

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 930**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2010 E 10721378 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2425258**

54 Título: **Método para la identificación de especies de gramíneas**

30 Prioridad:

30.04.2009 EP 09305385

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

07.04.2016

73 Titular/es:

**STALLERGENES (100.0%)
6, rue Alexis de Tocqueville
92160 Antony , FR**

72 Inventor/es:

**MOINGEON, PHILIPPE;
BATARD, THIERRY y
NONY, EMMANUEL**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 565 930 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

Método para la identificación de especies de gramíneas

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un método para determinar si un extracto de una especie de gramínea está presente en una composición.

10 Antecedentes de la invención

[0002] Las alergias de tipo I, como la rinitis alérgica estacional (fiebre del heno), la conjuntivitis, el asma alérgica y las dermatitis alérgicas, suponen un importante problema de salud en los países industrializados (Wüthrich *et ál.* (1989) *Int Arch Allergy Appl Immunol* 90:3-10). Actualmente se estima que el 15-20 % de la población de los países desarrollados padece algún tipo de alergia.

[0003] El principal causante de la fiebre del heno y del asma alérgica estacional al aire libre es el polen de gramíneas en el aire (Smart *et ál.* (1982) *Clin Allergy* 12(1):83-9). Las fuentes más importantes de polen de gramíneas son los pastos agrícolas comunes, que están muy presentes en todo el mundo. Por ejemplo, en las regiones frías templadas, gramíneas como el raigrás perenne, el pasto azul de Kentucky o el fleo (todas pertenecientes a la subfamilia Pooideae) son clínicamente relevantes.

[0004] La tolerancia a un antígeno concreto puede definirse como la ausencia o reducción de la intensidad de una o varias respuestas inmunes, en particular las respuestas que son responsables de la acción perjudicial para el organismo, ante un antígeno específico, en el contexto de un sistema inmune por lo demás normal.

[0005] Con el fin de inducir la tolerancia al antígeno concreto, las intervenciones terapéuticas pueden implicar la inyección o administración en mucosa (por ejemplo, administración oral) del alérgeno o de una mezcla de los alérgenos considerados responsables de los trastornos alérgicos. Con respecto a la administración en mucosa, se ha explorado por ejemplo la vía sublingual para la administración del antígeno en una serie de condiciones (véase por ejemplo Bahceciler *et ál.* (2005) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 136:287-294). En el caso de la alergia a las gramíneas, se pueden fabricar comprimidos sublinguales de gramíneas utilizando uno o varios extractos hechos con pólenes obtenidos de especies de gramíneas. Ejemplos de ese tipo de comprimidos se venden actualmente con el nombre de Grazax® (extracto de polen de *Phleum pratense*), comercializado por ALK-ABELLÓ, y de Oralair® (mezcla de extractos de polen de cinco especies de gramíneas), vendido por Stallergènes.

[0006] En consecuencia, existe una necesidad, en particular por parte de organismos de control de calidad o agencias de medicamentos, de contar con métodos que permitan detectar alérgenos de gramíneas específicas en las composiciones.

[0007] El documento WO2007/031080 describe métodos de espectrometría de masas para la cuantificación de alérgenos. De forma más específica, explica la utilización de péptidos estándar de calibración de alérgenos para la cuantificación de grupos de alérgenos, también conocidos como alérgenos homólogos, tales como el grupo I de alérgenos de especies gramíneas presentes en un extracto. Sin embargo, los métodos presentados en el documento WO2007/031080 no permiten identificar alérgenos de gramíneas específicos en una composición.

[0008] Métodos conocidos en la técnica, como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, suelen requerir mucho tiempo, dependen de la disponibilidad de anticuerpos específicos y su precisión suele ser baja. Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar un método alternativo que mejore la especificidad y la precisión.

Resumen de la invención

[0009] La presente invención surge de la constatación inesperada, por parte de los inventores, de que los péptidos derivados de alérgenos del polen podrían utilizarse en la identificación de extractos de gramíneas específicas presentes en las composiciones.

[0010] Por lo tanto, la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, para determinar la presencia en una composición de extractos procedentes de al menos una especie de gramínea

seleccionada del grupo que consiste en raigrás perenne, fleo, dactilo, grama de olor y pasto azul de Kentucky.

[0011] La presente invención también se refiere a un método para determinar la presencia de extractos de una especie de gramínea en una composición, que comprende:

5

- someter una muestra de la composición a un tratamiento proteolítico;

- detectar al menos un péptido que consista en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, en dicha muestra de la composición sometida al

10 tratamiento proteolítico;

- deducir que un extracto de raigrás perenne, fleo, dactilo, grama de olor o pasto azul de Kentucky está presente en la composición, si se ha detectado en la muestra un péptido que consista, respectivamente, en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

15

[0012] La presente invención también se refiere al péptido que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

[0013] La presente invención también se refiere a un kit para detectar la presencia de extractos de una especie de gramínea en una composición que comprende al menos dos de los péptidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

20

[0014] En una forma de realización preferida, el kit conforme a la invención comprende:

25 - un péptido que consiste en SEQ ID NO: 1;

- un péptido que consiste en SEQ ID NO: 2;

- un péptido que consiste en SEQ ID NO: 3;

30

- un péptido que consiste en SEQ ID NO: 4;

- un péptido que consiste en SEQ ID NO: 5.

35 Descripción detallada de la invención

[0015] Tal como aquí se utiliza, el término «péptido» se refiere a una molécula que comprende una matriz lineal de residuos de D-aminoácidos o L-aminoácidos conectados entre sí en la matriz lineal por enlaces peptídicos. Tal como aquí se utiliza, «aminoácido» incluye en particular los 20 aminoácidos de origen natural (es decir, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) y también aminoácidos con modificaciones postraduccionales que se pueden encontrar *in vivo* como hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros aminoácidos inusuales, entre los que figuran, sin carácter exhaustivo, el ácido 2-aminoadípico, la hidroxilisina, la isodesmosina, la norvalina, la norleucina y la ornitina.

