



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 125 201**

⑫ Número de solicitud: 9701389

⑤① Int. Cl.⁶: C12N 15/29

C12N 15/70

C07K 14/415

G01N 33/53

A61K 39/36

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **24.06.97**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.99**

⑫③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.02.99

⑦① Solicitante/s: **Industrial Farmacéutica y
de Especialidades, S.A.
Alameda de Urquijo, 27
48008 Bilbao, Vizcaya, ES**

⑦② Inventor/es: **Asturias Ortega, Juan Andrés;
Martínez Garate, Alberto;
Martínez Quesada, Jorge y
Palacios Peláez, Ricardo**

⑦④ Agente: **Ungría López, Javier**

⑤④ Título: **ADN recombinante que codifica para epítomos del alérgeno mayor de Olea europaea Ole e 1 útil para el diagnóstico y tratamiento de alergias.**

⑤⑦ Resumen:

ADN recombinante que codifica para epítomos del alérgeno mayor de olea europaea ole e 1 útil para el diagnóstico y tratamiento de alergias.

Se ha clonado ADN recombinante que codifica para epítomos del alérgeno mayor de Olea europaea y tiene homología con otros alérgenos mayores (Syr v 1 y Lig v 1) de otras especies pertenecientes a la Familia Oleaceae. El polen de estas plantas tiene gran importancia alérgica en la Cuenca Mediterránea. El alérgeno recombinante ha sido producido como proteína de fusión con la glutatión-S-transferasa, y posteriormente separado de ésta mediante digestión con trombina. El alérgeno producido (rOle e 1) muestra un comportamiento antigénico similar al alérgeno natural, pudiendo ser utilizado en diagnóstico e inmunoterapia.

ES 2 125 201 A1

DESCRIPCION

ADN recombinante que codifica para epitopos del alérgeno mayor de olea europea Ole e 1 útil para el diagnóstico y tratamiento de alergias.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se encuadra en el campo del diagnóstico y tratamiento de alergias, particularmente alergias polínicas. Concretamente, trata del alérgeno mayor del polen de *Olea europaea* (olivo). En la presente invención se proporcionan moléculas de ADN recombinante que codifican para un polipéptido que tiene al menos un epitopo del alérgeno Ole e 1, que tiene una gran homología y reactividad cruzada con otros alérgenos del polen de la misma familia *Oleaceae*, como fresno ash, *Fraxinus excelsior*, aligustre (privet, *Ligustrum vulgare*), lila (lilac, *Syringa vulgare*) y forsincia (forsythia, *Forsythia suspensa*). Esta familia de árboles y arbustos, sobre todo el olivo, se encuentran ampliamente distribuidos en todos los países de la Cuenca Mediterránea. Se describen también métodos de producción de estos polipéptidos recombinantes en sistemas de expresión heterólogos. También se describe un eficiente método para la purificación del alérgeno recombinante Ole e 1.

Estado de la técnica anterior a la invención

Las alergias de tipo I son un problema sanitario importante en los países industrializados. Este tipo de alergias están causadas por la formación de anticuerpos IgE contra antígenos transportados por el aire. Estos anticuerpos IgE interaccionan con los mastocitos y basófilos, liberando mediadores biológicos como histamina, produciendo rinitis alérgica, conjuntivitis y asma bronquial en un 20 % de la población [(1) Miyamoto, T. (1991). *Advances in Allergology and Clinical Immunology*. P. Godard, J. Bousquet, and F. Michel, eds. (New Jersey, USA: The Parthenon Publishing Group-Carnforth), pp. 343-347]. Uno de los métodos actuales para remediar las manifestaciones alérgicas es la inmunoterapia. Este método consiste básicamente en modular la respuesta inmune en el paciente mediante la administración regular y en concentraciones crecientes de las proteínas que producen la alergia (extractos alérgicos).

