P5c1
75	P5c2
76	P6b

Las secuencias de aminoácidos SEC ID N°: 1-10 muestran los péptidos maduros que carecen del péptido señal, cuando corresponda.

- 5 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

Ejemplos

En este estudio los presentes inventores demuestran que estos enfoques pueden combinarse y extenderse para una fuente de alérgenos compleja como polen de gramíneas. Los presentes inventores construyeron una vacuna basada en los cuatro alérgenos principales de la hierba timotea (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6) para el tratamiento de alergia al polen de gramíneas (13, 14). Con referencia a datos estructurales y estudios de mapeo de epítopes, los alérgenos se fraccionaron en fragmentos con actividad alérgénica reducida. Los presentes inventores describen la producción de diferentes combinaciones de estos fragmentos como proteínas híbridas, sus propiedades bioquímicas e inmunológicas y cómo se seleccionaron cuatro proteínas híbridas como moléculas candidatas para la vacunación contra alergia al polen de gramíneas.

Ejemplo 1: Design, expresión y purificación de las moléculas híbridas

Para la construcción de moléculas hipoalergénicas híbridas se diseñaron diecisiete moléculas híbridas diferentes por el ensamblaje de fragmentos de alérgenos derivados de los principales alérgenos del polen de la hierba timotea Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, y Phl p 6 como se muestra en la Figura 1. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas resultantes (diseñadas A-Q) se enumeran en la Tabla 1. P1M y P2M se refieren a derivados de alérgenos previamente diseñados (Referencias 15, 16). Todas las secuencias fueron de codones optimizados para la expresión en *Escherichia coli*, se añadió un codón de iniciación (ATG) en el extremo 5' y se añadió una marca de 6xhistidina en el extremo 3' de cada secuencia, seguido de un codón de terminación. Los genes resultantes que codifican las moléculas híbridas A-Q se clonaron en el vector de expresión pET17b (Novagen) y se expresaron en cultivo líquido en células BL21 de *Escherichia coli* (DE3) (Stratagene). Todas las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad usando un protocolo convencional (Qiagen). La pureza de las moléculas híbridas expresadas se analizó por SDS-PAGE. (Figura 2)

Tabla I. Secuencias de aminoácidos de fragmentos derivados de Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 6.	
Fragmentos derivados de Phl p 1	
Pla	IPKVPPGPNTTATYGDKLDKSTWYGKPTGAGPKDNGGACGYKVDKPPFSGMTGCGNTPIFK
Plb	SGRGCGSCFEIKCTKPEACSGEPVVHITDDNEEPIAPYHFDLSGHAFGAMAKKGDEQKLR
Plc	SAGELELQFRRVKCKYPEGTKVIFHVEKGSNPNYLALLVKYVNGDGDVVANDIKEKGDKMELKESWGAIWRIDTPDKL
Pld	TGPFVRYTTEGGTKTEAEDVIPEGWKADTSYESK
Pla1	IPKPPGPNTTATYGDKMLDAKSTWYGKPTGA
Pla2	GPKDNGGACGYKDVKPPFSGMTGCGNTPIFK
Plc1	SAGELELQFRRVKCKYPEGTKVTFHVEKGSNPNYLALLV
Plc2	KYVNGDGDVVAVDIKEKGDKMELKESWGAIWRIDTPDKL
Fragmentos derivados de Phl p 5	
P5a	ADLGYGPATPAAPAAGYTPATPAAPAEAAPAGKATTEEQKLEKINAGFKAALAAAAAGVQPADKYRTFVATF
P5b	GAASNKAFAEGLSGEPKGAESSKAAALTSKLDAAAYKAYKTAEAGATPEAKYDAYVATLSEALRHAGTLEHVAVKPA
P5c	ADDVKVIPAGELQVIEKVDAAFKVAATAANAAPANDKFTVFEEAFNDAIKASTGGAYESYKFIPALEA
P5d	AVKQAYAAATVATAPEVKYTVFETALKKAITAMSEAQAAPAAAATATATAAVGAATGAATAATGGYKV
P5c1	AEVVKVIPAGELQVIEKVDAAFKVAATAANAAPA
P5c2	NDKFTVFEEAFNDAIKASTGGAYESYKFIPALEA
Fragmentos derivados de Phl p 2	
P2A	VPKVTFTVEKGSNEKHLAVLVKYEAGDTMAEVELREHGSDEWVAMTKGEG
P2B	GWTFDSEEPQGGPFNFRFLTEKGMKNVFDDWPDKYTIGATYAPEE
P2a	VPKVTFTVEKGSNEKHLAVLVKYEAGDTMAEVEL
Tabla I. Secuencias de aminoácidos de fragmentos derivados de Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 6.	
Fragmentos derivados de Phl p 2	
P2b	REHGSDEWVAMTKGEGGVWTFDSEEPQGGPFN
P2c	FRFLTEKGMKNVFDDWPEKYTIGATYAPEE
P2a1	VPKVTFTVEKGSNEKHLAVLVKYTEGDTMAEVELREHGS
P2b2	DEWVAMTKGEGGVWTFDSEEPQGGPFN
Fragmentos derivados de Phl p 6	
P6b	ADKYKTFEAAFTVSSKRNLADAVSKAPQLVPKLDDEVYNAAYNAADHAAPEDKYEAFVLHFSEALRILAGTPEVHAVKPGA

Ejemplo 2: Estimación de la estructura secundaria de las moléculas híbridas

Para evaluar la estructura secundaria de moléculas híbridas, espectros del CD de UV lejano de las proteínas B, C, P y Q disueltas en agua se recogieron en un espectropolarímetro Jasco J-810 (Japan Spectroscopic Co., Tokio, Japón) como se ha descrito (16). Todas las proteínas híbridas, que se analizaron con respecto a su estructura secundaria, presentaron una estructura enrollada al azar, que se ha observado previamente para varios otros derivados de alérgeno (18, 19).

Ejemplo 3: Reactividad de IgE de las moléculas híbridas

Para analizar la reactividad de IgE de moléculas híbridas, la unión directa de IgE del suero de pacientes alérgicos al polen de gramíneas a las moléculas híbridas derivadas de Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 6 A-Q, o rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5 y rPhl p 6, o HSA como control negativo, se investigó por experimentos de transferencia puntual no desnaturizante como se ha descrito (18, 19). Los anticuerpos IgE de pacientes se unieron a los alérgenos 'naturales' recombinantes Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 6, pero no a la proteína de control HSA. Inesperadamente, los presentes inventores observaron reactividades de IgE diferentes de IgE de pacientes alérgicos a las moléculas híbridas A-Q, que no pudo explicarse por la estructura primaria (por ejemplo, híbridos A y C e híbridos E y F contienen exactamente los mismos fragmentos derivados de alérgeno).

Ejemplo 4: Actividad alérgica reducida de las moléculas híbridas B, C, P y Q

Se seleccionaron cuatro moléculas híbridas, B, C, P y Q para posteriores análisis. Para determinar la reactividad de IgE de los híbridos B, C, P y Q sobre la activación de células efectoras dependientes de IgE se analizó la expresión de CD203c sobre basófilos humanos aislados de pacientes alérgicos al polen de gramíneas. CD203c se ha descrito previamente como un marcador de activación sobre basófilos humanos, que está regulado por incremento tras la entrecruzamiento inducido por alérgenos de IgE unida a receptor (20). Como se muestra en la Figura 5, las células toleraron una concentración al menos 10 veces superior de las moléculas híbridas en comparación con la cantidad equimolar de los alérgenos naturales (pacientes 1-12). Estos datos sugieren una actividad alérgica fuertemente reducida de las cuatro moléculas híbridas B, C, P y Q.

Ejemplo 5: Proliferaciones de linfocitos T

Para evaluar la reactividad de linfocitos T de moléculas híbridas se realizaron experimentos de proliferación *in vitro* con CMSP aisladas de cuatro pacientes alérgicos al polen de gramíneas como se ha descrito (16). Aunque la actividad alérgica de las moléculas híbridas se redujo, se preservó la mayoría de los epítopes de los linfocitos T de los alérgenos Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 6 naturales (Tabla II).

Tabla. II. CMSP de pacientes alérgicos al polen de gramíneas responden a las moléculas híbridas

	20 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml	2,5 µg/ml	1,25 µg/ml
rPhlp1+rPhlp 5	2,5 (±1,5)	2,6 (±1,8)	2,0 (±1,1)	1,3 (±0,1)	1,6 (±0,7)
B+C	1,7 (±1,1)	2,1 (±1,5)	2,2 (±1,4)	2,0 (±0,9)	1,4 (±0,3)
P	2,0 (±1,5)	2,2 (±1,4)	2,0 (±0,6)	2,7 (±1,2)	2,5 (±1,2)
rPhlp2+rPhlp6	1,6 (±0,9)	1,3 (±0,69)	1,5 (±0,6)	1,3 (±0,7)	1,5 (±0,4)
O	1,4 (±1,0)	1,6 (±0,8)	2,0 (±0,5)	2,9 (±1,0)	2,8 (±0,7)

Ejemplo 6: La inmunización con las moléculas híbridas B, C, P y Q indujo una respuesta de IgG dirigida contra los alérgenos naturales

Para investigar si anticuerpos IgG inducidos por inmunización con B, C, P o Q fueron capaces de reconocer o no los alérgenos naturales rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5 y rPhl p 6 se usaron dos modelos animales diferentes (ratones BALB/c, conejos). Los presentes inventores inmunizaron ratones BALB/c con una mezcla de Phl p1 y Phl p 5, o una mezcla de Phl p 2 y Phl p 6, o una mezcla de B y C, o P, o Q, y compararon el desarrollo de niveles de anticuerpos específicos para Phl p1, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 6 por medidas de ELISA (Figura 6). Los híbridos B+C, además de P y Q, pudieron inducir una

respuesta de anticuerpos IgG₁ específica para Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 6, que fue superior a la respuesta de anticuerpos inducida por los propios alérgenos naturales.

El desarrollo de respuestas de anticuerpos IgG específicas para alérgenos también se investigó por inmunización de conejos con B, C, P o Q. Se probaron diluciones sucesivas de anticuerpos de conejo para anticuerpos IgG específicos para Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 6 por ELISA. Las construcciones B, C, P y Q pudieron inducir una respuesta de anticuerpos IgG a los alérgenos naturales Phl p 1 (Figura 7A), Phl p 5 (Figura 7B), Phl p 2 y Phl p 6 (Figura 7C).

Ejemplo 7: La inmunización con los alérgenos híbridos B, C, P y Q indujo una respuesta de IgG protectora que bloquea la unión de IgE de pacientes alérgicos a los alérgenos naturales y extracto de polen de gramíneas

Para examinar la capacidad de anticuerpos IgG inducidos con las moléculas híbridas B, C, P y Q para inhibir la unión de IgE de pacientes alérgicos al polen de gramíneas a rPhl p 1, Phl p 2, Phl p 5 y rPhl p 6, o a un extracto de polen de gramíneas natural. Por tanto, en experimentos de inhibición de ELISA, los presentes inventores preincubaron un extracto de polen de gramíneas natural unido a placas de ELISA con una mezcla de antisuero anti-P y Q de conejo, o una mezcla de antisuero anti-B, C y Q, o un antisuero de conejo obtenido por inmunización con un híbrido de polen de gramíneas previamente descrito (HPG) (11) que consiste en Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 6 o los sueros preinmunes correspondientes. Estos anticuerpos IgG de conejo podrían inhibir la unión de IgE de 14 pacientes alérgicos al polen de gramíneas a los siguientes extractos de polen de gramíneas: P+Q: 73 %; B+C+Q: 78 %; HPG: 75 % (Tabla III). Se realizaron experimentos similares con rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5 y Phl p 6 unidos a placas de ELISA, conduciendo a una inhibición promedio del 81-94 % para Phl p 1 (Tabla IV), 86-90 % para Phl p 5 (Tabla V), 45 % para Phl p 2 (Tabla VI) y 34 % para Phl p 6 (Tabla VII).

Tabla III. % de inhibición de IgE de pacientes que se une a GPE después de la preincubación con antisueros de conejo

paciente	P+Q	B+C+Q	HPG
1	90	93	92
2	28	23	14
3	84	89	87
4	75	81	78
5	61	71	70
6	78	84	86
7	81	86	86
8	80	80	80
9	76	83	73
10	66	71	75
11	76	87	86
12	70	80	72
13	72	81	75
14	84	89	82
media	73	78	75
DE	15,0	17,1	18,9

Tabla IV. % de inhibición de IgE de pacientes que se une a rPhl p 1 después de la preincubación con antisueros de conejo

paciente	B+C	B	C	P	HPG
1	84	86	91	90	66
2	97	82	97	94	46
3	92	77	93	90	44
4	73	69	79	76	47
5	90	86	91	89	57
6	94	80	96	92	43
7	93	81	98	96	44
8	98	93	100	99	67
9	96	82	98	92	44
10	98	78	99	94	44
media	92	81	94	91	50
DE	7,8	6,4	6,2	6,1	9,5

Tabla V. % de inhibición de IgE de pacientes que se une a rPhl p 5 después de la preincubación con antisueros de conejo

paciente	B+C	B	C	P	HPG
1	92	93	94	94	94
2	93	91	90	95	97
3	92	86	90	92	93
4	86	82	86	89	89
5	87	83	90	91	92
6	93	88	91	94	96
7	95	91	95	96	98
8	95	92	94	97	98
9	68	63	66	52	52
10	95	90	92	97	99
media	90	86	89	90	91
DE	8,2	8,9	8,4	13,5	14,0

Tabla VI. % de inhibición de IgE de pacientes que se une a rPhl p 2 después de la preincubación con antisueros

de conejo		
paciente	Q	HPG
1	52	86
2	50	87
3	41	71
4	60	76
5	46	83
6	43	74
7	47	60
8	31	45
9	30	54
media	45	71
DE	8,7	14,8

Tabla VII. % de inhibición de IgE de pacientes que se une a rPhl p 6 después de preincubación con antisueros de conejo

paciente	Q	HPG
1	38	55
2	38	53
3	36	52
4	29	47
5	32	46
6	40	51
7	32	38
8	41	59
9	23	32
media	34	48
DE	5,9	8,5

Ejemplo 8: La inmunización con las moléculas híbridas B, C y P indujo una respuesta de IgG dirigida contra el alérgeno Phl p 1 natural

- 5 Diluciones sucesivas de antisueros de conejo se probaron para anticuerpos IgG específicos para Phl p 1 por ELISA. Las construcciones B, C y P fueron capaces de inducir una respuesta de anticuerpos IgG al alérgeno natural Phl p 1. La respuesta de IgG se comparó con niveles de anticuerpos IgG inducidos por inmunización con una molécula híbrida que consiste en los alérgenos naturales Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 6 (híbrido del polen de gramíneas, HPG), que se ha descrito previamente como una molécula altamente inmunogénica (11). Inesperadamente, C y P indujeron niveles incluso
- 10 mayores de anticuerpos IgG específicos para Phl p 1 en conejos. Los resultados se muestran en la Figura 8.