45

[0016] Los péptidos de la invención consisten en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5. La solicitud también describe el péptido que consiste en SEQ ID NO: 2.

50 **[0017]** SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 son, respectivamente, fragmentos de los alérgenos del grupo 1 Lol p 1 (raigrás perenne), p1 Phl (fleo), Dac g 1 (dactilo), Ant o 1 (grama de olor) y Poa p 1 (pasto azul de Kentucky).

[0018] Tal como se entiende en el presente documento, el término «gramínea» se utiliza para designar a todas las plantas verdes monocotiledóneas. Preferiblemente, el término «especies de gramíneas», tal como se utiliza aquí, se refiere a especies de la familia Poaceae (o familia Gramineae). Aún más preferiblemente, el término «especies de gramíneas» se refiere a especies seleccionadas del grupo que consiste en raigrás perenne (*Lolium perenne*), fleo (*Phleum pratense*), dactilo (*Dactylis glomerata*), grama de olor (*Anthoxanthum odoratum*), y pasto azul de Kentucky (*Poa pratensis*).

55

[0019] Tal como se utiliza aquí, el término «composición» se refiere a cualquier mezcla que contenga probablemente al menos un extracto de una especie de gramínea seleccionada del grupo que consiste en raigrás perenne, fleo, dactilo, grama de olor o pasto azul de Kentucky.

5

[0020] Tal como aquí se utiliza, el término «extracto» se refiere a una sustancia producida mediante la extracción de parte de una materia prima. En particular, el extracto es un extracto de polen y, más particularmente, un extracto de polen de gramínea. El extracto es preferiblemente uno que contenga proteínas alergénicas, tales como Lol p 1, Phi p1, Dac g 1, Ant o 1 y Poa p 1. Preferiblemente, el extracto se puede obtener a partir de la extracción acuosa de polen de gramínea con una solución de bicarbonato de amonio, en particular, a una concentración de 4 g/l.

10

[0021] Preferentemente, la composición de la invención es una composición farmacéutica. Tal como aquí se utiliza, la expresión «composición farmacéutica» se refiere a una composición que se supone está destinada a emplearse en el tratamiento de una enfermedad. En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica está destinada a ser utilizada en el tratamiento de la alergia y, en particular, en el tratamiento de la alergia a las gramíneas. La composición farmacéutica se puede formular para cualquier vía de administración, como vía tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraocular o sublingual. Sin embargo, se prefiere que la composición farmacéutica esté destinada a ser administrada por vía sublingual.

15

[0022] El péptido de la invención puede ser detectado por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Preferiblemente, la detección del péptido se lleva a cabo mediante la combinación de cromatografía de líquidos y espectrometría de masas.

20

[0023] Tal como aquí se utiliza, la expresión «cromatografía de líquidos» se refiere a una técnica empleada para la separación de la mezcla. Suele conllevar el paso de una mezcla disuelta en una fase líquida móvil a través de una fase estacionaria, que separa la sustancia analizable del resto de moléculas de la mezcla y permite aislarla. Durante la HPLC (High Pressure Liquid Chromatography, cromatografía de líquidos de alta presión), se fuerza el paso de la muestra por una columna que está llena de partículas de forma irregular o esférica o de una capa monolítica porosa (fase estacionaria) mediante un líquido (fase móvil) a alta presión.

25

30

[0024] La espectrometría de masas es un método bien conocido por los expertos en la técnica. Las técnicas de espectrometría de masas que entran dentro del alcance de la invención abarcan en particular la MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight, desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo) o la LC-ESI-MS/MS (Liquid chromatography-Electrospray Ionisation-Mass Spectrometry/Mass spectrometry, cromatografía de líquidos-ionización por electrospray-espectrometría de masas/espectrometría de masas).

35

[0025] La expresión «una combinación de cromatografía de líquidos y espectrometría de masas» es una técnica de química analítica que combina las capacidades de separación física de la cromatografía de líquidos con las capacidades de análisis de masas de uno o varios espectrómetros de masas, preferiblemente después de la ionización por electrospray (ESI), como el tándem de espectrometría de masas (MS/MS).

40

[0026] Preferiblemente, en el método o uso anteriormente definido, el extracto se somete a tratamiento proteolítico antes de detectar el péptido. Tal como aquí se entiende, «tratamiento proteolítico» se refiere a la degradación dirigida (digestión) de péptidos por enzimas llamadas proteasas o digestión intramolecular. Preferiblemente, el tratamiento proteolítico implica al menos una proteasa. Ejemplos de proteasas son, por ejemplo, tripsina, quimotripsina, elastasa, endoproteinasa Glu-C, endoproteinasa Asp-N, endoproteinasa Lys-C y endoproteinasa Pro-C. Preferiblemente, la proteasa es tripsina. La tripsina es una serina proteasa que predominantemente rompe las cadenas peptídicas en el extremo carboxílico de los aminoácidos lisina y arginina, excepto cuando les sigue una prolina.

45

50

[0027] Preferiblemente, los péptidos contenidos en el kit de la invención están destinados a utilizarse como control cuando se lleva a cabo un método para determinar la presencia de extractos de una especie de gramínea en una composición.

55 [Breve descripción de los dibujos]

[0028]

FIG. 1: representa los espectros purificados con MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo) de los alérgenos del grupo 1 Lol p 1, Phi p 1, Dac g 1, Ant o 1, Poa p 1 extractos respectivamente de

raigrás perenne, fleo, dactilo, grama de olor y pasto azul de Kentucky.