Los métodos de diagnóstico de las enfermedades alérgicas, tales como RIA (immuno-radiometric assay), RAST (radio-allergosorbent test), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), inmunotransferencia, ensayos de liberación de histamina, entre otros, dependen de la disponibilidad de alérgenos puros. Los extractos alérgicos aislados de fuentes naturales son complejas mezclas de proteínas y otras moléculas. Su composición, y por lo tanto alergenidad, depende del material usado, el cual varía según las condiciones ambientales, en el caso de los pólenes, la fase de maduración, en el caso de los hongos, las condiciones de crecimiento de los ácaros, etc. Incluso, algunos extractos pueden contener una concentración insuficiente de alérgenos mayores, pueden estar contaminados con componentes no deseados, frente a los cuales el paciente no es alérgico, o ambos. Además, alérgenos importantes pueden perderse durante la extracción debido a proteasas, y los procesos bioquímicos de purificación de alérgenos son laboriosos y costosos. Por estas razones, se ha prestado gran atención a la tecnología del ADN recombinante como una alternativa viable para la producción de alérgenos recombinantes, facilitando así su caracterización a nivel molecular, y su uso en diagnóstico y terapia [(2) Scheiner, O. and Kraft, D. (1995). *Basic and practical aspects of recombinant allergens*. *Allergy* 50,384-391]. Los alérgenos recombinantes pueden ser producidos a gran escala en tanques de fermentación, utilizando sistemas de expresión microbianos. Su purificación es más eficiente y barata, ya que se parte de una mayor proporción de la proteína de interés. Además, mediante estas técnicas se pueden obtener fácilmente fragmentos específicos de estas proteínas, que podrán servir para la caracterización de epítomos de células T. El conocimiento de estos epítomos específicos podría mejorar las formas de terapia utilizando péptidos sintéticos o alérgenos recombinantes. Esta aproximación ha sido revisada recientemente por van Neerven y colaboradores [(3) van Neerven, R.J.J., Ebner, C., Yssel, H., Kapsenberg, M.L., and Lamb, J.R. (1996). *T-cell responses to allergens: epitope-specificity and clinical relevance*. *Immunol Today* 17, 526-532. La aplicación de las técnicas del ADN recombinante ha llevado al aislamiento de un gran número de proteínas con características alérgicas [(4) Stewart, G. (1995). *The molecular biology of allergens*. In *Asthma and Rhinitis*. W. Busse and S. Holgate, eds. (Boston: Blackwell Scientific Publications), pp. 898-932].

La alergia a polen de olivo es un problema de salud importante en la zona mediterránea, estimándose que entre un 30 a un 70 % de la población de esta zona que sufre de alergias son sensibles al polen de olivo [(5) Carreira, J. and Polo, F. (1995). *The allergens of Olea europaea and Parietaria spp. and their relevance in the Mediterranean Area*. *Allergy Clin. Immunol. News* 7, 79-84]. [(6) Wheeler, A. (1992). *Hypersensitivity to the allergens of the pollen from the olive tree (Olea europaea)*. *Clin. Exp. Allergy* 22, 1052-1057]. Todos los pacientes alérgicos a polen de olivo sufren de rinitis y conjuntivitis, y la prevalencia de asma entre ellos es mayor del 35 %. Este alto porcentaje de respuestas asmáticas se ve