Referencias

1. Kay AB., Kaplan AP, Bousquet J, Holt PJ. Allergy and Allergic Diseases. Blackwell Scientific Publ./ Oxford, United Kingdom; 2008.
2. Bischoff SC. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:93-104.
- 5 3. van Nerveen, R.J., Knol, E.F., Ejmaes, A., Würtzen, P.A. IgE-mediated allergen presentation and blocking antibodies: regulation of T-cell activation in allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2006. 141: 119.
4. Bieber T. Fc epsilon RI on human epidermal Langerhans cells: an old receptor with new structure and functions. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997.113:30-4:
- 10 5. Valenta, R. y Niederberger, V. (2007). Recombinant allergens for immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 826-830.
6. Focke M, Marth K, Flicker S, Valenta R. Heterogeneity of commercial timothy grass pollen extracts. *Clin Exp Allergy.* 2008, 38:1400-8.
- 15 7. Mothes, N., Heinzkill, M., Drachenberg, K.J., Sperr, W.R., Krauth, M.T., Majlesi, Y., Semper, H., Valent, P., Niederberger, V., Kraft, D., y Valenta, R. (2003). Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. *Clin. Exp. Allergy* 33, 1198-1208.
8. Linhart B. y Valenta, R. (2005). Molecular design of allergy vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 646-655.
- 20 9. Niederberger, V., Horak, F., Vrtala, S., Spitzauer, S., Krauth, M.T., Valent, P., Reisinger, J., Pelzmann, M., Hayek, B., Kronqvist, M., Gafvelin, G., Gronlund, H., Purohit, A., Suck, R., Fiebig, H., Cromwell, O., Pauli, G., van Hage-Hamsten, M. y Valenta, R. (2004). Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 14677-14682.
10. Linhart, B., Jahn-Schmid, B., Verdino, P., Keller, W., Ebner, C., Kraft, D. y Valenta, R. (2002). Combination vaccines for the treatment of grass pollen allergy consisting of genetically engineered hybrid molecules with increased immunogenicity. *FASEB J.* 16, 1301-1303.
- 25 11. Linhart, B., Hartl, A., Jahn-Schmid, B., Verdino, P., Keller, W., Krauth, M.T., Valent, P., Horak, F., Wiedermann, U., Thalhammer, J., Ebner, C., Kraft, D. y Valenta, R. (2005). A hybrid molecule resembling the epitope spectrum of grass pollen for allergy vaccination. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115, 1010-1016.
12. Linhart, B. y Valenta, R. (2004). Vaccine engineering improved by hybrid technology. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 134, 324-331.
- 30 13. Vrtala S., Susani M., Sperr W.R., Valent P., Laffer S., Dolecek C., Kraft D. y Valenta R. (1996) Immunologic characterization of purified recombinant timothy grass pollen (*Phleum pratense*) allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5). *J Allergy Clin. Immunol* 97, 781-787.
- 35 14. Vrtala S., Fischer S., Grote M., Vangelista L., Pastore A., Sperr W.R., Valent P., Reichelt R., Kraft D. y Valenta R. (1999) Molecular, immunological, and structural characterization of Phl p 6, a major allergen and P-particle-associated protein from timothy grass (*Phleum pratense*) pollen. *J. Immunol.* 163, 5489-5496
15. Mothes-Luksch, N., S. Stumvoll, B. Linhart, M. Focke, M.T. Krauth, A. Hauswirth, P. Valent, P. Verdino, T. Pavkov, W. Keller, M. Grote, R. Valenta. 2008. Disruption of allergenic activity of the major grass pollen allergen Phl p 2 by reassembly as a mosaic protein. *J. Immunol.* 181:4864-73.
- 40 16. Ball, T., B. Linhart, K. Sonneck, . Blatt, H. Hermann, P. Valent, A. Stoecklinger, C. Lupinek, J. Thalhamer, A.A. Fedorov, S.C. Almo, R. Valenta. 2009. Reducing allergenicity by altering allergen fold: A mosaic protein of Phl p 1 for allergy vaccination. *Allergy* 64:569-80.
17. Vrtala S., Focke M, Kopec J, Verdino P, Hartl A, Sperr WR, Fedorov AA, Ball T, Almo S, Valent P, Thalhamer J, Keller W, Valenta R. Genetic engineering of the major timothy grass pollen allergen, Phl p 6, to reduce allergenic activity and preserve immunogenicity. *J. Immunol.* 2007. 179: 1730-9
- 45 18. Vrtala, S., K. Hirtenlehner, L. Vangelista, A. Pastore, H.-G. Eichler, W. R. Sperr, P. Valent, C. Ebner, D. Kraft, R. Valenta. 1997. Conversion of the major birch pollen allergen, Bet v 1, into two nonanaphylactic T cell epitope-containing fragments. Candidates for a novel form of specific immunotherapy. *J. Clin. Invest.* 99: 1673-1681.
19. Swoboda I, Bugajska-Schretter A, Linhart B, Verdino P, Keller W, Schulmeister U, Sperr WR, Valent P, Peltre

G, Quirce S, Douladiris N, Papadopoulos NG, Valenta R, Spitzauer S. A recombinant hypoallergenic parvalbumin mutant for immunotherapy of IgE-mediated fish allergy. J Immunol. 2007.178:6290-6.

5 20. Hauswirth AW, Natter S, Ghannadan M, Majlesi Y, Schernthaner GH, Sperr WR, Bühring HJ, Valenta R, Valent P.J. Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals. Allergy Clin Immunol. 2002. 110:102-9.

21. Linhart, B., Mothes-Luksch, N., Vrtala, S., Kneidinger, M., Valent, P. y Valenta, R. 2008. A hypoallergenic hybrid molecule with increased immunogenicity consisting of derivatives of the major grass pollen allergens, Phl p 2 and Phl p 6. Biol. Chem. 389:925-33.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Biomay AG

<120> Polipéptidos híbridos hipoalergénicos para el tratamiento de alergia

15 <130> moléculas hipoalergénicas híbridas

<160> 76

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1

<211> 240

<212> PRT

<213> Phleum pratense

25 <400> 1

ES 2 463 828 T3

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

<210> 2

5

<211> 96

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 2

ES 2 463 828 T3

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

<210> 3

<211> 97

5 <212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 3

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

10

<210> 4

<211> 508

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 4

5

```

Ser Ser Cys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Tyr Pro Thr Pro Leu Ala Lys
1          5          10          15

Glu Asp Phe Leu Arg Cys Leu Val Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu
20          25          30

Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr Pro Ser Val Leu Gly Gln Thr Ile
35          40          45

Arg Asn Ser Arg Trp Ser Ser Pro Asp Asn Val Lys Pro Ile Tyr Ile
50          55          60

Val Thr Pro Thr Asn Ala Ser His Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly
65          70          75          80

Arg Arg His Gly Val Arg Ile Arg Val Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr
85          90          95

Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gln Pro Glu Glu Phe Ala Val Val
100          105          110

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

Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile
130          135          140

His Lys Ala Ser Pro Val Leu Ala Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr
145          150          155          160

Ile Gly Val Gly Gly Asn Phe Ala Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu
165          170          175

```

ES 2 463 828 T3

Arg	Lys	Tyr	Gly	Ile	Ala	Ala	Glu	Asn	Val	Ile	Asp	Val	Lys	Leu	Val	180	185	190
Asp	Ala	Asn	Gly	Thr	Leu	His	Asp	Lys	Lys	Ser	Met	Gly	Asp	Asp	His	195	200	205
Phe	Trp	Ala	Val	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Ser	Phe	Gly	Ile	Val	Val	210	215	220
Ala	Trp	Lys	Val	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Pro	Pro	Thr	Val	Thr	Val	Phe	225	230	235
Lys	Ile	Pro	Lys	Lys	Ala	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Asp	Ile	Ile	Asn	Arg	245	250	255
Trp	Gln	Val	Val	Ala	Pro	Gln	Leu	Pro	Asp	Asp	Leu	Met	Ile	Arg	Val	260	265	270
Ile	Ala	Gln	Gly	Pro	Thr	Ala	Thr	Phe	Glu	Ala	Met	Tyr	Leu	Gly	Thr	275	280	285
Cys	Gln	Thr	Leu	Thr	Pro	Met	Met	Ser	Ser	Lys	Phe	Pro	Glu	Leu	Gly	290	295	300
Met	Asn	Ala	Ser	His	Cys	Asn	Glu	Met	Ser	Trp	Ile	Gln	Ser	Ile	Pro	305	310	315
Phe	Val	His	Leu	Gly	His	Arg	Asp	Asn	Ile	Glu	Asp	Asp	Leu	Leu	Asn	325	330	335
Arg	Asn	Asn	Thr	Phe	Lys	Pro	Phe	Ala	Glu	Tyr	Lys	Ser	Asp	Tyr	Val	340	345	350
Tyr	Glu	Pro	Phe	Pro	Lys	Glu	Val	Trp	Glu	Gln	Ile	Phe	Ser	Thr	Trp	355	360	365
Leu	Leu	Lys	Pro	Gly	Ala	Gly	Ile	Met	Ile	Phe	Asp	Pro	Tyr	Gly	Ala	370	375	380
Thr	Ile	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Trp	Ala	Thr	Pro	Phe	Pro	His	Arg	Lys	385	390	395
Gly	Val	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln	Tyr	Val	Asn	Tyr	Trp	Phe	Ala	Pro	Gly	405	410	415
Ala	Gly	Ala	Ala	Pro	Leu	Ser	Trp	Ser	Lys	Glu	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Met	420	425	430

ES 2 463 828 T3

Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg
435 440 445

Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu Val Val Asn Asp Val Ser Thr Phe
450 455 460

Ser Ser Gly Leu Val Trp Gly Gln Lys Tyr Phe Lys Gly Asn Phe Gln
465 470 475 480

Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys Val Asp Pro Thr Asp Tyr Phe Arg
485 490 495

Asn Glu Gln Ser Ile Pro Pro Leu Ile Gln Lys Tyr
500 505

<210> 5

<211> 287

5

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 5

ES 2 463 828 T3

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly
 20 25 30
 Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly
 35 40 45
 Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro Ala Asp Lys
 50 55 60
 Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
 65 70 75 80
 Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
 85 90 95
 Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
 100 105 110
 Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
 115 120 125
 Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val
 130 135 140
 His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
 145 150 155 160
 Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 165 170 175
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu
 180 185 190
 Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
 195 200 205
 Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr
 210 215 220
 Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
 225 230 235 240
 Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala
 245 250 255
 Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Val Gly
 260 265 270
 Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 275 280 285

<210> 6

<211> 110

<212> PRT

<213> Phleum pratense

5

<400> 6

```

Gly Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Asp Val Asn Ala
1          5          10          15

Ser Phe Arg Ala Ala Met Ala Thr Thr Ala Asn Val Pro Pro Ala Asp
          20          25          30

Lys Tyr Lys Thr Phe Glu Ala Ala Phe Thr Val Ser Ser Lys Arg Asn
          35          40          45

Leu Ala Asp Ala Val Ser Lys Ala Pro Gln Leu Val Pro Lys Leu Asp
          50          55          60

Glu Val Tyr Asn Ala Ala Tyr Asn Ala Ala Asp His Ala Ala Pro Glu
65          70          75          80

Asp Lys Tyr Glu Ala Phe Val Leu His Phe Ser Glu Ala Leu Arg Ile
          85          90          95

Ile Ala Gly Thr Pro Glu Val His Ala Val Lys Pro Gly Ala
          100          105          110

```

10

<210> 7

<211> 78

<212> PRT

<213> Phleum pratense

15

<400> 7

ES 2 463 828 T3

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

<210> 8

<211> 143

5

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 8

Asp Lys Gly Pro Gly Phe Val Val Thr Gly Arg Val Tyr Cys Asp Pro
 1 5 10 15
 Cys Arg Ala Gly Phe Glu Thr Asn Val Ser His Asn Val Gln Gly Ala
 20 25 30
 Thr Val Ala Val Asp Cys Arg Pro Phe Asn Gly Gly Glu Ser Lys Leu
 35 40 45
 Lys Ala Glu Ala Thr Thr Asp Gly Leu Gly Trp Tyr Lys Ile Glu Ile
 50 55 60
 Asp Gln Asp His Gln Glu Glu Ile Cys Glu Val Val Leu Ala Lys Ser
 65 70 75 80
 Pro Asp Thr Thr Cys Ser Glu Ile Glu Glu Phe Arg Asp Arg Ala Arg
 85 90 95
 Val Pro Leu Thr Ser Asn Asn Gly Ile Lys Gln Gln Gly Ile Arg Tyr
 100 105 110
 Ala Asn Pro Ile Ala Phe Phe Arg Lys Glu Pro Leu Lys Glu Cys Gly
 115 120 125
 Gly Ile Leu Gln Ala Tyr Asp Leu Arg Asp Ala Pro Glu Thr Pro
 130 135 140

10

<210> 9

<211> 131

<212> PRT

<213> Phleum pratense

5 <400> 9

```

Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Glu Ile Glu
1          5          10          15

Gly His His Leu Ala Ser Ala Ala Ile Leu Gly His Asp Gly Thr Val
          20          25          30

Trp Ala Gln Ser Ala Asp Phe Pro Gln Phe Lys Pro Glu Glu Ile Thr
          35          40          45

Gly Ile Met Lys Asp Phe Asp Glu Pro Gly His Leu Ala Pro Thr Gly
50          55          60

Met Phe Val Ala Gly Ala Lys Tyr Met Val Ile Gln Gly Glu Pro Gly
65          70          75          80

Arg Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly Ala Gly Gly Ile Thr Ile Lys Lys
          85          90          95

Thr Gly Gln Ala Leu Val Val Gly Ile Tyr Asp Glu Pro Met Thr Pro
          100          105          110

Gly Gln Cys Asn Met Val Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu Val Glu
          115          120          125

Gln Gly Met
          130

```

<210> 10

10 <211> 360

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 10

15

```

Gly Lys Lys Glu Glu Lys Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ser Gly Asp Ala
1          5          10          15

Ala Ser Gly Ala Asp Gly Thr Tyr Asp Ile Thr Lys Leu Gly Ala Lys
          20          25          30

```

ES 2 463 828 T3

Pro Asp Gly Lys Thr Asp Cys Thr Lys Glu Val Glu Glu Ala Trp Ala
 35 40 45
 Ser Ala Cys Gly Gly Thr Gly Lys Asn Thr Ile Val Ile Pro Lys Gly
 50 55 60
 Asp Phe Leu Thr Gly Pro Leu Asn Phe Thr Gly Pro Cys Lys Gly Asp
 65 70 75 80
 Ser Val Thr Ile Lys Leu Asp Gly Asn Leu Leu Ser Ser Asn Asp Leu
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Lys Ala Asn Trp Ile Glu Ile Met Arg Ile Lys Lys Leu
 100 105 110
 Thr Ile Thr Gly Lys Gly Thr Leu Asp Gly Gln Gly Lys Ala Val Trp
 115 120 125
 Gly Lys Asn Ser Cys Ala Lys Asn Tyr Asn Cys Lys Ile Leu Pro Asn
 130 135 140
 Thr Leu Val Leu Asp Phe Cys Asp Asp Ala Leu Ile Glu Gly Ile Thr
 145 150 155 160
 Leu Leu Asn Ala Lys Phe Phe His Met Asn Ile Tyr Glu Cys Lys Gly
 165 170 175
 Val Thr Val Lys Asp Val Thr Ile Thr Ala Pro Gly Asp Ser Pro Asn
 180 185 190
 Thr Asp Gly Ile His Ile Gly Asp Ser Ser Lys Val Thr Ile Thr Asp
 195 200 205
 Thr Thr Ile Gly Thr Gly Asp Asp Cys Ile Ser Ile Gly Pro Gly Ser
 210 215 220
 Thr Gly Leu Asn Ile Thr Gly Val Thr Cys Gly Pro Gly His Gly Ile
 225 230 235 240
 Ser Val Gly Ser Leu Gly Arg Tyr Lys Asp Glu Lys Asp Val Thr Asp
 245 250 255
 Ile Thr Val Lys Asn Cys Val Leu Lys Lys Ser Thr Asn Gly Leu Arg
 260 265 270
 Ile Lys Ser Tyr Glu Asp Ala Lys Ser Pro Leu Thr Ala Ser Lys Leu
 275 280 285