FIG. 2: representa las señales de ESI-MS (ionización de electroespray-espectrometría de masas) correspondientes al péptido a 1302.7 Da de los alérgenos purificados del grupo 1 Lol p 1, Phl p 1, Dac g 1, Ant o 1, Poa p 1 extractos respectivamente de *raigrás perenne*, *fleo*, *dactilo*, *grama de olor* y *pasto azul de Kentucky*. Los picos están etiquetados con los tiempos de retención en minutos.

FIG. 3: representa el espectro completo de la LC-MS (cromatografía de líquidos-espectrometría de masas) de los extractos en bruto de tres lotes diferentes (A), (B) y (C) de polen de *raigrás perenne*. Los picos están etiquetados con los tiempos de retención en minutos.

FIG. 4: representa la señal de LC-MS correspondiente a los péptidos de un extracto de polen de *raigrás perenne* Lol p 1 con una masa de 1302,7 Da péptidos de tres lotes diferentes (A), (B) y (C). Los picos están etiquetados con los tiempos de retención en minutos.

FIG. 5: representa la intensidad de la detección del marcador de dactilo, del marcador de grama de olor, del marcador de *raigrás perenne*, del marcador de pasto azul de Kentucky y del marcador de fleo (verticalmente) medidos por análisis MS/MS de la mezcla de gramíneas sin dactilo, sin grama de olor, sin *raigrás perenne*, sin pasto azul de Kentucky o sin fleo (horizontalmente).

FIG. 6: representa la detección de la señal específica de los péptidos del grupo 1 Phl p 1, Poa p 1, o Ant 1, Dac g 1, Lol p 1 en un extracto de polen de 5 gramíneas por LC-MS/MS. Los picos están etiquetados con los tiempos de retención en minutos.

25 **EJEMPLO**

MÉTODOS

Extractos de polen y sustancias farmacológicas de polen de 5 gramíneas

30 **[0029]** Se extraen pólenes de pasto azul de Kentucky, dactilo, *raigrás perenne*, grama de olor y fleo de forma individual durante 24 horas con una solución de bicarbonato de amonio 4 g/L, con agitación. El extracto se vuelve a filtrar, se concentra y se liofiliza.

35 **[0030]** En un segundo paso, para confirmar la especificidad de los marcadores identificados para cada gramínea, también se prepara una mezcla de extractos de sólo 4 de los pólenes de gramíneas anteriores.

Análisis de espectrometría de masas (MS)

40 **[0031]** Con el fin de confirmar la identificación de péptidos específicos de gramíneas, las sustancias farmacológicas basadas en mezclas que contienen 4 especies de gramíneas se caracterizan mediante técnicas de espectrometría de masas (MS) en términos de los patrones de péptidos obtenidos tras la digestión trípica. Las condiciones experimentales se optimizan inicialmente con el fin de garantizar la eficacia de la digestión con tripsina.

45 **[0032]** Brevemente, una parte alícuota de cada alérgeno de gramínea purificada o de la mezcla purificada de alérgenos (~ 5 g) se desnaturaliza térmicamente en presencia de un tensioactivo aniónico (RapiGest de Waters Corp). Los enlaces disulfuro se escinden entonces, después de la incubación con ditioneitol y los residuos de cisteína resultantes se alquilan con yodoacetamida, antes de una digestión con tripsina durante la noche. Entonces se analizan los digestos trípicos obtenidos a partir de los diferentes alérgenos, tanto mediante MALDI-TOF MS como mediante LC-ESI-MS/MS para la caracterización de la estructura primaria (**FIG. 1** y **FIG. 2**).

55 **[0033]** Para la LC-ESI-MS/MS, se inyectan 20 µL de una solución de alérgeno (20 mg/ml) en una columna para la cromatografía de líquidos, como cromatografía hidrófoba, RP-HPLC (Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography, fase inversa de cromatografía de líquidos de alta presión), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaños y cromatografía de afinidad conectada a un Dionex HPLC U3000. Se conecta un espectrómetro de masas Q-TOF 1 (Waters) a la HPLC para que la medición de la masa sea exacta. Este instrumento se utiliza en modo de ionización positiva. La calibración del instrumento se realiza utilizando apomioglobina.

RESULTADOS

Identificación de péptidos de alérgenos específicos de cada especie del grupo 1

5 **[0034]** Se analizaron tres lotes independientes de extractos de polen de cada especie de gramínea para confirmar la especificidad de estos péptidos (como se ejemplifica en la **FIG. 3** y en la **FIG. 4** para el raigrás perenne).

10 **[0035]** Utilizando un enfoque similar, se identificó con éxito un péptido tríptico de alérgeno del grupo 1 específico (diferenciando su masa molecular y su secuencia de aminoácidos) de cada especie individual de gramínea (**Tabla 1**).

Tabla 1. Resumen de marcadores específicos de especies de gramíneas identificados.

Alérgenos	Especie	Masa molecular (Da)	Secuencia específica de aminoácidos	SEQ ID NO:
Lol p 1	<i>Raigrás perenne</i>	1302,7	ASNPNYLAILVK	1
Phl p 1	<i>Fleo</i>	1363,7	STWYGKPTAAGPK	2
Dac g 1	<i>Dactilo</i>	4505,0		3
Ant o 1	<i>Grana de olor</i>	1499,8	KVEAEDVIPEGWK	4
Poa p 1	<i>Pasto azul de</i>	846,5	SAGELELK	5

15

[0036] Del mismo modo, se analizaron tres lotes independientes de extractos de polen de cada especie de gramínea para confirmar la especificidad de 25 de esos péptidos.