agravado porque los síntomas asmáticos son más graves que en otras formas de polinosis. Estos síntomas a veces no disminuyen nada pasados varios meses o incluso todo el año [(5)]. El alérgeno mayor del polen de *O. europaea*, Ole e 1, ha sido detectado en un 70 % de los pacientes alérgicos a olivo, [(7) Lauzirica, P., Gurbindo, C., Maruri, N., Galocha, B., Díaz, R., Gázquez, J., García, R., and Lahoz, C. (1988). Olive (*Olea europaea*) pollen allergens. I. Immunochemical characterization by immunoblotting, CRIE and immunodetection by a monoclonal antibody. Mol. Immunol. **25**, 329-335], y en el 90 % de pacientes monosensibles. Ole e 1 es una proteína ácida que tiene dos variantes de 145 residuos aminoacídicos, una de ellas es la forma glicosilada con un peso molecular de 20 kDa, y otra sin glicosilar de 18.5 kDa [(8) Villalba, M., Batanero, E., López-Otín, C., Sánchez, L., Monsalve, R., González de la Peña, M., Lahoz, C., and Rodríguez, R. (1993). The amino acid sequence of *Ole e 1*, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. Eur. J. Biochem. **216**, 863-869]. Este alérgeno tiene microheterogeneidad en diferentes posiciones que da lugar a las diferentes isoformas detectadas [(8),(9) Lombardero, J., Barbas, J.A., Moscoso del Prado, J., and Carreira, J. (1994). cDNA sequence analysis of the main olive allergen, *Ole e 1*. Clin. Exp. Allergy **24**, 765-770] y [(10) Villalba, M., Batanero, E., Monsalve, R., González de la Peña, M., Lahoz, C., and Rodríguez, R. (1994). Cloning and expression of *Ole e 1*, the major allergen from olive tree pollen. J. Biol. Chem. **269**, 15217-15222]. Se ha encontrado una alta similaridad (90 % identidad) con Syr v 1, el alérgeno mayor de *Syringa vulgaris* (lila). Este alérgeno muestra al igual que Ole e 1, una cierta heterogeneidad en su secuencia [(11) Batanero, E., Villalba, M., López-Otín, C., and Rodríguez, R. (1994). Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from lilac pollen. Sequence analysis of three cDNA encoding protein isoforms. Eur. J. Biochem. **221**, 187-193]. El papel biológico de Ole e 1 en el polen de olivo es desconocido si bien podría estar relacionado con la germinación, ya que tiene cierta similaridad con otras proteínas como la proteína Zm13 de polen de maíz [(12) Heiss, S., Flicker, S., Hamilton, D., Kraft, D., Mascarenhas, J., and Valenta, R. (1996). Expression of Zm13, a pollen specific maize protein, in *Escherichia coli* reveals IgE-binding capacity and allergenic potential. FEBS Lett. **381**, 217-221], y la proteína LAT52 de tomate [(8)]. La proteína Zm13 ha sido descrita recientemente como un posible alérgeno, ya que tiene capacidad para unir IgE [(12)].

Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere a un ADN recombinante que codifica para epitopos del alérgeno mayor de olea europea Ole e 1, útil para el diagnóstico y tratamiento de alergias.

Más especificante la invención está relacionada con la clonación del alérgeno mayor del polen de olivo (*Olea europaea*), y su utilización para el diagnóstico y la terapia de alergia a polen de olivo y al de otras plantas de la misma familia *Oleaceae*.

Clonación y secuenciación de genes que codifican para Ole e 1

La clonación de genes puede realizarse utilizando diversos métodos [(13) Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Anonymous Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory]: bibliotecas de ADN genómico o ADN complementario, utilizando como vectores: plásmidos, fasmidos, bacteriófagos o cósmidos. También se puede utilizar la técnica de PCR (amplificación en cadena de la ADN polimerasa) para clonar un gen del cual se conoce parte de su secuencia. De igual manera la detección de los clones que portan el gen de interés puede realizarse de varias maneras: complementación de mutantes auxótrofos, inmunodetección o actividad enzimática de la proteína expresada, radiodetección con sondas de oligonucleótidos marcadas radiactivamente, o secuenciación directa. En la presente invención se han conjugado los dos métodos más directos de ambas etapas: la clonación mediante la amplificación por PCR de ADN complementario y la secuenciación directa de los insertos clonados.