Thr Tyr Glu Asn Val Lys Met Glu Asp Val Gly Tyr Pro Ile Ile Ile
 290 295 300

Asp Gln Lys Tyr Cys Pro Asn Lys Ile Cys Thr Ser Lys Gly Asp Ser
 305 310 315 320

Ala Arg Val Thr Val Lys Asp Val Thr Phe Arg Asn Ile Thr Gly Thr
 325 330 335

Ser Ser Thr Pro Glu Ala Val Ser Leu Leu Cys Ser Asp Lys Gln Pro
 340 345 350

Cys Asn Gly Val Thr Met Asn Asp
 355 360

<210> 11

<211> 1066

5

<212> ADN

<213> Phleum pratense

<400> 11

atggcttctt cctcgtcggg tctgctgggc gtgggtgcttt tcgccgtctt cctgggctct	60
gcgtatggca tccccaaggt tccccgggt ccgaacatca cggcgacctt cggcgacaag	120
tggtcgcagc cgaagagcac atggtacggc aagccgaccg gcgccgttcc caaggacaac	180
ggcggcgctt gcgggtacaa ggatgtggac aagccccgt tcagcggcat gaccggctgc	240
ggcaacaccc ccatcttcaa gtccggagcg ggctgcggct cctgctttga gatcaagtgc	300
accaagcccg aggcctgctc tggcgagccc gtggtagtcc acatcaccga cgacaacgag	360
gagcccatcg cccctacca cttcgacctc tccggccacg cgttcggggc gatggccaag	420
aagggcgatg agcagaagct gcgcagcgcc ggcgagctgg agctccagtt ccggcgctc	480
aagtgcaagt acccgaggag caccaaggtg accttcacg tggagaaggg gtccaacccc	540
aactacctgg cgctgcttgt gaagtacgtt aacggcgacg gagacgtggt ggcggtggac	600
atcaaggaga agggcaagga caagtggatc gagctcaagg agtcgtgggg agccatctgg	660
aggatcgaca ctcccgacaa gctcacgggc cccttcaccg tccgctacac caccgagggc	720
ggcaccaaga ccgaagccga ggacgtcatc cctgaggggt ggaaggccga caccagctac	780
gagtccaagt gaacaaggag aagtgatcct ctgccttcct cttccggccc ctgcttaatt	840
aattttgcct caaggttacc aataaaccgg ccacagcgag aagacaacca caagcttccg	900
gatgcatgag catattcatg ctgatacgag aataatagtt tgaggtcgag atcttgtgag	960
gtgaaattat gtaggagaca accaatgaag aattggctgc cctcccgccc actcccgacc	1020
gccttgttca tgtatctaaa acagttcatg attatgaaga tatatt	1066

10

<210> 12

<211> 525

<212> ADN

<213> Phleum pratense

5 <400> 12

ttggatatca acccgatatcg atccatgtcc atggcgctcct cctcaagcag cagcttgctg	60
gccatggcgg tgctggcggc gctgtttgcc ggcgcggtgt g�gtcccga ggtgacgttc	120
acggtggaga aggggtccaa cgagaagcac ctggcggtgc tggatgaagta cgagggggac	180
accatggcgg aggtggagct ccgggagcac ggctccgacg agtgggtcgc catgaccaag	240
ggggagggcg gcgtgtggac gttcgacagc gaggagccgc tccaggggcc cttcaacttc	300
cggttcctca ccgagaaggc catgaagaac gtcttcgacg acgtcgtccc agagaagtac	360
accattgggg ccacctacgc gccagaagag tagccatcgg tccatccaca tgcattgatga	420
tccttccatc catctgattt agttcgattt tccttgtgtt ttggaacgaa ttgttgcaaa	480
ttacatgttc aaagacatat gttgcacgaa attttttact aaaaa	525

<210> 13

10 <211> 294

<212> ADN

<213> Phleum pratense

<400> 13

15

gccgtgcagg tgacctttac tgtgcagaag gggtccgacc ccaagaagct ggtgctggac	60
atcaagtaca cgaggccagg ggacagcctc gcggaggtgg agctccggca gcacggctcc	120
gaggagtggg agcccctgac gaagaagggc aacgtgtggg aggtgaagag ctccaagccg	180
ctcgttggcc ccttcaactt ccgcttcattg tccaagggtg gcatgaggaa cgtcttcgac	240
gaggatcatc ccaccgcctt ctcgatcggc aaaacctaca aaccggaaga gtga	294

<210> 14

<211> 1567

20 <212> ADN

<213> Phleum pratense

<400> 14

tcctcctgcg aggtcgccct ctctactat ccgacgccgt tagcgaagga ggacttcctc 60
cgatgcctcg tgaaggagat cccgcgcgc ctctctacg ccaagagctc gcccgccctac 120
ccctcagtc tggggcagac catccggaac tcgcggtggt cgtcgccgga caacgtgaag 180
ccgatctaca tcgtcacccc caccaacgcc tcccacatcc agtcgcgcgt ggtgtgcggc 240
cgccggcacg gtgtccgcat ccgcgtgcgc agcggcgggc acgactacga gggcctctcg 300
taccggtccc tgcagcccga ggagttcgcc gtgcgtcgacc ttagcaagat gcgggcccgtg 360
tgggtggacg ggaaggcccg cacggcgtgg gtgcactccg gcgcgcagct cggcgagctc 420
tactacgcca tccacaaggc gagtccagtg ctggcggttc cggccggcgt gtgcccgacc 480
atcggcgtgg gcggcaactt cgcggggcgc ggcttcggca tgctgctgcg caagtacggc 540
atcgcgcccg agaacgtcat cgacgtgaag ctgcgtcgacg ccaacggcac gctgcacgac 600
aagaagtcca tgggcgacga ccatttctgg gccgtcaggg gcggcggggg cgagagcttc 660
ggcatcgtgg tcgcgtggaa ggtgaggctc ctgccggtgc cggccacggt gaccgtgttc 720
aagatcccca agaaggcgag cgaggcgcc gtggacatca tcaacaggtg gcagggtgtc 780
gcgcgcgacg tccccgacga cctcatgac cgcgtcatcg cgcaggggcc cacggccacg 840
ttcgaggcca tgtacctggg cacctgcca accctgacgc cgatgatgag cagcaagttc 900
cccgagctcg gcatgaacgc ctgcactgc aacgagatgt cgtggatcca gtccatcccc 960
ttcgtccacc tcggccacag ggacaacatc gaggacgacc tcctcaaccg gaacaacacc 1020
ttcaagccct tcgccgaata caagtccgac tacgtctacg agccgttccc caaggaagtg 1080
tgggagcaga tcttcagcac ctggctcctg aagcccggcg cggggatcat gatcttcgac 1140
ccctacggcg ccaccatcag cgccaccccg gagtgggcca cgccgttccc tcaccgcaag 1200
ggcgtcctct tcaacatcca gtacgtcaac tactggttcg ccccgggagc cggcgcggcg 1260
ccattgtcgt ggagcaagga gatctacaac tacatggagc catacgtgag caagaacccc 1320
aggcaggcct acgccaacta cagggacatc gacctcggga ggaacgaggt ggtgaacgac 1380
gtctccacct tcagcagcgg tttggtgtgg ggccagaaat acttcaaggg caatttccag 1440
aggctcgcca tcaccaaggg caaggtggat cccaccgact acttcaggaa cgagcagagc 1500
atcccgccgc tcatccagaa gtactagcta gggagatcga tcatgcattt gctggggcgt 1560
tcgtgga 1567

<210> 15

5

<211> 1192

<212> ADN

<213> Phleum pratense

<400> 15

10

```

ccccatatct tcccacctac ggtacaaaaca acagcaagca gcaatggcgg tgcaccagta      60
cactgtggcg ctgttcctcg ccgtggccct cgtggcgggc ccggccgcct cctacgcggc      120
cgatctcggg tacggccccg ccaccccagc tgccccggcc gccggctaca cccccgccac      180
ccccgcgcgc ccggccgaag cggcgccagc aggttaaggcg acgaccgagg agcagaagct      240
gatcgagaag atcaacgccg gcttcaaggc ggccctggcc gccgcgcgcg gcgtccagcc      300
agcggacaag tacaggacgt tcgtcgcaac cttcggcgcg gcctccaaca aggccttcgc      360
ggagggcctc tcgggcgagc ccaagggcgc cgccgaatcc agctccaagg ccgcgctcac      420
ctccaagctc gacgccgcct acaagctcgc ctacaagaca gccgaggcg cgacgcctga      480
ggccaagtac gacgcctacg tcgccaccct aagcgaggcg ctccgcatca tcgccggcac      540
cctcgaggtc caccgcgtca agcccgcggc cgaggaggtc aaggcatcc ccgccggcga      600
gctgcaggtc atcgagaagg tcgacgccgc cttcaaggtc gctgccaccg ccgccaacgc      660
cgcccccgcc aacgacaagt tcaccgtctt cgaggccgcc ttcaacgacg ccatcaaggc      720
gagcacgggc ggcgccctacg agagctacaa gttcatcccc gccctggagg ccgccgtcaa      780
gcaggccctac gccgccaccg tcgccaccgc gccggaggtc aagtacactg tctttgagac      840
cgcaactgaaa aaggccatca ccgccatgtc cgaggcacag aaggctgcc aagccgcgcg      900
cgctgccacc gccaccgcaa ccgccgcggt tggcgcggcc accggcgccg ccaccgcgcg      960
tactggtggc tacaaagtct gatcaactcg cgaatagtat acatcaatca cgcacatata     1020
cgaccgtacg tatgtgtgca tgcatcgccg tcgcgtcgag caattttgct gataattaat     1080
tcttgagttt ttcgttgcat gcatccgcgc gttatagagc gcatgcacgc attgccattt     1140
gtgtataata atcaaatatc tgcaattcat ttatgaaaaa aaaaaaaaaa aa             1192

```

<210> 16

5

<211> 571

<212> ADN

<213> Phleum pratense

<400> 16

10

ES 2 463 828 T3

```

ccaacgcacg agtagcaatg gcagcgcaca agttcatggt ggcgatgttc ctcgctgttg      60
ccgttggtgtt gggcttggcc acatccccaa ctgcagaggg agggaaggcc acgaccgagg      120
agcaaaaatt gattgaggac gtcaatgcc a gctttagggc ggccatggcc accactgcta      180
acgtccctcc agcagacaag tataagacat tcgaagccgc cttcacggtg tcctcaaaga      240
gaaacctcgc tgacgccgtt tcaaaggcgc cccagctggt cccaagctc gatgaagtct      300
acaacgccgc ctacaatget gccgatcatg ccgcccaga agacaagtat gaagccttcg      360
tccttcactt ttccgaggct ctccgtatca tcgccggtac ccccgagggt caccgtgtca      420
agccccggcg gtagttgttc agcacggtca agatccttga cagcgtcgtt gccaccggcg      480
ctgcagccaa cactgccagt ggctaaaaaa ttcgactagc tccttcatac aatgaataca      540
catgtatcat tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a                                  571

```

<210> 17

<211> 575

5

<212> ADN

<213> Phleum pratense

<400> 17

```

ccgattcgaa gagtgattcg agctagaagg aggagggatc gatcgataat ggcggacgac      60
atggagagga tcttcaagag gttcgacacg aacggtgacg ggaagatctc tctgtcggag      120
ctgacgggac cactgccggc gctgggctcg acgtcggcgg acgaggtgca gcgcatgatg      180
gcggagatcg acaccgacgg cgacggcttc atcgacttca acgagttcat ctcttctgc      240
aacgccaacc ctggactcat gaaggacgtc gccaaagtct tctgaaaccg ttccatttca      300
cctcagccgt cccatcctgc atcagcatcg atttatcgta cggccggctt tgatttcttt      360
gatctattct cgggtactga gcctcctctt cagttgaggc cggccctaaa ttttgatcat      420
ttatttgctt ctagtaactg ttggtgacca ctgtactatc attttttccc tattaatttt      480
cctgtatttc tctttctttt tataaccactc attttgtatc tctggcttca gctcgaaccg      540
tacgttacgt gcttccaatt gtctgtgtgc ggact                                  575

```

10

<210> 18

<211> 786

15

<212> ADN

<213> Phleum pratense

<400> 18

ES 2 463 828 T3

gacaagggcc cgggcttcgt ggtgacggga cgcgtctact gcgacccctg ccgcgcgggc 60
 ttcgagacca acgtctccca caacgtccaa ggggcgaccg tggcggtgga ctgccggccg 120
 ttcaacggcg gcgagagcaa gctcaaggcg gaggcgacga cggacggtct gggctggtac 180
 aagatcgaga tcgaccagga ccaccaggag gagatctgcg aggtggtgct ggccaagagc 240
 cccgacacga cgtgctccga gatcgaggag ttccgcgacc gcgcccgcgt cccgctcacc 300
 agcaacaacg gcatcaagca gcagggcac cgtacgcca accccatcgc attcttcgcg 360
 aaggagccgc tcaaggagtg cggcgggac ctcaggcct acgacctcag ggacgcccc 420
 gagacgccat gaagccccac accagcacga cgtaccacct atagttactt gccgcgggcc 480
 gagacgatgt tacctctgcg agccgctgcc ggagaggara tgacaacctt ttaatgggcc 540
 tcacgtgcg cttaatattc rcgtcctgct ttctcttta ttcattgtat tgtcttctg 600
 tyctctaatt atttacgtgt tgacctatat gtgagctagt tccaaggatc tgttctatgt 660
 gtaataagag aacacaaata tttsgtacgt gcatatccga tgtatatcct cttttcgggg 720
 aaaaaaawa ytctgatgta tatcctctgg acacaaatta artggccagc taatgaatts 780
 agtact 786

<210> 19

<211> 396

5

<212> ADN

<213> Phleum pratense

<400> 19

atgtcgtggc agacgtacgt ggacgagcac ctgatgtgcg agatcgaggg ccaccacctc 60
 gcctcggcgg ccacctcctg ccacgacggc accgtctggg cccagagcgc cgacttcccc 120
 cagttcaagc ctgaggagat caccggcacc atgaaggatt tcgacgagcc ggggcacctc 180
 gccccaccg gcatgttcgt cgcagggtgcc aagtacatgg tcatccaggg tgaacccggc 240
 cgcgtcatcc gtggcaagaa gggagcagga ggcacacca taaagaagac cgggcaggcg 300
 ctggctcgtc gcatctatga cgagcccatg acccctgggc agtgcaacat ggtggtggag 360
 aggcttggcg actacctcgt tgaacaaggc atgtag 396