20 **[0037]** En conjunto, estos análisis establecieron que se podría utilizar la espectrometría de masas para identificar péptidos específicos del grupo 1, con características precisas de masa y secuencia, que representan la firma molecular de cada especie individual de gramínea.

Identificación de gramíneas individuales en extractos de polen de 5 gramíneas

25 **[0038]** Habiendo identificado péptidos de alérgenos específicos de cada especie del grupo 1 para cada una de las 5 especies de gramíneas, se investigó si dichos péptidos podrían ser detectados en extractos de polen de 5 gramíneas. En un primer momento, se analizaron extractos de polen de gramíneas en bruto que comprendían sólo 4 especies, para confirmar la especificidad del péptido del alérgeno. Se optó por un enfoque de LC-MS/MS (utilizando un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap de ThermoElectron) para detectar péptidos de especies específicas del grupo 1. Se pudo detectar la presencia en dichas muestras de todos los péptidos específicos directamente mediante LC-MS/MS.

35 **[0039]** A modo de ejemplo, utilizando ese método, no se detectó el péptido 4505,0 Da (péptido específico *Dac g 1*) en un extracto hecho con una mezcla de 4 gramíneas sin *dactilo*, pero sí se detectó en todas las mezclas de 4 gramíneas que contenían *dactilo* (**FIG. 5**). No se detectaron marcadores individuales específicos de otras especies en mezclas de 4 gramíneas que no incluían las correspondientes especies de gramíneas (**FIG. 5**).

40 **[0040]** Con este enfoque, fue posible detectar inequívocamente los cinco péptidos específicos de alérgenos en una sustancia farmacológica hecha con una mezcla de polen de 5 gramíneas (**FIG. 6**). Se obtuvieron resultados similares con dos sustancias farmacológicas adicionales preparadas de forma independiente con pólenes distintos.

[0041] Por lo tanto, este estudio proporciona un test para identificar o confirmar la presencia de una especie de gramínea dentro de una mezcla que contenga un extracto de especies de gramíneas.

45 **[0042]** Este estudio también proporciona un test de identidad sensible para documentar la presencia de cada especie individual de gramínea dentro de sustancias farmacológicas fabricadas a partir de extractos de polen de 5 gramíneas.

[0043] Primero se identificaron los péptidos derivados de alérgenos del grupo 1 con masas y características de secuencia de aminoácidos específicas, que podrían utilizarse como firmas moleculares de cada especie de gramínea individual. Utilizando una metodología de LC-MS/MS, se alcanzó un alto nivel de especificidad de detección al combinar señales de (i) MS/MS, (ii) mediciones de masa de alta resolución y (iii) tiempos de retención cromatográfica. En consecuencia, se demostró que tales péptidos derivados del grupo 1 son realmente específicos de cada especie individual de gramínea como se confirmó en tres lotes diferentes para cada polen individual.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

[0044]

- <110> Stallergenes
- 15 <120> Método para la identificación de especies de gramínea
- <130> BET09P0379
- 20 <160> 5
- <170> Patente en versión 3.4
- <210> 1
- 25 <211> 12
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> péptido
- <400> 1

Ala Ser Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Ile Leu Val Lys
1 5 10

- 35 <210> 2
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> péptido
- <400> 2

Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala Gly Pro Lys
1 5 10

- <210> 3
- <211> 41
- 50 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> péptido
- 55 <400> 3

ES 2 565 930 T3

Cys Thr Lys Pro Glu Ser Cys Ser Gly Glu Ala Val Thr Val His Ile
1 5 10 15

Thr Asp Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Pro Tyr His Phe Asp Leu Ser
20 25 30

Gly His Ala Phe Gly Ser Met Ala Lys
35 40

<210> 4

5

<211> 13

<212> PRT

<213> secuencia artificial

10 <220>

<223> péptido

<400> 4

Lys Val Glu Ala Glu Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys
1 5 10