A partir de 100 mg de polen de olivo, se aisló el ARN mensajero enriquecido en transcritos con poli(A+) utilizando columnas de afinidad. Se sintetizó la primera cadena de ADN complementario a partir del ARN mensajero aislado, utilizando transcriptasa reversa. El híbrido de ADN-ARN obtenido se utilizó como molde para la amplificación de los correspondientes genes de la profilina. En este proceso se utilizaron como cebadores oligonucleótidos homólogos a los extremos 3' y 5' del gen que codifica para Ole e 1 [(10)]. A estos cebadores se les añadió en sus extremos secuencias de reconocimiento de diversas endonucleasas de restricción. La amplificación por PCR se realizó a temperaturas de hibridación de entre 42-56°C y durante 30-35 ciclos. La reacción se sometió a electroforesis en geles de agarosa (2 %) y una banda de unos 440 pares de bases (pb) fue aislada del gel y purificada. El ADN purificado se digirió con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, y se ligó al vector pBlues-cript (Stratagene, La Jolla, CA), cortado con los mismos enzimas. Células competentes de *E. coli* DH5α se transformaron con la

mezcla de ligación y los transformantes se seleccionaron en placas de medio sólido LB con ampicilina, X-gal e IPTG. El ADN plasmídico de los clones resistentes a ampicilina, y que tenían color blanco fue aislado, y caracterizado mediante digestión con endonucleasas de restricción. El ADN insertado, cuyo tamaño correspondía con el esperado, fue secuenciado mediante el método de Sanger [(14) Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467] utilizando dideoxinucleótidos fluorescentes. El análisis informático de las secuencias demostró que todas las secuencias codificaban para el alérgeno Ole e 1.

Expresión de los genes clonados

Existe una gran diversidad de sistemas de expresión de proteínas heterólogas. En la presente invención se ha sobreexpresado el gen de Ole e 1 en dos diferentes sistemas que permiten la producción de una proteína no fusionada, utilizando el vector de expresión pKN172 [(15) Way, M., Pope, B., Gooch, J., Hawkins, M., and Weeds, A.G. (1990). Identification of a region in segment 1 of gelsolin critical for actin binding. EMBO J. 9, 4103-4109], o de una proteína de fusión con la enzima glutatión-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*, utilizando el vector pGEX-4T-1 (Pharmacia Biotech). La expresión en el vector pKN172 se basa en la interacción de la ARN polimerasa del fago T7 con un promotor específico del mismo fago (promotor del gen ϕ 10), que es colocado delante del fragmento que queremos expresar. La expresión de la ARN polimerasa de T7, en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) [(16) Studier, F.M. and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. 189, 113-130], se induce con IPTG, lo cual desencadena la expresión final del gen de interés. La expresión en el plásmido pGEX-4T-1 se produce debido al promotor *lac* situado delante del gen de la GST a cuyo extremo 5' se ha fusionado traduccionalmente el gen de interés. El IPTG se añadió, a concentraciones entre 0.6-1 mM, a un cultivo crecido en medio nutritivo (LB o TB) con ampicilina (100-200 μ g/ml), a una densidad óptica a 600 nm de entre 0.6-1. Esta adición provoca la expresión del gen de la profilina clonado detrás del promotor del gen ϕ 10. El cultivo se recogió entre 3-6 horas después de la inducción.

Purificación del alérgeno recombinante

La purificación del alérgeno recombinante se llevó a cabo mediante dos sencillos pasos de cromatografía: una de filtración en gel y otra de afinidad. La cromatografía de filtración en gel (Sephadex G-25) se realizó para retirar la urea, añadida a la muestra para obtener una completa solubilización de los cuerpos de inclusión, donde se encontraba la proteína de fusión. Posteriormente la muestra se pasó por una columna de glutatión unido a agarosa. La enzima GST se une específicamente al glutatión, y después de una serie de lavados, se puede eluir mediante la adición de glutatión libre. La proteína de fusión así obtenida se digirió con trombina para liberar el alérgeno recombinante, ya que entre ambas proteínas existe un sitio de corte para esta enzima introducido artificialmente. Ole e 1 recombinante puede separarse de la proteína GST pasando la mezcla nuevamente por una columna de afinidad, como se ha descrito anteriormente, obteniéndose de esta forma el alérgeno recombinante puro. Alternativamente, se puede tratar la columna conteniendo la proteína de fusión con trombina, de forma que el Ole e 1 recombinante quede liberado, mientras que la proteína se queda retenida en la columna.