10

<210> 20

<211> 1492

<212> ADN

15

<213> Phleum pratense

<400> 20

```

gggaagaagg aggagaagaa ggaggagaag aaggagagtg gagatgctgc gtccggggcc 60
gacggaacct acgacatcac caagctcggc gccaaacccg acggcaagac ggactgcacc 120
aaggaggtgg aggaggcatg ggcttcggct tgcggtggta ccgggaagaa tacgatcgtc 180
atccccaagg gtgatttcct gaccgggcct ctgaatttca ccgggccatg caagggcgac 240
agcgtcacca tcaagctgga cggcaacctg ctgagctcca acgacctggc caagtacaag 300
gctaactgga tcgagatcat gcggatcaag aaactcacta tcaccggcaa aggcacgctc 360
gacggccaag gcaaggccgt gtggggcaag aacagctgcg ccaagaacta caactgcaag 420
atcttgccaa acacattggt gctggacttc tgtgacgacg ctctcatcga aggcatacc 480
ctcctaaacg ccaagttctt ccatatgaac atctacgagt gcaagggcgt gaccgtcaag 540
gacgtgacca tcaccgcgcc cggggacagc cccaacaccg acggcatcca catcggcgac 600
tcgtccaagg tcaccatcac cgacaccacc atcggcaccg gcgacgactg catctccatc 660
ggccccggaa gcaccggcct caacatcacc ggcgtgacct gcggtccagg ccacggcatc 720
agcgttgcca gcctgggacg gtacaaggac gagaaggacg tgaccgacat caccgtaaag 780
aactgcgtgc tcaagaagtc caccaacggc ctccggatca agtcgtacga ggacgccaag 840
tcgccgctga cggcgctgaa gctgacctac gagaacgtga agatggagga cgtgggctac 900
cccatcatca tcgaccagaa gtactgcccc aacaagatct gcacctccaa gggagactcc 960
gccagggtea ccgtcaagga cgtcaccttc cgcaacatca ccggcacctc ctccaccccc 1020
gaggccgtea gcctgctctg ctccgacaag cagccctgca atgggtgtcac catgaacgac 1080
gtcaagatcg agtacagcgg caccaacaac aagaccatgg ctgtctgcac caacgccaag 1140
gtcaccgcca aggggtgtcag cgaggotaac acctgcgccg cctgatgagc gactcttctc 1200
cacctgcttc cacttccat caattcgtcc tacctcccac acatgtcctt tttctgaag 1260
agataattaa caagaccgcg cgtgcatatc ctggcgatca tttctgcta actctggaga 1320
tgtaccctag acataaatac tgtgcgatat tatggtaaata gcgaatcctt taatctacct 1380
gtgctcaagt tgtgccgggt ttttgtatga taaacagatt atgtaacttt tttctgtaat 1440
ctttttattg catccgaatt tctggaattt tagtcaaaaa aaaaaaaaaa aa 1492

```

<210> 21

<211> 246

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción A sin Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

10

<400> 21

Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro
1 5 10 15

Glu Ala Cys Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn
20 25 30

Glu Glu Pro Ile Ala Pro Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly His Ala Phe
35 40 45

Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Thr Gly Pro
50 55 60

Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Thr Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ser Tyr Glu Ser Lys
85 90 95

Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro
100 105 110

Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu
115 120 125

Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro
130 135 140

Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu Arg
145 150 155 160

Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala Asp
165 170 175

Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly Tyr Thr
180 185 190

Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Lys Ala
195 200 205

Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys
210 215 220

Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro Ala Asp Lys Tyr Arg
225 230 235 240

Thr Phe Val Ala Thr Phe
245

<210> 22

<211> 281

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción B sin Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

<400> 22

```

Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val
 1              5              10              15

Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met
 20              25              30

Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr
 35              40              45

Ala Thr Ala Ala Val Gly Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr
 50              55              60

Gly Gly Tyr Lys Val Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly Glu
65              70              75              80

Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr
 85              90              95

Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu Ala
100              105              110

Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Ser
115              120              125

Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly
130              135              140

Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser
145              150              155              160

Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Gly Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly
165              170              175

Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr
180              185              190

Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys Ser Ala Gly Glu Leu Glu Leu
195              200              205

Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr
210              215              220

```

ES 2 463 828 T3

Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val
225 230 235 240

Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val Asp Ile Lys Glu
245 250 255

Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Glu Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile
260 265 270

Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu
275 280

<210> 23

<211> 246

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción C sin Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

10

<400> 23

ES 2 463 828 T3

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

<210> 24

<211> 281

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción D sin Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

<400> 24

5

```

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

Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Gly Ala
          20          25          30

Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
          35          40          45

Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
          50          55          60

Ser Ala Gly Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr
65          70          75          80

Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro
          85          90          95

Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly Asp Val
          100          105          110

Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Glu Leu

```

ES 2 463 828 T3

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

<210> 25

<211> 294

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción E sin Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

10

<400> 25

Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro
 1 5 10 15
 Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu
 20 25 30
 Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro
 35 40 45
 Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu Arg
 50 55 60
 Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala Asp
 65 70 75 80
 Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly Tyr Thr
 85 90 95
 Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Lys Ala
 100 105 110
 Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys
 115 120 125
 Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro Ala Asp Lys Tyr Arg
 130 135 140
 Thr Phe Val Ala Thr Phe Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile
 145 150 155 160
 Thr Ala Thr Tyr Gly Asp Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr
 165 170 175
 Gly Lys Pro Thr Gly Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly
 180 185 190
 Tyr Lys Asp Val Asp Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly
 195 200 205
 Asn Thr Pro Ile Phe Lys Ser Ala Gly Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg
 210 215 220
 Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val
 225 230 235 240
 Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Tyr Val
 245 250 255
 Asn Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys
 260 265 270
 Asp Lys Trp Ile Glu Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile
 275 280 285
 Asp Thr Pro Asp Lys Leu
 290

<210> 26

<211> 294

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> construcción F sin Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

<400> 26

10

ES 2 463 828 T3

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

ES 2 463 828 T3

Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly Tyr Thr
225 230 235 240

Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Lys Ala
245 250 255

Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys
260 265 270

Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro Ala Asp Lys Tyr Arg
275 280 285

Thr Phe Val Ala Thr Phe
290

<210> 27

<211> 233

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción G sin Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

10

<400> 27

ES 2 463 828 T3

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

<210> 28

5

<211> 233

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción H sin Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

<400> 28

```

Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val
1          5          10          15

Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met
20          25          30

Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr
35          40          45

Ala Thr Ala Ala Val Gly Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr
50          55          60

Gly Gly Tyr Lys Val Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly Glu
65          70          75          80

Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr
85          90          95

Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu Ala
100         105         110

Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Ser
115         120         125

Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser
130         135         140

Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro Glu Ala Cys Ser Gly Glu Pro
145         150         155         160

Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Pro Tyr
165         170         175

His Phe Asp Leu Ser Gly His Ala Phe Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly
180         185         190

Asp Glu Gln Lys Leu Arg Thr Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr
195         200         205

Glu Gly Gly Thr Lys Thr Glu Ala Glu Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp
210         215         220

Lys Ala Asp Thr Ser Tyr Glu Ser Lys
225         230

```

<210> 29

<211> 176

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> construcción I sin Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

<400> 29

Ala	Asp	Lys	Tyr	Lys	Thr	Phe	Glu	Ala	Ala	Phe	Thr	Val	Ser	Ser	Lys	1	5	10	15
Arg	Asn	Leu	Ala	Asp	Ala	Val	Ser	Lys	Ala	Pro	Gln	Leu	Val	Pro	Lys	20	25	30	
Leu	Asp	Glu	Val	Tyr	Asn	Ala	Ala	Tyr	Asn	Ala	Ala	Asp	His	Ala	Ala	35	40	45	
Pro	Glu	Asp	Lys	Tyr	Glu	Ala	Phe	Val	Leu	His	Phe	Ser	Glu	Ala	Leu	50	55	60	
Arg	Ile	Ile	Ala	Gly	Thr	Pro	Glu	Val	His	Ala	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	65	70	75	80
Gly	Val	Trp	Thr	Phe	Asp	Ser	Glu	Glu	Pro	Leu	Gln	Gly	Pro	Phe	Asn	85	90	95	
Phe	Arg	Phe	Leu	Thr	Glu	Lys	Gly	Met	Lys	Asn	Val	Phe	Asp	Asp	Val	100	105	110	
Val	Pro	Glu	Lys	Tyr	Thr	Ile	Gly	Ala	Thr	Tyr	Ala	Pro	Glu	Glu	Val	115	120	125	
Pro	Lys	Val	Thr	Phe	Thr	Val	Glu	Lys	Gly	Ser	Asn	Glu	Lys	His	Leu	130	135	140	
Ala	Val	Leu	Val	Lys	Tyr	Glu	Gly	Asp	Thr	Met	Ala	Glu	Val	Glu	Leu	145	150	155	160
Arg	Glu	His	Gly	Ser	Asp	Glu	Trp	Val	Ala	Met	Thr	Lys	Gly	Glu	Gly	165	170	175	

10

<210> 30

<211> 176

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción J sin Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

<400> 30

5

```

Gly Val Trp Thr Phe Asp Ser Glu Glu Pro Leu Gln Gly Pro Phe Asn
1          5          10          15

Phe Arg Phe Leu Thr Glu Lys Gly Met Lys Asn Val Phe Asp Asp Val
          20          25          30

Val Pro Glu Lys Tyr Thr Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Pro Glu Glu Val
          35          40          45

Pro Lys Val Thr Phe Thr Val Glu Lys Gly Ser Asn Glu Lys His Leu
          50          55          60

Ala Val Leu Val Lys Tyr Glu Gly Asp Thr Met Ala Glu Val Glu Leu
65          70          75          80

Arg Glu His Gly Ser Asp Glu Trp Val Ala Met Thr Lys Gly Glu Gly
          85          90          95

Ala Asp Lys Tyr Lys Thr Phe Glu Ala Ala Phe Thr Val Ser Ser Lys
          100          105          110

Arg Asn Leu Ala Asp Ala Val Ser Lys Ala Pro Gln Leu Val Pro Lys
          115          120          125

Leu Asp Glu Val Tyr Asn Ala Ala Tyr Asn Ala Ala Asp His Ala Ala
          130          135          140

Pro Glu Asp Lys Tyr Glu Ala Phe Val Leu His Phe Ser Glu Ala Leu
145          150          155          160

Arg Ile Ile Ala Gly Thr Pro Glu Val His Ala Val Lys Pro Gly Ala
          165          170          175

```

<210> 31

10

<211> 176

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> construcción K sin Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

<400> 31

ES 2 463 828 T3

Gly Val Trp Thr Phe Asp Ser Glu Glu Pro Leu Gln Gly Pro Phe Asn
 1 5 10 15
 Phe Arg Phe Leu Thr Glu Lys Gly Met Lys Asn Val Phe Asp Asp Val
 20 25 30
 Val Pro Glu Lys Tyr Thr Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Pro Glu Glu Ala
 35 40 45
 Asp Lys Tyr Lys Thr Phe Glu Ala Ala Phe Thr Val Ser Ser Lys Arg
 50 55 60
 Asn Leu Ala Asp Ala Val Ser Lys Ala Pro Gln Leu Val Pro Lys Leu
 65 70 75 80
 Asp Glu Val Tyr Asn Ala Ala Tyr Asn Ala Ala Asp His Ala Ala Pro
 85 90 95
 Glu Asp Lys Tyr Glu Ala Phe Val Leu His Phe Ser Glu Ala Leu Arg
 100 105 110
 Ile Ile Ala Gly Thr Pro Glu Val His Ala Val Lys Pro Gly Ala Val
 115 120 125
 Pro Lys Val Thr Phe Thr Val Glu Lys Gly Ser Asn Glu Lys His Leu
 130 135 140
 Ala Val Leu Val Lys Tyr Glu Gly Asp Thr Met Ala Glu Val Glu Leu
 145 150 155 160
 Arg Glu His Gly Ser Asp Glu Trp Val Ala Met Thr Lys Gly Glu Gly
 165 170 175

<210> 32

5 <211> 176

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> construcción L sin Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

<400> 32

Val Pro Lys Val Thr Phe Thr Val Glu Lys Gly Ser Asn Glu Lys His
 1 5 10 15

Leu Ala Val Leu Val Lys Tyr Glu Gly Asp Thr Met Ala Glu Val Glu
 20 25 30

Leu Arg Glu His Gly Ser Asp Glu Trp Val Ala Met Thr Lys Gly Glu
 35 40 45

Gly Ala Asp Lys Tyr Lys Thr Phe Glu Ala Ala Phe Thr Val Ser Ser
 50 55 60

Lys Arg Asn Leu Ala Asp Ala Val Ser Lys Ala Pro Gln Leu Val Pro
 65 70 75 80

Lys Leu Asp Glu Val Tyr Asn Ala Ala Tyr Asn Ala Ala Asp His Ala
 85 90 95

Ala Pro Glu Asp Lys Tyr Glu Ala Phe Val Leu His Phe Ser Glu Ala
 100 105 110

Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Pro Glu Val His Ala Val Lys Pro Gly
 115 120 125

Ala Gly Val Trp Thr Phe Asp Ser Glu Glu Pro Leu Gln Gly Pro Phe
 130 135 140

Asn Phe Arg Phe Leu Thr Glu Lys Gly Met Lys Asn Val Phe Asp Asp
 145 150 155 160

Val Val Pro Glu Lys Tyr Thr Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Pro Glu Glu
 165 170 175

<210> 33

<211> 703

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción M sin Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

10

<400> 33

Ala Asp Lys Tyr Lys Thr Phe Glu Ala Ala Phe Thr Val Ser Ser Lys
 1 5 10 15

ES 2 463 828 T3

Arg Asn Leu Ala Asp Ala Val Ser Lys Ala Pro Gln Leu Val Pro Lys
 20 25 30
 Leu Asp Glu Val Tyr Asn Ala Ala Tyr Asn Ala Ala Asp His Ala Ala
 35 40 45
 Pro Glu Asp Lys Tyr Glu Ala Phe Val Leu His Phe Ser Glu Ala Leu
 50 55 60
 Arg Ile Ile Ala Gly Thr Pro Glu Val His Ala Val Lys Pro Gly Ala
 65 70 75 80
 Gly Val Trp Thr Phe Asp Ser Glu Glu Pro Leu Gln Gly Pro Phe Asn
 85 90 95
 Phe Arg Phe Leu Thr Glu Lys Gly Met Lys Asn Val Phe Asp Asp Val
 100 105 110
 Val Pro Glu Lys Tyr Thr Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Pro Glu Glu Val
 115 120 125
 Pro Lys Val Thr Phe Thr Val Glu Lys Gly Ser Asn Glu Lys His Leu
 130 135 140
 Ala Val Leu Val Lys Tyr Glu Gly Asp Thr Met Ala Glu Val Glu Leu
 145 150 155 160
 Arg Glu His Gly Ser Asp Glu Trp Val Ala Met Thr Lys Gly Glu Gly
 165 170 175
 Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro
 180 185 190
 Glu Ala Cys Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn
 195 200 205
 Glu Glu Pro Ile Ala Pro Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly His Ala Phe
 210 215 220
 Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Thr Gly Pro
 225 230 235 240
 Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Thr Glu Ala Glu
 245 250 255
 Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ser Tyr Glu Ser Lys
 260 265 270
 Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro

ES 2 463 828 T3

275	280	285
Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu 290 295 300		
Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro 305 310 315 320		
Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu Arg 325 330 335		
Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala Asp 340 345 350		
Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly Tyr Thr 355 360 365		
Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Lys Ala 370 375 380		
Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys 385 390 395 400		
Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro Ala Asp Lys Tyr Arg 405 410 415		
Thr Phe Val Ala Thr Phe Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val 420 425 430		
Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu Lys 435 440 445		
Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys Pro Ala 450 455 460		
Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Val Gly Ala Ala Thr Gly 465 470 475 480		
Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val Ala Glu Glu Val Lys 485 490 495		
Val Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala 500 505 510		
Phe Lys Val Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys 515 520 525		
Phe Thr Val Phe Glu Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr 530 535 540		

Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ile
545 550 555 560

Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp Lys
565 570 575

Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Gly Ala Gly
580 585 590

Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys Pro
595 600 605

Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys Ser
610 615 620

Ala Gly Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro
625 630 635 640

Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn
645 650 655

Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly Asp Val Val
660 665 670

Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Glu Leu Lys
675 680 685

Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu
690 695 700

<210> 34

<211> 703

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción N sin Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

10

<400> 34

ES 2 463 828 T3

Ala Asp Lys Tyr Lys Thr Phe Glu Ala Ala Phe Thr Val Ser Ser Lys
1 5 10 15

Arg Asn Leu Ala Asp Ala Val Ser Lys Ala Pro Gln Leu Val Pro Lys
20 25 30

Leu Asp Glu Val Tyr Asn Ala Ala Tyr Asn Ala Ala Asp His Ala Ala
35 40 45

Pro Glu Asp Lys Tyr Glu Ala Phe Val Leu His Phe Ser Glu Ala Leu

ES 2 463 828 T3

50	55	60
Arg Ile Ile Ala Gly Thr Pro Glu Val His Ala Val Lys Pro Gly Ala		
65	70	75 80
Val Pro Lys Val Thr Phe Thr Val Glu Lys Gly Ser Asn Glu Lys His		
	85	90 95
Leu Ala Val Leu Val Lys Tyr Glu Gly Asp Thr Met Ala Glu Val Glu		
	100	105 110
Leu Phe Arg Phe Leu Thr Glu Lys Gly Met Lys Asn Val Phe Asp Asp		
	115	120 125
Val Val Pro Glu Lys Tyr Thr Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Pro Glu Glu		
	130	135 140
Arg Glu His Gly Ser Asp Glu Trp Val Ala Met Thr Lys Gly Glu Gly		
145	150	155 160
Gly Val Trp Thr Phe Asp Ser Glu Glu Pro Leu Gln Gly Pro Phe Asn		
	165	170 175
Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro		
	180	185 190
Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu		
	195	200 205
Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro		
	210	215 220
Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu Arg		
225	230	235 240
Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala Asp		
	245	250 255
Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly Tyr Thr		
	260	265 270
Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Lys Ala		
	275	280 285
Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys		
	290	295 300
Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro Ala Asp Lys Tyr Arg		
305	310	315 320

ES 2 463 828 T3

Thr Phe Val Ala Thr Phe Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val
 325 330 335
 Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu Lys
 340 345 350
 Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys Pro Ala
 355 360 365
 Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly Ala Ala Thr Gly
 370 375 380
 Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val Ala Glu Glu Val Lys
 385 390 395 400
 Val Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala
 405 410 415
 Phe Lys Val Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys
 420 425 430
 Phe Thr Val Phe Glu Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr
 435 440 445
 Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ser
 450 455 460
 Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro Glu
 465 470 475 480
 Ala Cys Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn Glu
 485 490 495
 Glu Pro Ile Ala Pro Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly His Ala Phe Gly
 500 505 510
 Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Thr Gly Pro Phe
 515 520 525
 Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Thr Glu Ala Glu Asp
 530 535 540
 Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ser Tyr Glu Ser Lys Ile
 545 550 555 560
 Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp Lys
 565 570 575

ES 2 463 828 T3

Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Gly Ala Gly
 580 585 590
 Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys Pro
 595 600 605
 Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys Ser
 610 615 620
 Ala Gly Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro
 625 630 635 640
 Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn
 645 650 655
 Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly Asp Val Val
 660 665 670
 Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Glu Leu Lys
 675 680 685
 Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu
 690 695 700

<210> 35

<211> 527

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción O sin Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

10

<400> 35

ES 2 463 828 T3

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

ES 2 463 828 T3

Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Lys Ala
 100 105 110
 Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys
 115 120 125
 Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro Ala Asp Lys Tyr Arg
 130 135 140
 Thr Phe Val Ala Thr Phe Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu
 145 150 155 160
 Ile Lys Cys Thr Lys Pro Glu Ala Cys Ser Gly Glu Pro Val Val Val
 165 170 175
 His Ile Thr Asp Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Pro Tyr His Phe Asp
 180 185 190
 Leu Ser Gly His Ala Phe Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln
 195 200 205
 Lys Leu Arg Thr Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly
 210 215 220
 Thr Lys Thr Glu Ala Glu Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp
 225 230 235 240
 Thr Ser Tyr Glu Ser Lys Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
 245 250 255
 Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
 260 265 270
 Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala
 275 280 285
 Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala
 290 295 300
 Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys
 305 310 315 320
 Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly Ala Ala
 325 330 335
 Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val Asn Asp Lys
 340 345 350

Phe Thr Val Phe Glu Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr
355 360 365

Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ser
370 375 380

Ala Gly Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro
385 390 395 400

Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn
405 410 415

Tyr Leu Ala Leu Leu Val Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile
420 425 430

Thr Ala Thr Tyr Gly Asp Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr
435 440 445

Gly Lys Pro Thr Gly Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly
450 455 460

Tyr Lys Asp Val Asp Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly
465 470 475 480

Asn Thr Pro Ile Phe Lys Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly Asp Val Val
485 490 495

Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Glu Leu Lys
500 505 510

Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu
515 520 525

<210> 36

<211> 527

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción P sin Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

10

<400> 36

Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro
1 5 10 15

Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu
20 25 30

Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro
35 40 45

Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu Arg
50 55 60

Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala Asp
65 70 75 80

Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly Tyr Thr
85 90 95

Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Lys Ala
100 105 110

Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys
115 120 125

Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro Ala Asp Lys Tyr Arg
130 135 140

Thr Phe Val Ala Thr Phe Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu
145 150 155 160

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

His Ile Thr Asp Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Pro Tyr His Phe Asp
180 185 190

Leu Ser Gly His Ala Phe Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205

Lys Leu Arg Thr Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly
210 215 220

Thr Lys Thr Glu Ala Glu Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp
225 230 235 240

Thr Ser Tyr Glu Ser Lys Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
245 250 255

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
260 265 270

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala
275 280 285

Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala
290 295 300

Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys
 305 310 315 320
 Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly Ala Ala
 325 330 335
 Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val Asn Asp Lys
 340 345 350
 Phe Thr Val Phe Glu Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr
 355 360 365
 Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ile
 370 375 380
 Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp Lys
 385 390 395 400
 Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Gly Ala Ser
 405 410 415
 Ala Gly Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro
 420 425 430
 Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn
 435 440 445
 Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly Asp Val Val
 450 455 460
 Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Glu Leu Lys
 465 470 475 480
 Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu Gly
 485 490 495
 Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys Pro
 500 505 510
 Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
 515 520 525

<210> 37

<211> 176

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción Q sin Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

10

<400> 37

```

Phe Arg Phe Leu Thr Glu Lys Gly Met Lys Asn Val Phe Asp Asp Val
1          5          10          15

Val Pro Glu Lys Tyr Thr Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Pro Glu Glu Asp
          20          25          30

Glu Trp Val Ala Met Thr Lys Gly Glu Gly Gly Val Trp Thr Phe Asp
          35          40          45

Ser Glu Glu Pro Leu Gln Gly Pro Phe Asn Ala Asp Lys Tyr Lys Thr
          50          55          60

Phe Glu Ala Ala Phe Thr Val Ser Ser Lys Arg Asn Leu Ala Asp Ala
65          70          75          80

Val Ser Lys Ala Pro Gln Leu Val Pro Lys Leu Asp Glu Val Tyr Asn
          85          90          95

Ala Ala Tyr Asn Ala Ala Asp His Ala Ala Pro Glu Asp Lys Tyr Glu
          100          105          110

Ala Phe Val Leu His Phe Ser Glu Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr
          115          120          125

Pro Glu Val His Ala Val Lys Pro Gly Ala Val Pro Lys Val Thr Phe
          130          135          140

Thr Val Glu Lys Gly Ser Asn Glu Lys His Leu Ala Val Leu Val Lys
145          150          155          160

Tyr Glu Gly Asp Thr Met Ala Glu Val Glu Leu Arg Glu His Gly Ser
          165          170          175

```

5

<210> 38

<211> 253

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> construcción A con Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

<400> 38

ES 2 463 828 T3

```

Met Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys
1          5          10          15

Pro Glu Ala Cys Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp
          20          25          30

Asn Glu Glu Pro Ile Ala Pro Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly His Ala
          35          40          45

Phe Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Thr Gly
50          55          60

Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Thr Glu Ala
65          70          75          80

Glu Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ser Tyr Glu Ser
          85          90          95

Lys Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu
          100          105          110

Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys
          115          120          125

Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr
          130          135          140

Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu
145          150          155          160

Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala
          165          170          175

Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly Tyr
          180          185          190

Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Lys
          195          200          205

Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe
210          215          220

Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro Ala Asp Lys Tyr
225          230          235          240

Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe His His His His His His
          245          250

```

<210> 39

5

<211> 288

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción B con Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

5

<400> 39

Met Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu
1 5 10 15

Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala
20 25 30

Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala
35 40 45

Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala
50 55 60

Thr Gly Gly Tyr Lys Val Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
65 70 75 80

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
85 90 95

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu
100 105 110

Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
115 120 125

Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ile Pro Lys Val Pro Pro
130 135 140

Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp Lys Trp Leu Asp Ala Lys
145 150 155 160

Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Gly Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly
165 170 175

Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met
180 185 190

Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys Ser Ala Gly Glu Leu Glu
195 200 205

Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro Glu Gly Thr Lys Val
210 215 220

Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu
225 230 235 240

Val Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val Asp Ile Lys
245 250 255

Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Glu Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala
260 265 270

Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu His His His His His His
275 280 285

<210> 40

<211> 253

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> construcción C con Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

<400> 40

```

Met Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu
 1           5           10           15

Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys
      20           25           30

Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr
      35           40           45

Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu
      50           55           60

Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala
65           70           75           80

Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly Tyr
      85           90           95

Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Lys
      100          105          110

Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe
      115          120          125

Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro Ala Asp Lys Tyr
      130          135          140

Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe
145          150          155          160

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

Val His Ile Thr Asp Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Pro Tyr His Phe
      180          185          190

```

ES 2 463 828 T3

Asp Leu Ser Gly His Ala Phe Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu
195 200 205

Gln Lys Leu Arg Thr Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly
210 215 220

Gly Thr Lys Thr Glu Ala Glu Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala
225 230 235 240

Asp Thr Ser Tyr Glu Ser Lys His His His His His His
245 250

<210> 41

<211> 288

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción D con Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

10

<400> 41

ES 2 463 828 T3

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

Asp Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Gly
20 25 30

Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp
35 40 45

Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe
50 55 60

Lys Ser Ala Gly Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys
65 70 75 80

Tyr Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn
85 90 95

Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly Asp
100 105 110

Val Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Glu
115 120 125

Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys
130 135 140

Leu Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu
145 150 155 160

Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala
165 170 175

Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala
180 185 190

Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala
195 200 205

Thr Gly Gly Tyr Lys Val Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
210 215 220

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
225 230 235 240

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu
245 250 255

Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
260 265 270

Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala His His His His His His
275 280 285

<210> 42

<211> 301

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> construcción E con Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

<400> 42

10

```

Met Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu
 1          5          10          15

Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys
      20          25          30

Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr
      35          40          45

Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu
      50          55          60

Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala
65          70          75          80

Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly Tyr
      85          90          95

```

Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Lys
100 105 110

Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe
115 120 125

Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro Ala Asp Lys Tyr
130 135 140

Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn
145 150 155 160

Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp
165 170 175

Tyr Gly Lys Pro Thr Gly Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys
180 185 190

Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys
195 200 205

Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys Ser Ala Gly Glu Leu Glu Leu Gln Phe
210 215 220

Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His
225 230 235 240

Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Tyr
245 250 255

Val Asn Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly
260 265 270

Lys Asp Lys Trp Ile Glu Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg
275 280 285

Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu His His His His His His
290 295 300

<210> 43

<211> 301

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción F con Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

10

<400> 43

Met Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly

1 5 10 15

Asp Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Gly
20 25 30

Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp
35 40 45

Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe
50 55 60

Lys Ser Ala Gly Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys
65 70 75 80

Tyr Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn
85 90 95

Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly Asp
100 105 110

Val Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Glu
115 120 125

Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys
130 135 140

Leu Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu
145 150 155 160

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

Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr
180 185 190

Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu
195 200 205

Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala
210 215 220

Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly Tyr
225 230 235 240

Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Lys
245 250 255

Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe
260 265 270

Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro Ala Asp Lys Tyr
275 280 285

Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe His His His His His His
290 295 300

<210> 44

<211> 240

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> construcción G con Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

<400> 44

10

```

Met Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys
 1           5           10           15

Pro Glu Ala Cys Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp
 20           25           30

Asn Glu Glu Pro Ile Ala Pro Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly His Ala
 35           40           45

Phe Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Thr Gly
 50           55           60

Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Thr Glu Ala
 65           70           75           80

Glu Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ser Tyr Glu Ser
 85           90           95

Lys Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu
100           105           110

Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala
115           120           125

Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys Pro Ala Ala Ala Thr Ala
130           135           140

Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala
145           150           155           160

Thr Gly Gly Tyr Lys Val Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
165           170           175

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala

```

ES 2 463 828 T3

180

185

190

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu
195 200 205

Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
210 215 220

Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala His His His His His His
225 230 235 240

<210> 45

<211> 240

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción H con Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

10

<400> 45

ES 2 463 828 T3

```

Met Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu
1          5          10          15

Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala
          20          25          30

Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala
          35          40          45

Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala
          50          55          60

Thr Gly Gly Tyr Lys Val Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
65          70          75          80

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
          85          90          95

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu
          100          105          110

Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
          115          120          125

Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ser Gly Arg Gly Cys Gly
          130          135          140

Ser Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro Glu Ala Cys Ser Gly Glu
145          150          155          160

Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Pro
          165          170          175

Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly His Ala Phe Gly Ala Met Ala Lys Lys
          180          185          190

Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Thr Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr
          195          200          205

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

Trp Lys Ala Asp Thr Ser Tyr Glu Ser Lys His His His His His His
225          230          235          240

```

<210> 46

5

<211> 183

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción I con Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

<400> 46

```

Met Ala Asp Lys Tyr Lys Thr Phe Glu Ala Ala Phe Thr Val Ser Ser
1          5          10          15

Lys Arg Asn Leu Ala Asp Ala Val Ser Lys Ala Pro Gln Leu Val Pro
          20          25          30

Lys Leu Asp Glu Val Tyr Asn Ala Ala Tyr Asn Ala Ala Asp His Ala
          35          40          45

Ala Pro Glu Asp Lys Tyr Glu Ala Phe Val Leu His Phe Ser Glu Ala
          50          55          60

Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Pro Glu Val His Ala Val Lys Pro Gly
65          70          75          80

Ala Gly Val Trp Thr Phe Asp Ser Glu Glu Pro Leu Gln Gly Pro Phe
          85          90          95

Asn Phe Arg Phe Leu Thr Glu Lys Gly Met Lys Asn Val Phe Asp Asp
          100          105          110

Val Val Pro Glu Lys Tyr Thr Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Pro Glu Glu
          115          120          125

Val Pro Lys Val Thr Phe Thr Val Glu Lys Gly Ser Asn Glu Lys His
          130          135          140

Leu Ala Val Leu Val Lys Tyr Glu Gly Asp Thr Met Ala Glu Val Glu
145          150          155          160

Leu Arg Glu His Gly Ser Asp Glu Trp Val Ala Met Thr Lys Gly Glu
          165          170          175

Gly His His His His His His
          180