15

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

20 <213> secuencia artificial

<220>

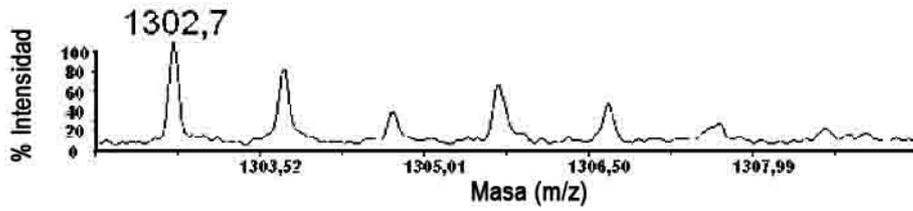
<223> péptido

25 <400> 5

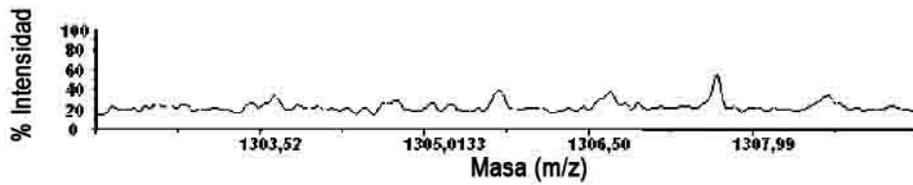
Ser Ala Gly Glu Leu Glu Leu Lys
1 5

REIVINDICACIONES

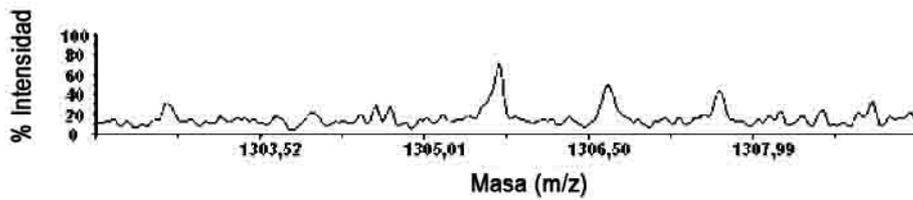
1. Utilización de al menos un péptido que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, para determinar la presencia en una composición de extractos procedentes de al menos una especie de gramínea seleccionada del grupo que consiste en raigrás perenne, fleo, dactilo, grama de olor y pasto azul de Kentucky.
2. Utilización conforme a la reivindicación 1, en la que la composición es una composición farmacéutica destinada al tratamiento de las alergias a las gramíneas.
3. Utilización conforme a la reivindicación 2, en la que los extractos son extractos de polen de gramíneas.
4. Método para determinar la presencia de extractos procedentes de una especie de gramínea en una composición, que comprende:
 - someter una muestra de la composición a un tratamiento proteolítico;
 - detectar al menos un péptido que consista en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, en dicha muestra de la composición sometida al tratamiento proteolítico;
 - deducir que un extracto de raigrás perenne, fleo, dactilo, grama de olor o pasto azul de Kentucky está presente en la composición, si se ha detectado en la muestra un péptido que consista, respectivamente, en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.
5. Método conforme a la reivindicación 4, en el que la detección del péptido se lleva a cabo mediante la combinación de cromatografía de líquidos y espectrometría de masas.
6. Método conforme a la reivindicación 4 o 5, en el que el tratamiento proteolítico implica al menos una proteasa.
7. Método conforme a la reivindicación 6, en el que el tratamiento proteolítico incluye tripsina.
8. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que la composición es una composición farmacéutica destinada al tratamiento de alergias a las gramíneas.
9. Método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que los extractos son extractos de polen de gramínea.
10. Péptido que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.
11. Kit para detectar la presencia de extractos de una especie de gramínea en una composición, comprendiendo dicho kit al menos dos de los péptidos definidos en la reivindicación 1.
12. Kit conforme a la reivindicación 11, que comprende:
 - un péptido que consiste en SEQ ID NO: 1;
 - un péptido que consiste en SEQ ID NO: 2;
 - un péptido que consiste en SEQ ID NO: 3;
 - un péptido que consiste en SEQ ID NO: 4;
 - un péptido que consiste en SEQ ID NO: 5.