En resumen, esta invención proporciona ADN recombinante que codifica para el alérgeno mayor del polen de olivo (*Olea europaea*). Igualmente proporciona un sistema de expresión microbiano (*E. coli*) para la obtención de importantes cantidades del alérgeno recombinante. Esta expresión puede realizarse en otros sistemas microbianos (*Pseudomonas*, *Bacillus*) o eucarióticos (levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*, o células de insectos). El alérgeno producido puede ser purificado por un sencillo proceso que incluye dos pasos de cromatografía, uno de ellos de filtración en gel y otro de afinidad. El alérgeno recombinante producido por este método no difiere en sus propiedades de unión a IgE de las profilinas naturales. La invención también describe métodos de diagnóstico utilizando este alérgeno recombinante.

Aplicaciones

Los métodos de diagnóstico, tanto *in vitro* como *in vivo*, que actualmente se utilizan se basan en el uso de extractos de alérgenos. Debido a la dificultad de obtener lotes reproducibles de extractos alérgénicos es interesante el uso de preparaciones reproducibles de alérgenos puros obtenidos mediante la tecnología de ADN recombinante [(2)]. Actualmente se pueden realizar diagnósticos precisos de ciertos tipos de alergias utilizando un número definido de alérgenos recombinantes. La caracterización del patrón de reactividad de cada paciente puede conducir en un futuro próximo, al desarrollo de un tipo de inmunoterapia más individualizada, y por ello eficiente. El alérgeno recombinante, Ole e 1 descrito en esta

invención, permite el diagnóstico y tratamiento de alergia a polen de olivo, la cual afecta de 30-70% de la población en la zona mediterránea, en concreto, el diagnóstico “in vivo” mediante pruebas cutáneas y test de provocación e “in vitro” mediante inmunoensayos de determinación de IgE y ensayos celulares (test de liberación de histamina, de transformación linfoblástica, de degranulación de basófilos, etc). Su aplicación al tratamiento de la alergia de tipo I se puede establecer en dos vías:

- a) Mediante inmunoterapia clásica utilizando la proteína recombinante completa,
- b) Mediante tratamiento anergizante utilizando péptidos de la proteína que constituyan epítomos de células T para la población de pacientes alérgicos al polen de olivo.

Depósito de la Cepa

La cepa de *Escherichia coli* OLE 5 ha sido depositada en la Colección Española de cultivos Tipo (Universidad de Valencia) correspondiéndole el No. CECT 4871.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Secuencias de cDNA del gen que codifica para el alérgeno mayor de *Olea europaea* (Ole e 1) Los guiones indican identidad con la secuencia superior.

Figura 2: Comparación de las secuencias deducidas de aminoácidos de los clones OLE4, OLE5 y OLE6, con la secuencia obtenida por secuenciación directa del alérgeno natural [(8)]. Los guiones indican identidad con la secuencia superior.

Figura 3: Comparación de secuencias de plantas encontradas en las bases de datos que tienen similitud con el alérgeno Ole e 1: **Zm13**, proteína específica del polen de maíz (P33050); **Lila**, alérgeno mayor (Syr v 1) de *Syringa vulgare* (S43242); proteína específica del polen de arroz (S31710); **Lat52**, proteína específica de anteras de tomate (P13447); **Arabi**, proteína específica del polen de *Arabidopsis thaliana* (Z25693). En negrita se resaltan aquellos residuos conservados en la mayoría de las secuencias. Las cisteínas conservadas en todas las secuencias han sido marcadas con un asterisco.

Figura 4: SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie de la expresión de pIO35 (carril 2) y del vector de expresión sin inserto (carril 1).

Figura 5: SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie del proceso de purificación de la proteína de fusión GST-Ole e 1.06. Carriles 1 y 2, lisado de *E. coli* BL21 conteniendo pGEX-4T-1 sin inserto y con el inserto OLE5, respectivamente; carriles 3 y 4, fracciones soluble y insoluble de la muestra del carril 2, respectivamente; carril 5, fracción insoluble tratada con 6 M de urea y pasada por Sephadex G-25; carril 6, fracción GST-Ole e 1 eluida de la columna de agarosa-glutatin.