```

<210> 47

<211> 183

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción J con Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

<400> 47

```

Met Gly Val Trp Thr Phe Asp Ser Glu Glu Pro Leu Gln Gly Pro Phe
1           5           10           15

Asn Phe Arg Phe Leu Thr Glu Lys Gly Met Lys Asn Val Phe Asp Asp
          20           25           30

Val Val Pro Glu Lys Tyr Thr Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Pro Glu Glu
          35           40           45

Val Pro Lys Val Thr Phe Thr Val Glu Lys Gly Ser Asn Glu Lys His
50           55           60

Leu Ala Val Leu Val Lys Tyr Glu Gly Asp Thr Met Ala Glu Val Glu
65           70           75           80

Leu Arg Glu His Gly Ser Asp Glu Trp Val Ala Met Thr Lys Gly Glu
          85           90           95

Gly Ala Asp Lys Tyr Lys Thr Phe Glu Ala Ala Phe Thr Val Ser Ser
          100          105          110

Lys Arg Asn Leu Ala Asp Ala Val Ser Lys Ala Pro Gln Leu Val Pro
          115          120          125

Lys Leu Asp Glu Val Tyr Asn Ala Ala Tyr Asn Ala Ala Asp His Ala
          130          135          140

Ala Pro Glu Asp Lys Tyr Glu Ala Phe Val Leu His Phe Ser Glu Ala
          145          150          155          160

Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Pro Glu Val His Ala Val Lys Pro Gly
          165          170          175

Ala His His His His His His
          180

```

5

<210> 48

<211> 183

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> construcción K con Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

<400> 48

15

ES 2 463 828 T3

```

Met Gly Val Trp Thr Phe Asp Ser Glu Glu Pro Leu Gln Gly Pro Phe
1          5          10          15

Asn Phe Arg Phe Leu Thr Glu Lys Gly Met Lys Asn Val Phe Asp Asp
          20          25          30

Val Val Pro Glu Lys Tyr Thr Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Pro Glu Glu
          35          40          45

Ala Asp Lys Tyr Lys Thr Phe Glu Ala Ala Phe Thr Val Ser Ser Lys
          50          55          60

Arg Asn Leu Ala Asp Ala Val Ser Lys Ala Pro Gln Leu Val Pro Lys
65          70          75          80

Leu Asp Glu Val Tyr Asn Ala Ala Tyr Asn Ala Ala Asp His Ala Ala
          85          90          95

Pro Glu Asp Lys Tyr Glu Ala Phe Val Leu His Phe Ser Glu Ala Leu
          100          105          110

Arg Ile Ile Ala Gly Thr Pro Glu Val His Ala Val Lys Pro Gly Ala
          115          120          125

Val Pro Lys Val Thr Phe Thr Val Glu Lys Gly Ser Asn Glu Lys His
          130          135          140

Leu Ala Val Leu Val Lys Tyr Glu Gly Asp Thr Met Ala Glu Val Glu
145          150          155          160

Leu Arg Glu His Gly Ser Asp Glu Trp Val Ala Met Thr Lys Gly Glu
          165          170          175

Gly His His His His His His
          180

```

<210> 49

<211> 183

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción L con Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

10

<400> 49

Met Val Pro Lys Val Thr Phe Thr Val Glu Lys Gly Ser Asn Glu Lys
1 5 10 15

His Leu Ala Val Leu Val Lys Tyr Glu Gly Asp Thr Met Ala Glu Val
20 25 30

Glu Leu Arg Glu His Gly Ser Asp Glu Trp Val Ala Met Thr Lys Gly
35 40 45

Glu Gly Ala Asp Lys Tyr Lys Thr Phe Glu Ala Ala Phe Thr Val Ser
50 55 60

Ser Lys Arg Asn Leu Ala Asp Ala Val Ser Lys Ala Pro Gln Leu Val
65 70 75 80

Pro Lys Leu Asp Glu Val Tyr Asn Ala Ala Tyr Asn Ala Ala Asp His
85 90 95

Ala Ala Pro Glu Asp Lys Tyr Glu Ala Phe Val Leu His Phe Ser Glu
100 105 110

Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Pro Glu Val His Ala Val Lys Pro
115 120 125

Gly Ala Gly Val Trp Thr Phe Asp Ser Glu Glu Pro Leu Gln Gly Pro
130 135 140

Phe Asn Phe Arg Phe Leu Thr Glu Lys Gly Met Lys Asn Val Phe Asp
145 150 155 160

Asp Val Val Pro Glu Lys Tyr Thr Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Pro Glu
165 170 175

Glu His His His His His His
180

<210> 50

<211> 710

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción M con Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

10

<400> 50

ES 2 463 828 T3

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

ES 2 463 828 T3

Glu Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ser Tyr Glu Ser
 260 265 270
 Lys Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu
 275 280 285
 Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys
 290 295 300
 Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr
 305 310 315 320
 Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu
 325 330 335
 Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala
 340 345 350
 Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly Tyr
 355 360 365
 Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Lys
 370 375 380
 Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe
 385 390 395 400
 Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro Ala Asp Lys Tyr
 405 410 415
 Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr
 420 425 430
 Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu
 435 440 445
 Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys Pro
 450 455 460
 Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly Ala Ala Thr
 465 470 475 480
 Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val Ala Glu Glu Val
 485 490 495
 Lys Val Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala
 500 505 510

Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp
515 520 525

Lys Phe Thr Val Phe Glu Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser
530 535 540

Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala
545 550 555 560

Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp
565 570 575

Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Gly Ala
580 585 590

Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
595 600 605

Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
610 615 620

Ser Ala Gly Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr
625 630 635 640

Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro
645 650 655

Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly Asp Val
660 665 670

Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Glu Leu
675 680 685

Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu
690 695 700

His His His His His His
705 710

<210> 51

<211> 710

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción N con Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

10

<400> 51

Met Ala Asp Lys Tyr Lys Thr Phe Glu Ala Ala Phe Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

Lys Arg Asn Leu Ala Asp Ala Val Ser Lys Ala Pro Gln Leu Val Pro
20 25 30

Lys Leu Asp Glu Val Tyr Asn Ala Ala Tyr Asn Ala Ala Asp His Ala
35 40 45

Ala Pro Glu Asp Lys Tyr Glu Ala Phe Val Leu His Phe Ser Glu Ala
50 55 60

Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Pro Glu Val His Ala Val Lys Pro Gly
65 70 75 80

Ala Val Pro Lys Val Thr Phe Thr Val Glu Lys Gly Ser Asn Glu Lys
85 90 95

His Leu Ala Val Leu Val Lys Tyr Glu Gly Asp Thr Met Ala Glu Val
100 105 110

Glu Leu Phe Arg Phe Leu Thr Glu Lys Gly Met Lys Asn Val Phe Asp
115 120 125

Asp Val Val Pro Glu Lys Tyr Thr Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Pro Glu
130 135 140

Glu Arg Glu His Gly Ser Asp Glu Trp Val Ala Met Thr Lys Gly Glu
145 150 155 160

Gly Gly Val Trp Thr Phe Asp Ser Glu Glu Pro Leu Gln Gly Pro Phe
165 170 175

Asn Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu
180 185 190

Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys
195 200 205

Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr
210 215 220

Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu
225 230 235 240

Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala
245 250 255

Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly Tyr
260 265 270

ES 2 463 828 T3

Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Lys
 275 280 285
 Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe
 290 295 300
 Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro Ala Asp Lys Tyr
 305 310 315 320
 Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr
 325 330 335
 Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu
 340 345 350
 Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys Pro
 355 360 365
 Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly Ala Ala Thr
 370 375 380
 Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val Ala Glu Glu Val
 385 390 395 400
 Lys Val Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala
 405 410 415
 Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp
 420 425 430
 Lys Phe Thr Val Phe Glu Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser
 435 440 445
 Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala
 450 455 460
 Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro
 465 470 475 480
 Glu Ala Cys Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn
 485 490 495
 Glu Glu Pro Ile Ala Pro Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly His Ala Phe
 500 505 510
 Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Thr Gly Pro
 515 520 525
 Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Thr Glu Ala Glu

ES 2 463 828 T3

530		535		540
Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ser Tyr Glu Ser Lys				
545		550		555
				560
Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp				
		565		570
				575
Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Gly Ala				
		580		585
				590
Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys				
		595		600
				605
Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys				
		610		615
				620
Ser Ala Gly Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr				
		625		630
				635
Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro				
		645		650
				655
Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly Asp Val				
		660		665
				670
Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Glu Leu				
		675		680
				685
Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu				
		690		695
				700
His His His His His His				
705		710		

<210> 52

<211> 534

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción O con Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

10

<400> 52

Met Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu
 1 5 10 15
 Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys
 20 25 30
 Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr
 35 40 45
 Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu
 50 55 60
 Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala
 65 70 75 80
 Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly Tyr
 85 90 95
 Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Lys
 100 105 110
 Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe
 115 120 125
 Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro Ala Asp Lys Tyr
 130 135 140
 Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe
 145 150 155 160
 Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro Glu Ala Cys Ser Gly Glu Pro Val Val
 165 170 175
 Val His Ile Thr Asp Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Pro Tyr His Phe
 180 185 190
 Asp Leu Ser Gly His Ala Phe Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu
 195 200 205
 Gln Lys Leu Arg Thr Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly
 210 215 220
 Gly Thr Lys Thr Glu Ala Glu Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala
 225 230 235 240
 Asp Thr Ser Tyr Glu Ser Lys Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala
 245 250 255
 Gly Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala
 260 265 270
 Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala
 275 280 285
 Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr

ES 2 463 828 T3

290	295	300
Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala 305 310 315 320		
Lys Pro Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Val Gly Ala 325 330 335		
Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val Asn Asp 340 345 350		
Lys Phe Thr Val Phe Glu Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser 355 360 365		
Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala 370 375 380		
Ser Ala Gly Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr 385 390 395 400		
Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro 405 410 415		
Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn 420 425 430		
Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp 435 440 445		
Tyr Gly Lys Pro Thr Gly Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys 450 455 460		
Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys 465 470 475 480		
Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly Asp Val 485 490 495		
Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Glu Leu 500 505 510		
Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu 515 520 525		
His His His His His His 530		

<210> 53

<211> 534

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción P con Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

<400> 53

```

Met Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu
 1           5           10           15

Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys
 20           25           30

Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr
 35           40           45

Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu
 50           55           60

Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala
 65           70           75           80

Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly Tyr
 85           90           95

Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Lys
100           105           110

Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe
115           120           125

Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro Ala Asp Lys Tyr
130           135           140

Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe
145           150           155           160

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

Val His Ile Thr Asp Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Pro Tyr His Phe
180           185           190

Asp Leu Ser Gly His Ala Phe Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu
195           200           205

Gln Lys Leu Arg Thr Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly
210           215           220

Gly Thr Lys Thr Glu Ala Glu Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala

```

ES 2 463 828 T3

225		230		235		240
Asp Thr Ser Tyr	Glu Ser Lys Ala	Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala				
	245		250			255
Gly Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala						
	260		265			270
Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala						
	275		280			285
Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr						
	290		295			300
Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala						
	305		310		315	320
Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly Ala						
	325			330		335
Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val Asn Asp						
	340		345			350
Lys Phe Thr Val Phe Glu Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser						
	355		360			365
Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala						
	370		375			380
Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp						
	385		390		395	400
Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Gly Ala						
	405			410		415
Ser Ala Gly Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr						
	420		425			430
Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro						
	435		440			445
Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly Asp Val						
	450		455			460
Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Glu Leu						
	465		470		475	480
Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu						
	485			490		495
Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys						
	500			505		510
Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys						
	515			520		525
His His His His His His						
	530					

<210> 54

<211> 183

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> construcción Q con Met del extremo N y hexahistidina del extremo C

<400> 54

10

```

Met Phe Arg Phe Leu Thr Glu Lys Gly Met Lys Asn Val Phe Asp Asp
 1           5           10           15

Val Val Pro Glu Lys Tyr Thr Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Pro Glu Glu
 20           25           30

Asp Glu Trp Val Ala Met Thr Lys Gly Glu Gly Gly Val Trp Thr Phe
 35           40           45

Asp Ser Glu Glu Pro Leu Gln Gly Pro Phe Asn Ala Asp Lys Tyr Lys
 50           55           60

Thr Phe Glu Ala Ala Phe Thr Val Ser Ser Lys Arg Asn Leu Ala Asp
 65           70           75           80

Ala Val Ser Lys Ala Pro Gln Leu Val Pro Lys Leu Asp Glu Val Tyr
 85           90           95

Asn Ala Ala Tyr Asn Ala Ala Asp His Ala Ala Pro Glu Asp Lys Tyr
 100          105          110

Glu Ala Phe Val Leu His Phe Ser Glu Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly
 115          120          125

Thr Pro Glu Val His Ala Val Lys Pro Gly Ala Val Pro Lys Val Thr
 130          135          140

Phe Thr Val Glu Lys Gly Ser Asn Glu Lys His Leu Ala Val Leu Val
 145          150          155          160

Lys Tyr Glu Gly Asp Thr Met Ala Glu Val Glu Leu Arg Glu His Gly
          165          170          175

Ser His His His His His His
          180

```

<210> 55

<211> 64

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> fragmento P1a

<400> 55

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

Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Gly Ala
20 25 30

Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
35 40 45

Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
50 55 60

10

<210> 56

<211> 61

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento P1b

20

<400> 56

Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro
1 5 10 15

Glu Ala Cys Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn
20 25 30

Glu Glu Pro Ile Ala Pro Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly His Ala Phe
35 40 45

Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg
50 55 60

<210> 57

<211> 80

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> fragmento P1c

<400> 57

10

Ser Ala Gly Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr
1 5 10 15

Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro
20 25 30

Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly Asp Val
35 40 45

Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Glu Leu
50 55 60

Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu
65 70 75 80

<210> 58

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> fragmento P1d

20

<400> 58

Thr Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Thr
1 5 10 15

Glu Ala Glu Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ser Tyr
20 25 30

Glu Ser Lys
35

<210> 59

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> fragmento P1a1

<400> 59

10

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

Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Gly Ala
20 25 30

<210> 60

<211> 32

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento P1a2

20

<400> 60

Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
1 5 10 15

Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
20 25 30

25

<210> 61

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> fragmento P1c1

<400> 61

Ser Ala Gly Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr
1 5 10 15

Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro
20 25 30

Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val
35

5 <210> 62

<211> 41

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> fragmento P1c2

<400> 62

Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val Asp Ile Lys Glu
1 5 10 15

Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Glu Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile
20 25 30

Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu
35 40

15

<210> 63

<211> 49

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento P2A

25 <400> 63

ES 2 463 828 T3

Val Pro Lys Val Thr Phe Thr Val Glu Lys Gly Ser Asn Glu Lys His
1 5 10 15

Leu Ala Val Leu Val Lys Tyr Glu Gly Asp Thr Met Ala Glu Val Glu
20 25 30

Leu Arg Glu His Gly Ser Asp Glu Trp Val Ala Met Thr Lys Gly Glu
35 40 45

Gly

<210> 64

<211> 47

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento P2B

10

<400> 64

Gly Val Trp Thr Phe Asp Ser Glu Glu Pro Leu Gln Gly Pro Phe Asn
1 5 10 15

Phe Arg Phe Leu Thr Glu Lys Gly Met Lys Asn Val Phe Asp Asp Val
20 25 30

Val Pro Glu Lys Tyr Thr Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Pro Glu Glu
35 40 45