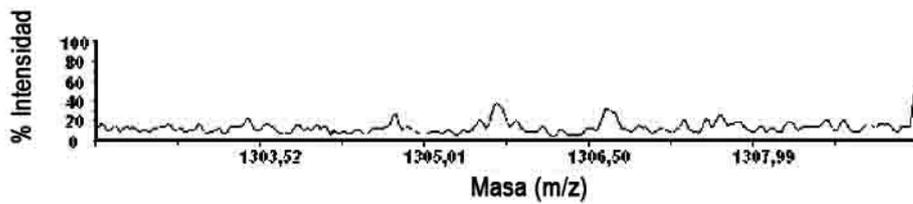
Lol p 1



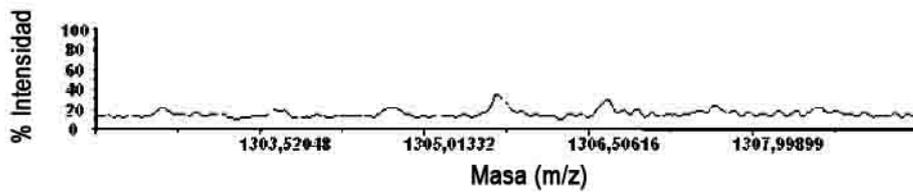
Phl p 1



Dac g 1



Ant o 1