Figura 6: SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie del proceso de digestión con trombina de la proteína de fusión GST-Ole e 1.06. Carril 1, proteína de fusión GST-Ole e 1 eluida de la columna de agarosa-glutatin; carril 2, Fusión GST-Ole e 1, tratada con trombina; carril 3, Ole e 1 recombinante; carril 4, GST.

Figura 7: Inmunodetección de Ole e 1.05 recombinante utilizando anticuerpos policlonales antiolivo. La descripción del gel es idéntica a la descrita en la figura 5.

Figura 8: Inmunodetección de Ole e 1.05 recombinante utilizando anticuerpos policlonales antiolivo. La descripción del gel es idéntica a la descrita en la figura 6.

Figura 9: Comparación por inmunodetección de la reactividad de IgE procedente de sueros de pacientes alérgicos a *Olea europaea*. Se transfirieron proteínas del extracto de *Olea europaea* (a), Ole e 1 natural purificada (b), Ole e 1.05 recombinante purificada (c), profilina natural purificada (d) y profilina recombinante purificada (e) y se incubaron con sueros de pacientes (carriles 1 a 9, y 11) alérgicos a *Olea europaea*, un pool de sueros de individuos sanos (carril C) tampón (carril B).

Figura 10: Inhibición de inmunodetección. Extractos proteicos de *Olea europaea* se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Estas membranas se incubaron con un pool de sueros de pacientes alérgicos a *Olea europaea* (carril 1), o preincubados con diferentes cantidades de proteína por ml de suero: 5 mg de extracto de polen de olivo (carril 2), 10 µg de BSA (carril 3), profilina recombinante de olivo (carril 4), Ole e 1.05 recombinante (carril 5), y Ole e 1 natural, (carril 6).

Figura 11: ELISA-inhibición. El pool de sueros (diluidos 1:4) de pacientes alérgicos a olivo se preincubó con extracto de polen de olivo (□), Ole e 1 natural (○), Ole e 1 recombinante (●), profilina recombinante de olivo (■) y BSA (△). Las placas tenían pegados 5 g de extracto de polen de olivo por pocillo.

Figura 12: Inmunodetección de la reactividad de IgE procedentes del suero (diluido 1:1) de un paciente alérgico a olivo en extractos de diferentes oleaceas: carril 1, *Olea europaea*, carril 2, *Syringa vulgare*; carril 3, *Fraxinus excelsior*; carril 4, *Ligustrum vulgare*.

Figura 13: Perfiles de hidrofobicidad de Ole e 1 y del alérgeno Syr v 1, de *Syringa vulgare*, obtenido mediante el programa DNASTrider, basándose en el algoritmo de Hoop y Woods. El eje de abscisas indica unidades Hoop & Woods de hidrofobicidad.

Modos de realización de la invención

La invención puede ser entendida a partir de los siguientes ejemplos ilustrativos, pero no limitativos de su alcance.

Técnicas básicas de la tecnología del ADN recombinante y bioquímica

Como muchas de las técnicas de ADN recombinante empleadas en esta invención son utilizadas rutinariamente por personal cualificado en el tema, es mejor introducir una corta descripción de estas técnicas más que describirlas cada vez que se utilicen. Excepto donde existe una indicación específica, todos estos protocolos están descritos en la referencia Sambrook et al [(13)].

Aislamiento de plásmidos para su secuenciación

Protocolo modificado del descrito en Sambrook et al, páginas 1.21 a 1.41. Un cultivo de 15 ml de *E. coli*, crecido en LB con ampicilina (100 µg/ml) durante 16 horas a 37°C, se recogió por centrifugación. Las células se resuspendieron en 1 ml TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8), y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 2 ml de solución de lisis (0.2 N NaOH, 1 % SDS), manteniéndose en hielo 5 min. Se añadieron 1.5 ml de acetato potásico 3M pH.4.8, agitándose por inversión, y se incubó en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a 4000 xg y 4°C. El sobrenadante se pasó a otro tubo al que se añadieron 9 ml de etanol, incubándose durante 20 minutos. Se centrifugó en las mismas condiciones, y el precipitado se lavó con etanol al 70 %, y se secó. Este ADN se resuspendió en 200 µl de 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA y 100 µg/ml de ARNasa y se siguió purificando según el protocolo Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI). El ADN así obtenido se resuspendió en 50-80 µl de agua destilada estéril, y se guardó a -20°C.