15 <210> 65

<211> 33

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> fragmento P2a

<400> 65

ES 2 463 828 T3

Val Pro Lys Val Thr Phe Thr Val Glu Lys Gly Ser Asn Glu Lys His
1 5 10 15

Leu Ala Val Leu Val Lys Tyr Glu Gly Asp Thr Met Ala Glu Val Glu
20 25 30

Leu

<210> 66

<211> 32

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento P2b

10

<400> 66

Arg Glu His Gly Ser Asp Glu Trp Val Ala Met Thr Lys Gly Glu Gly
1 5 10 15

Gly Val Trp Thr Phe Asp Ser Glu Glu Pro Leu Gln Gly Pro Phe Asn
20 25 30

15 <210> 67

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> fragmento P2c

<400> 67

Phe Arg Phe Leu Thr Glu Lys Gly Met Lys Asn Val Phe Asp Asp Val
1 5 10 15

Val Pro Glu Lys Tyr Thr Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Pro Glu Glu
20 25 30

25

<210> 68

<211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> fragmento P2a1

<400> 68

Val Pro Lys Val Thr Phe Thr Val Glu Lys Gly Ser Asn Glu Lys His
1 5 10 15

Leu Ala Val Leu Val Lys Tyr Glu Gly Asp Thr Met Ala Glu Val Glu
20 25 30

Leu Arg Glu His Gly Ser
35

10

<210> 69

<211> 27

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento P2b2

20

<400> 69

Asp Glu Trp Val Ala Met Thr Lys Gly Glu Gly Gly Val Trp Thr Phe
1 5 10 15

Asp Ser Glu Glu Pro Leu Gln Gly Pro Phe Asn
20 25

25

<210> 70

<211> 72

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento P5a

<400> 70

```

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1          5          10          15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly
          20          25          30

Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly
          35          40          45

Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro Ala Asp Lys
          50          55          60

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe
65          70

```

5

<210> 71

<211> 78

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento P5b

15

<400> 71

```

Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro
 1          5          10          15

Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu
          20          25          30

Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro
          35          40          45

Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu Arg
          50          55          60

Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala
65          70          75

```

<210> 72

<211> 68

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> fragmento P5c

<400> 72

10

```

Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Val Ile Glu
 1              5              10              15

Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala
 20              25              30

Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu Ala Ala Phe Asn Asp Ala
 35              40              45

Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro
 50              55              60

Ala Leu Glu Ala
 65
    
```

<210> 73

<211> 69

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> fragmento P5d

20

<400> 73

ES 2 463 828 T3

Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val
1 5 10 15

Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met
20 25 30

Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys Pro Ala Ala Ala Thr Ala Thr
35 40 45

Ala Thr Ala Ala Val Gly Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr
50 55 60

Gly Gly Tyr Lys Val
65

<210> 74

<211> 34

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento P5c1

10

<400> 74

Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Val Ile Glu
1 5 10 15

Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala
20 25 30

Pro Ala

15

<210> 75

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> fragmento P5c2

<400> 75

ES 2 463 828 T3

Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys
1 5 10 15

Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu
20 25 30

Glu Ala

<210> 76

5 <211> 80

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> fragmento P6b

<400> 76

Ala Asp Lys Tyr Lys Thr Phe Glu Ala Ala Phe Thr Val Ser Ser Lys
1 5 10 15

Arg Asn Leu Ala Asp Ala Val Ser Lys Ala Pro Gln Leu Val Pro Lys
20 25 30

Leu Asp Glu Val Tyr Asn Ala Ala Tyr Asn Ala Ala Asp His Ala Ala
35 40 45

Pro Glu Asp Lys Tyr Glu Ala Phe Val Leu His Phe Ser Glu Ala Leu
50 55 60

15 Arg Ile Ile Ala Gly Thr Pro Glu Val His Ala Val Lys Pro Gly Ala
65 70 75 80

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido hipoalergénico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 22, 23, 24, 25, 36 y 37.
2. El polipéptido hipoalergénico de la reivindicación 1, que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 39, 40, 41, 42, 53 y 54.
3. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la reivindicación 1 ó 2 y un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
4. El uso del polipéptido de la reivindicación 1 ó 2 para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de alergia.
5. El uso de la reivindicación 4, en el que dicha alergia es alergia al polen de gramíneas.
6. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la reivindicación 1 ó 2.

Figura 1

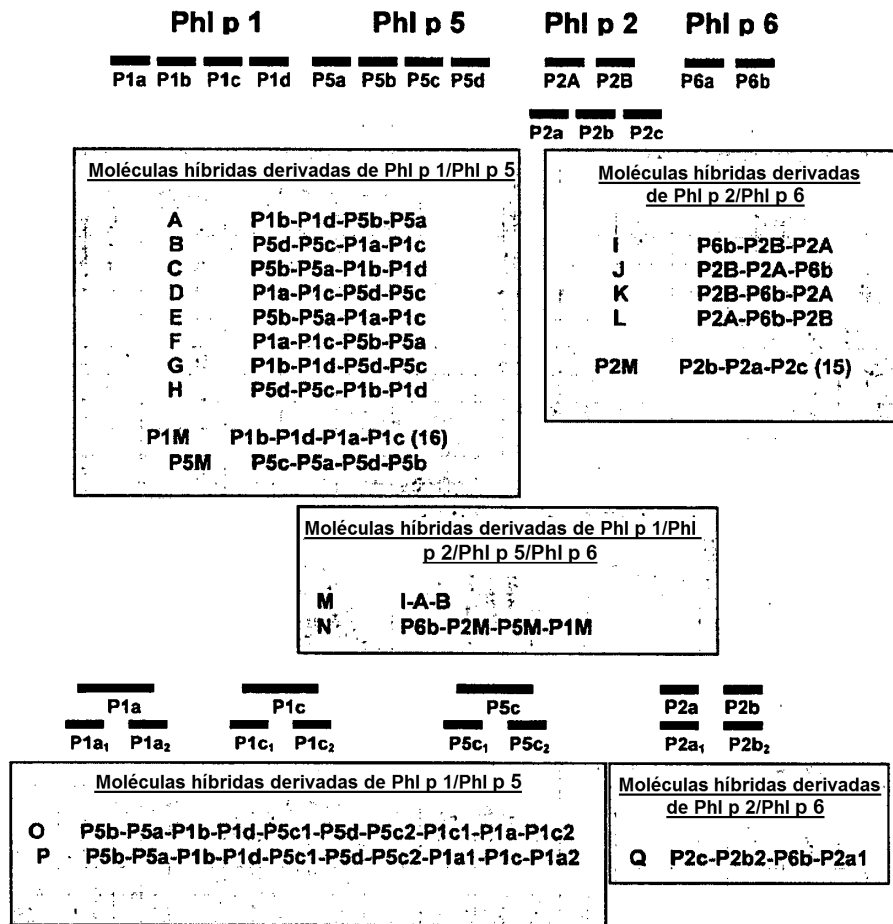


Figura 2

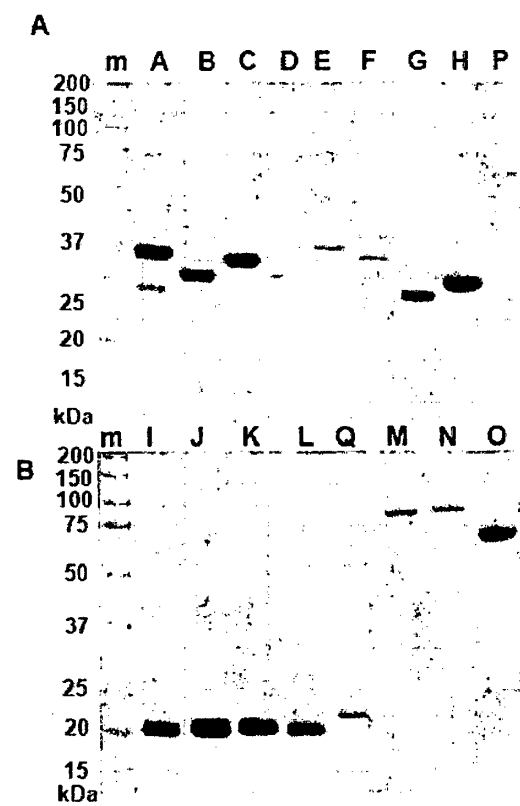


Figura 3

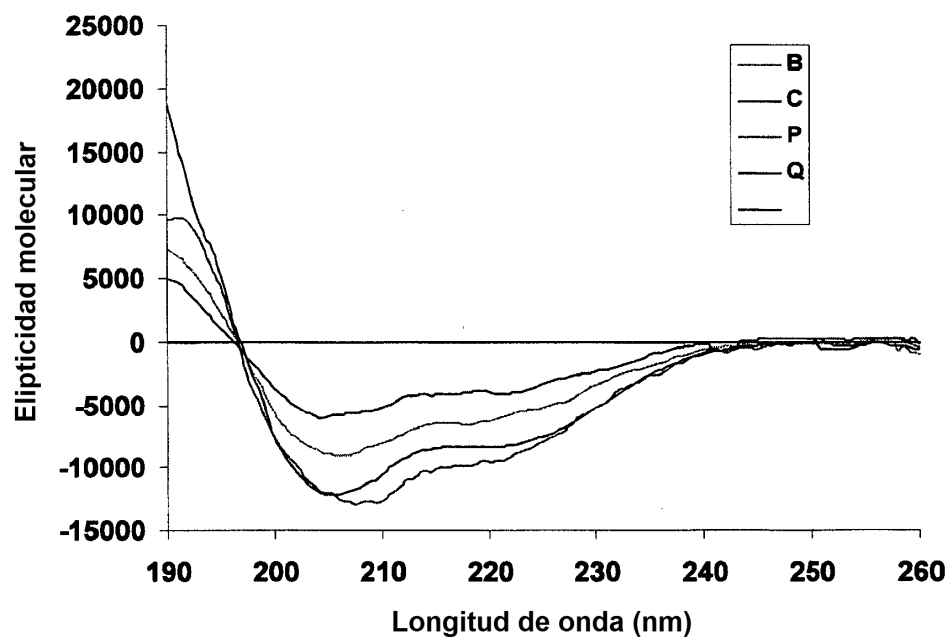


Figura 4

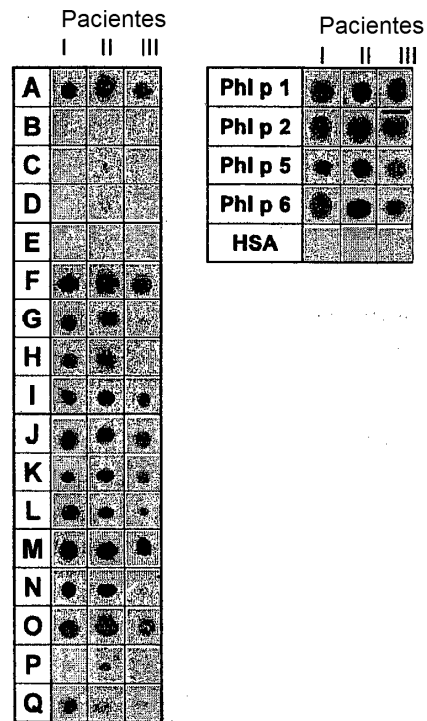


Figura 5

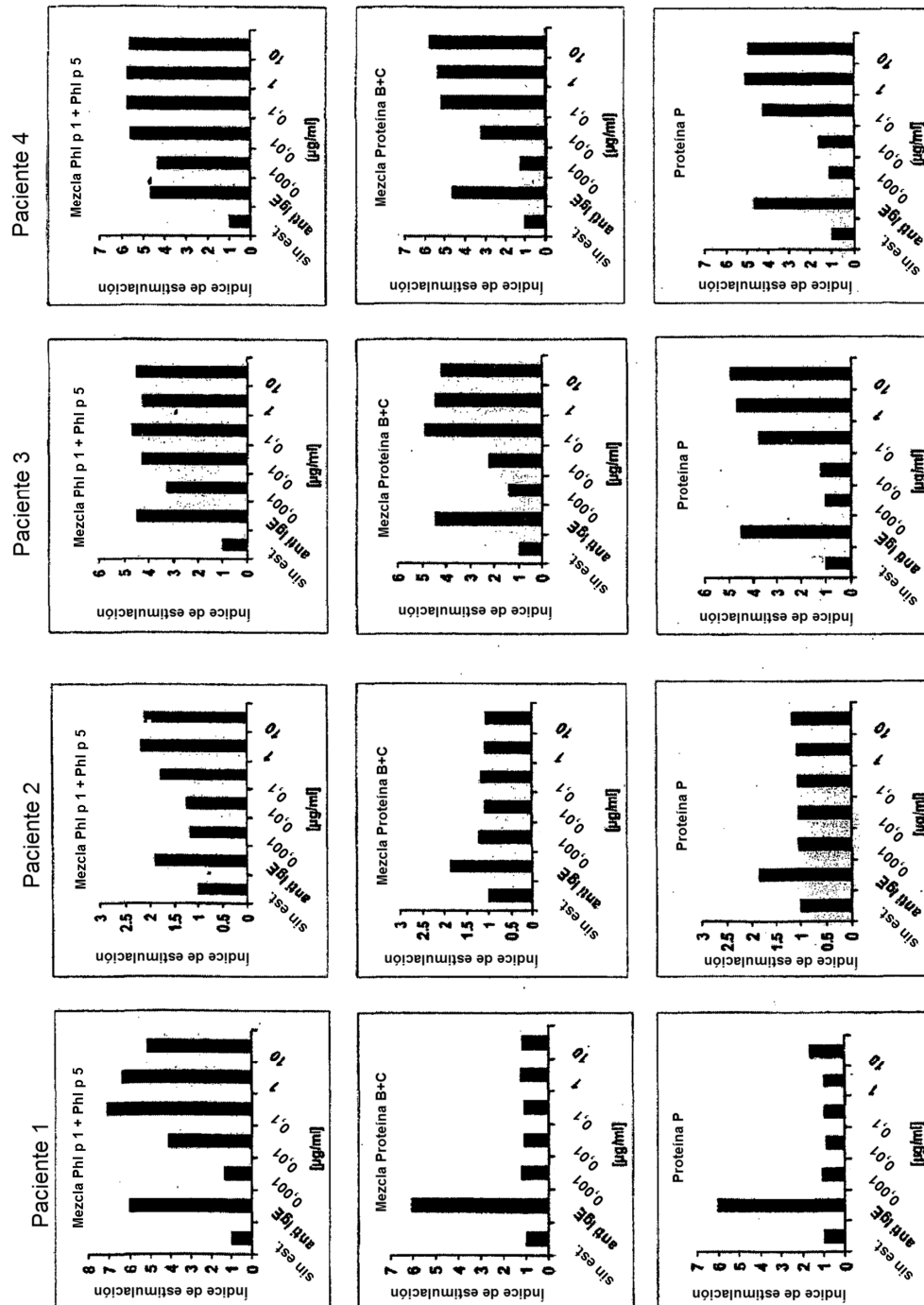


Figura 5 (continuación)