Poa p 1

FIG.1

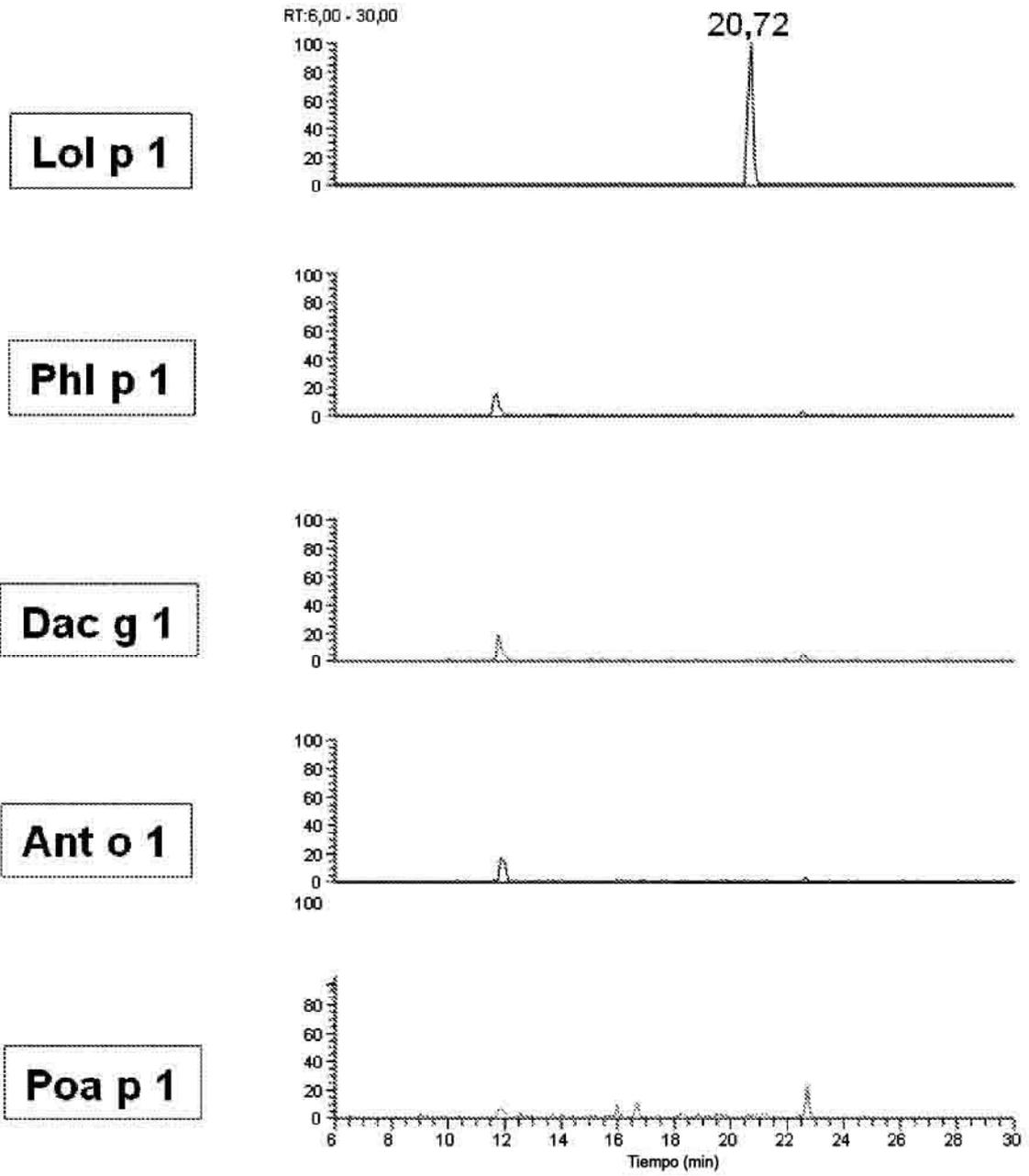


FIG.2

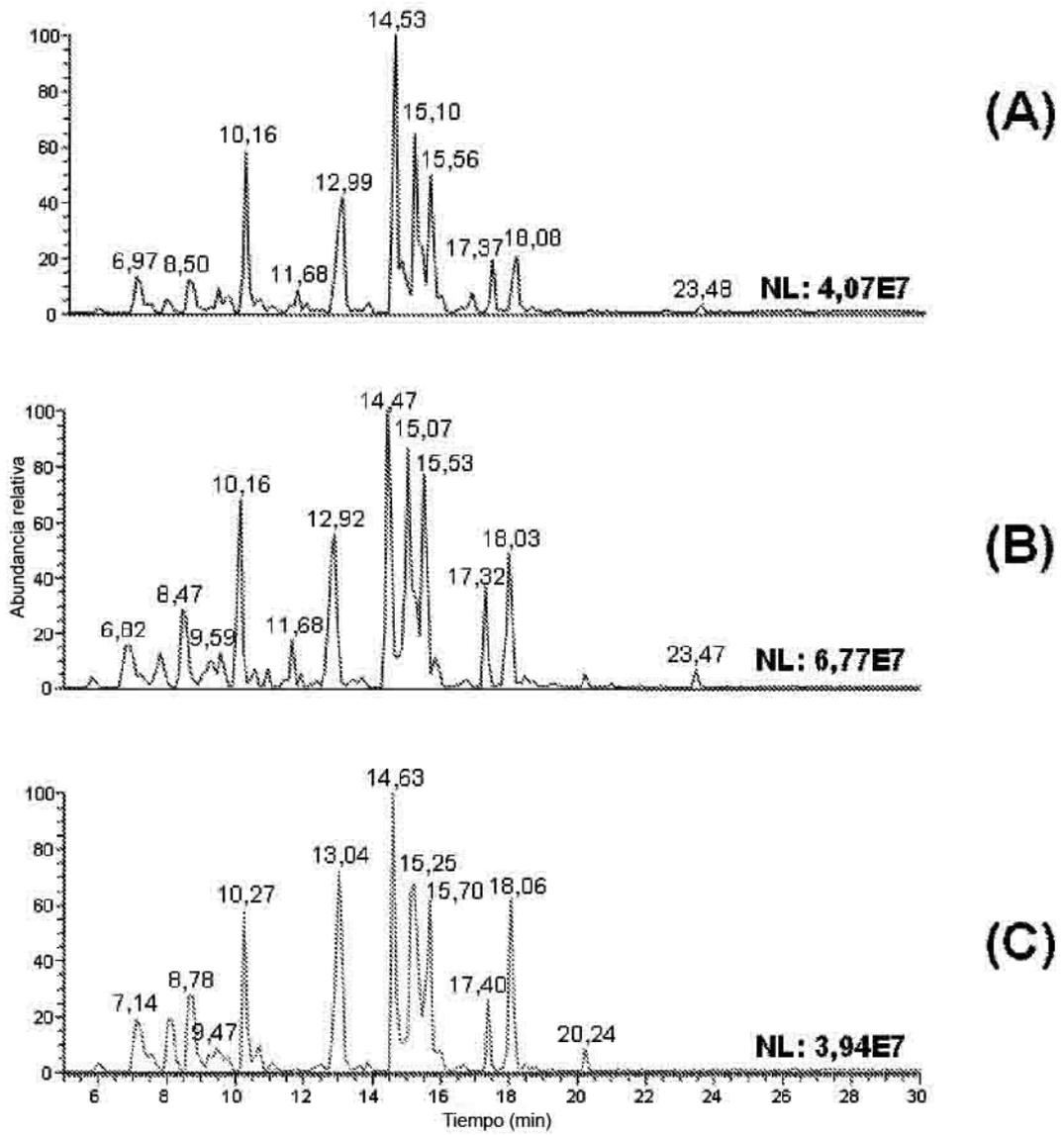


FIG.3