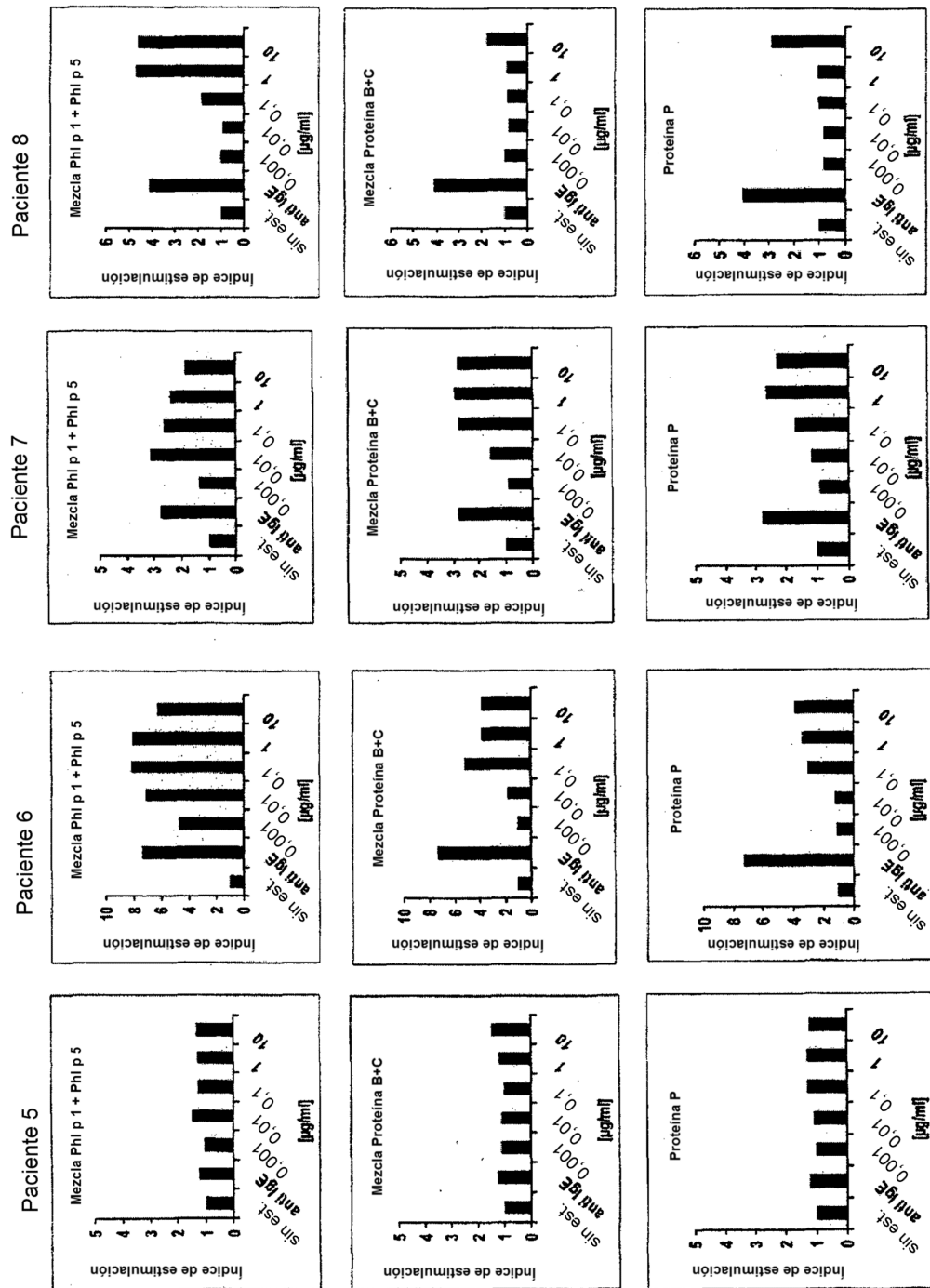
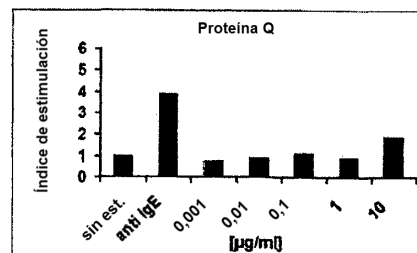
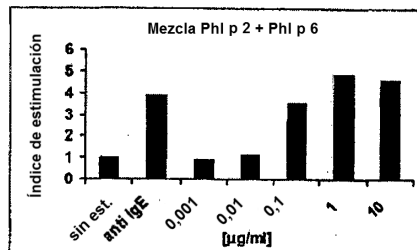
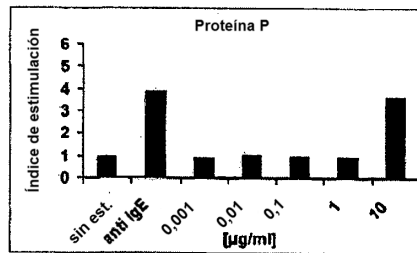
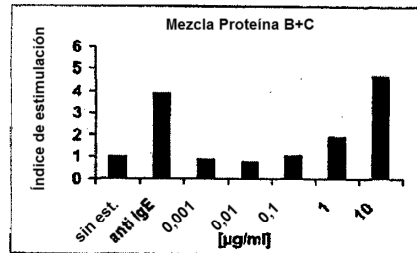
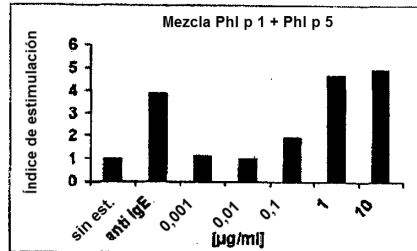


Figura 5 (continuación)

Paciente 9



Paciente 10

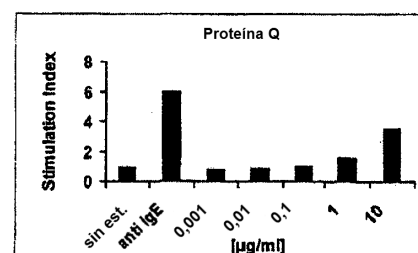
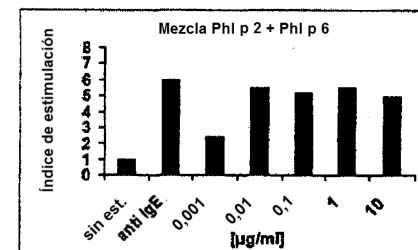
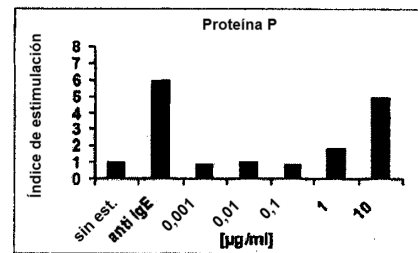
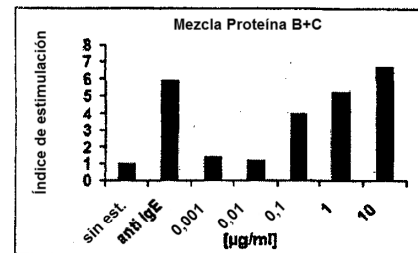
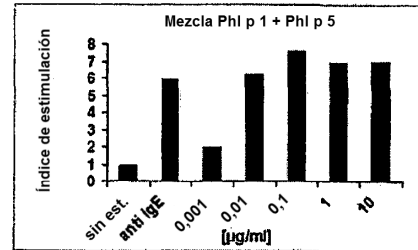
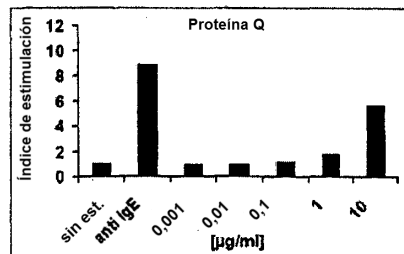
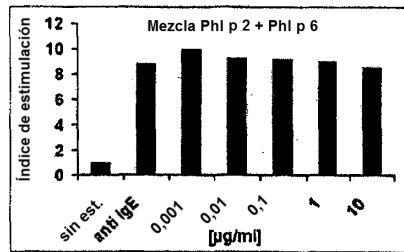
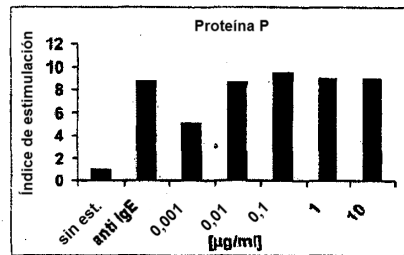
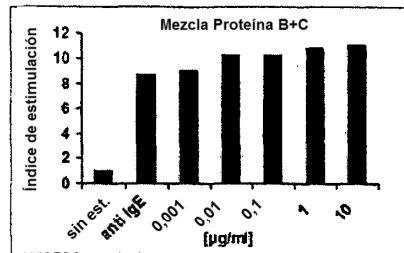
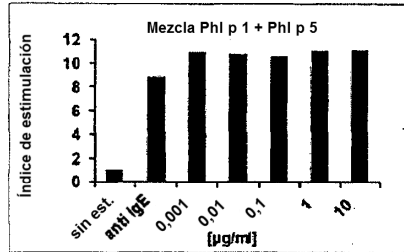


Figura 5 (continuación)

Paciente 11



Paciente 12

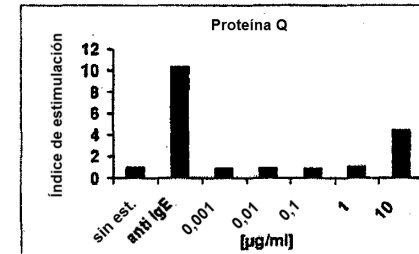
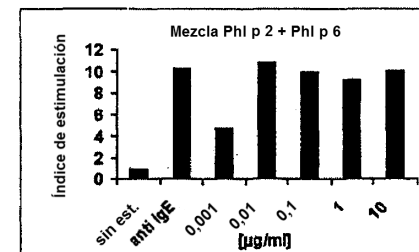
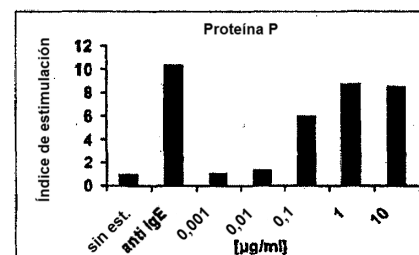
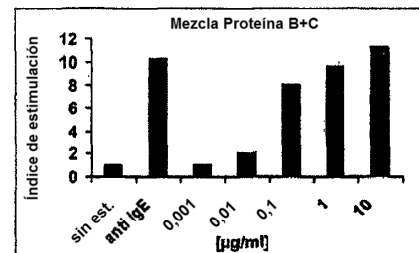
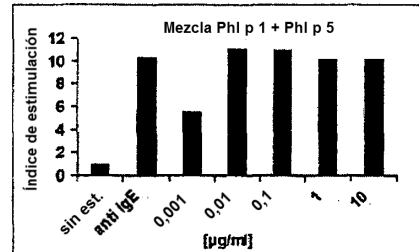


Figura 6

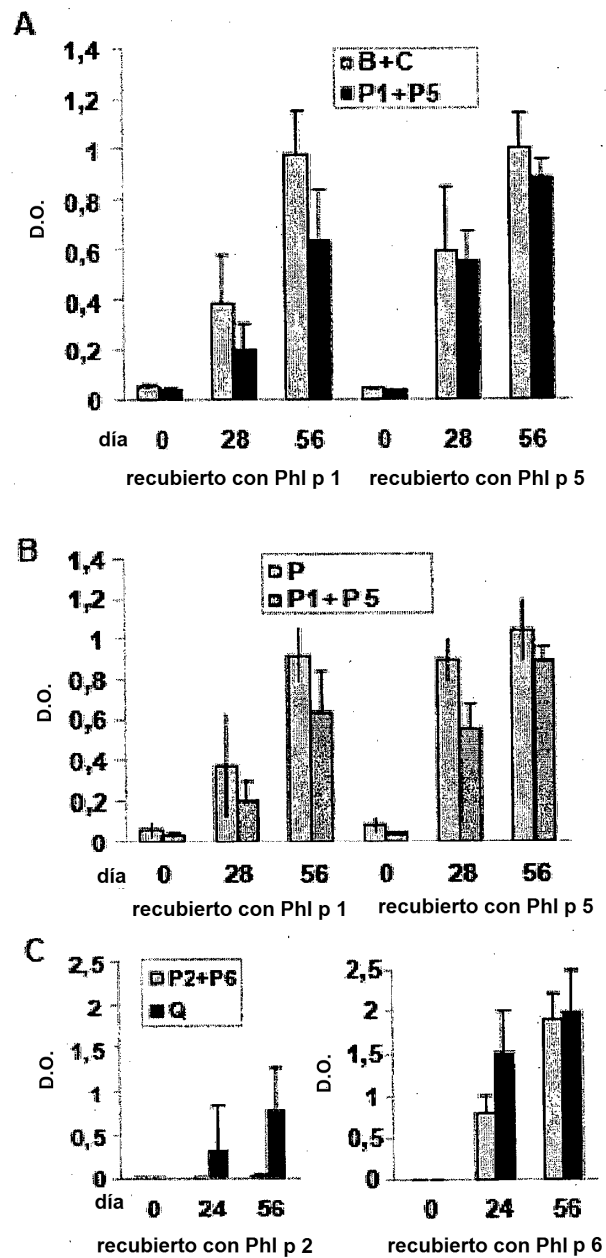


Figura 7

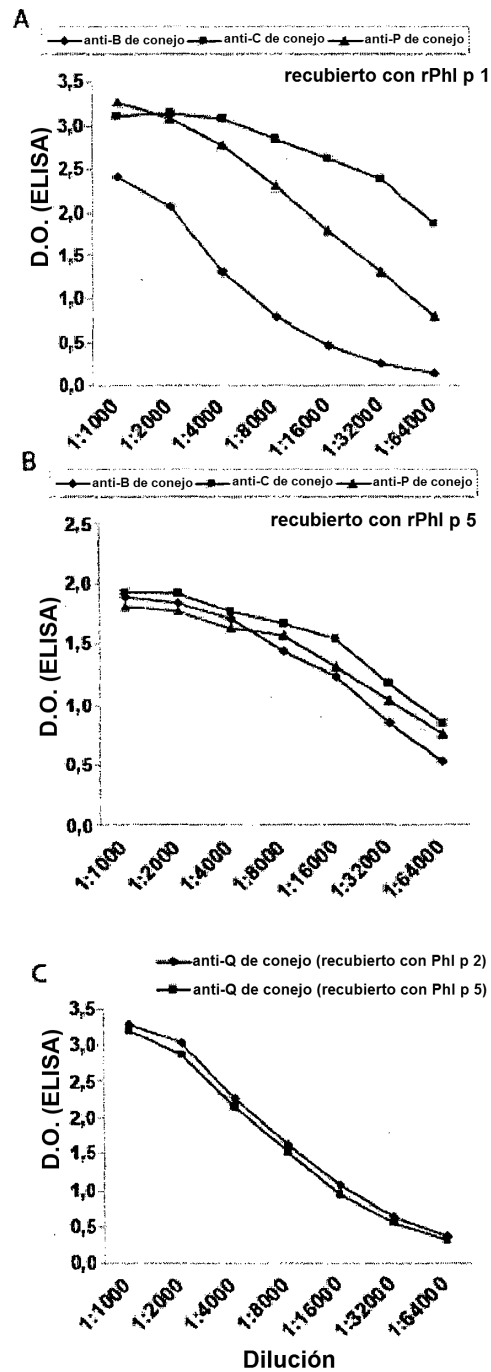


Figura 8

Valoración de antisueros anti-B, -C, -P y -HPG de conejo (específicos para PhI p 1)