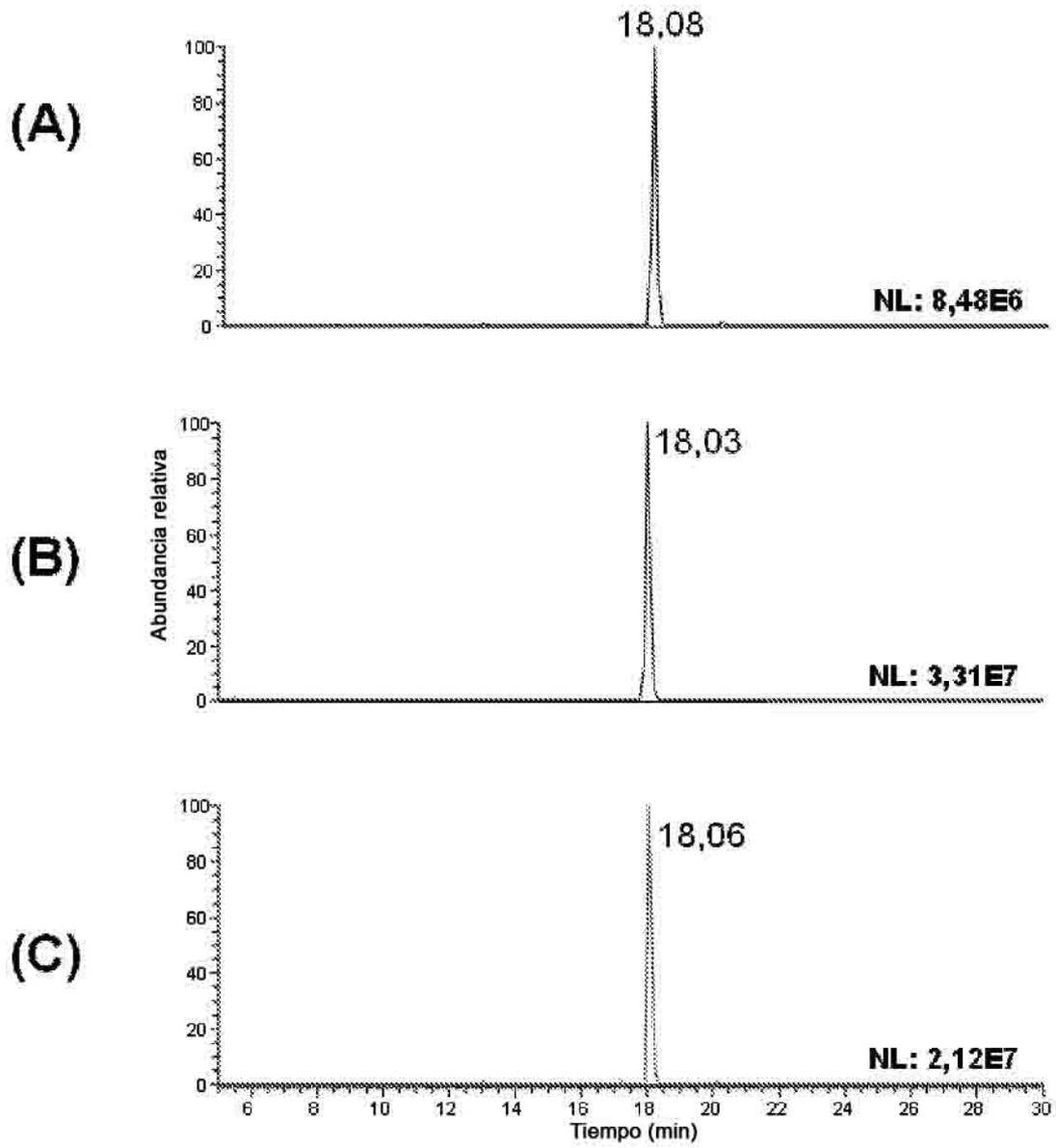


FIG.4

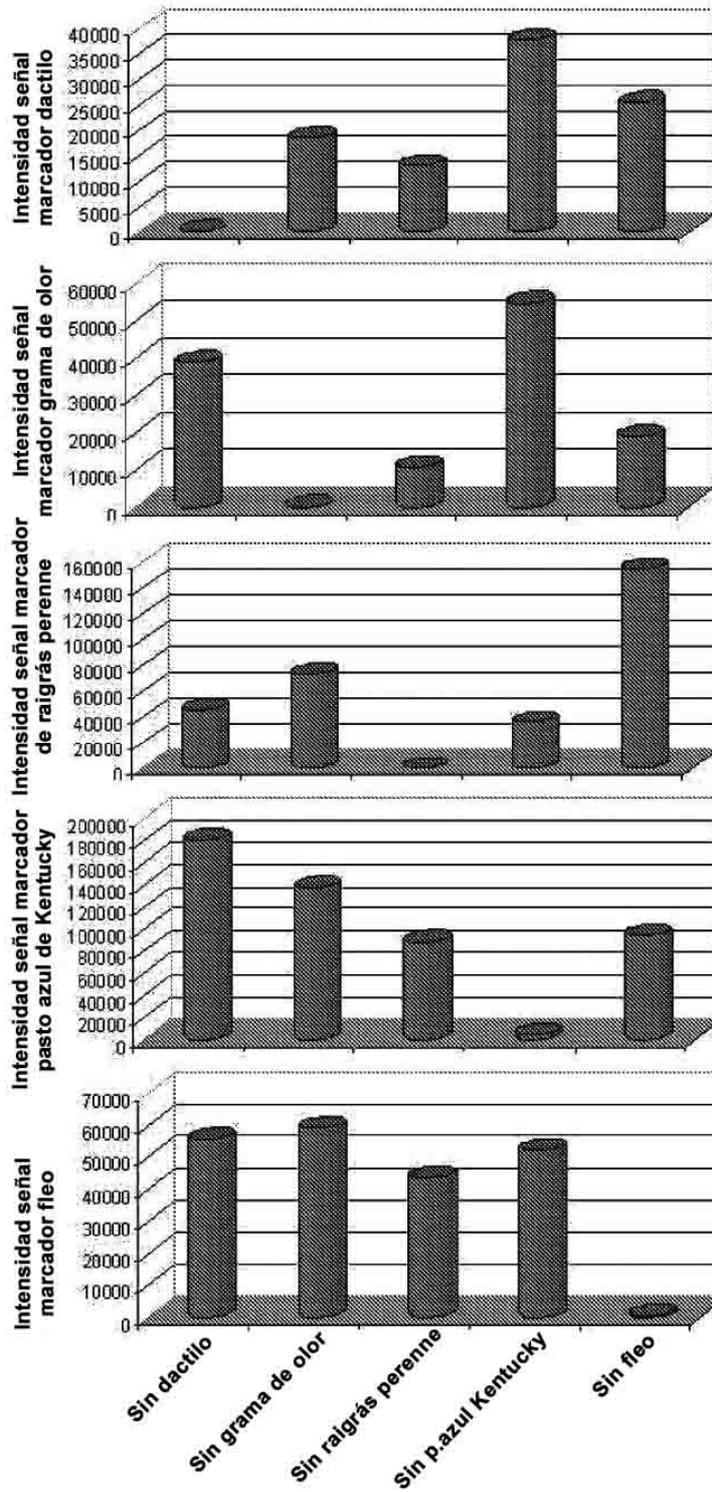


FIG.5

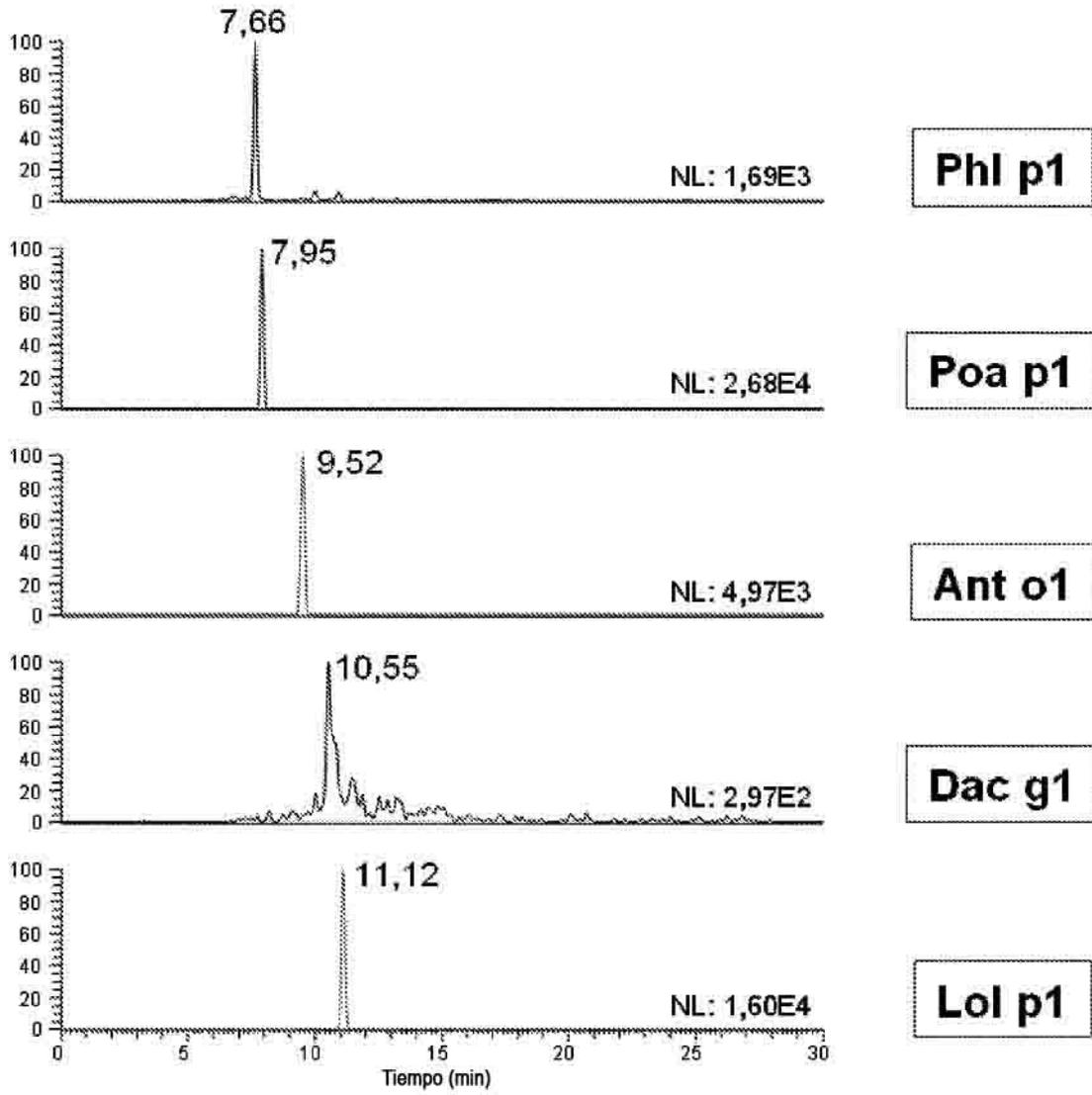


FIG.6