Corte con endonucleasas de restricción

Una reacción contiene típicamente entre 50-500 µg/ml de ADN en el tampón de reacción recomendado por los fabricantes (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia; Boehringer-Mannheim, Mannheim, Alemania; Promega). Se añaden de 2 a 5 unidades de la endonucleasa de restricción por cada µg de ADN y la reacción se incuba de 1 a 3 horas a las temperaturas recomendadas por el fabricante. La reacción se para calentando a 85°C durante 10 min, o por extracción con fenol seguida de precipitación de ADN con etanol. Esta técnica está descrita también en las páginas de 5.28 a 5.32 de la referencia Sambrook et al.

Electroforesis en geles de agarosa y purificación de fragmentos de ADN de geles

La electroforesis en geles de agarosa se realizó en un aparato horizontal, utilizando como tampón Tris-borato, como se describe en las páginas 6.3 a 6.15 de la referencia de Sambrook. Los fragmentos de ADN se tiñeron utilizando 0.5 mg/ml de bromuro de etidio que se añadió al gel. El ADN se visualizó por iluminación ultravioleta entre 300 y 310 nm. Para purificar fragmentos de ADN de la agarosa se utilizó el kit de GeneClean (Bio101 Inc., La Jolla, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ligación de fragmentos de ADN

Para la ligación de fragmentos de ADN con extremos cohesivos complementarios, 100 ng de cada uno de los fragmentos se incubaron en un volumen de reacción de lo a 20 µl conteniendo unas 0.5 unidades de T4 ADN ligasa (BioLine, London, UK) en el tampón recomendado por el fabricante. La incubación

se llevó a cabo durante 15 horas a 12-15°C. o 7 horas a 20°C.

Transformación de E. coli con ADN

5 Las cepas de *E. coli* DH5, BL21 o BL21 (DE3) fueron utilizadas en la mayoría de los experimentos. El ADN fue introducido mediante el protocolo del cloruro cálcico, como se describe en Sambrook, páginas de 1.76 a 1.84, o mediante el método del cloruro de rubidio, como describe Hanahan [(17) Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**, 557-580]. La selección se realizó en LB sólido con ampicilina (100 µg/ml) y cuando fue necesario se añadieron a cada
10 placa de Petri: 40 µl de X-gal (20 mg/ml en dimetilformamida), y 4 µl de IPTG (200 mg/ml).

Muestreo de plásmidos en E. coli

Después de la transformación, las colonias resultantes de *E. coli* fueron estudiadas para detectar la
15 presencia de los plásmidos deseados mediante un protocolo rápido de aislamiento de plásmidos. Este protocolo esta descrito en las páginas 1.25 a 1.28 de la referencia de Sambrook.

Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

20 Se siguió básicamente la técnica descrita por Laemmli [(18) Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature **227**, 680-685], utilizando un aparato de electroforesis MINI-PROTEAN (Bio-Rad, Richmond, CA). Los geles, de 10 x 10 cm y con una concentración de poliacrilamida del 12.5 o 15 %, se sometieron a una corriente de 200 voltios durante 45 minutos en tampón Tris-Glicina. Las proteínas utilizadas como patrones fueron las del kit Bio-Rad
25 para bajos pesos moleculares. El cálculo de los pesos moleculares y los análisis densitométricos de los geles se realizó utilizando un analizador de image (Bio-Image, Millipore Corp, Bedford, MA).

Análisis por inmunotransferencia

30 Se realizó por el método de Shen y cols. con modificaciones [(19) Shen, H., Choo, K., Lee, H., Hsieh, J., Lin, W., Lee, W., and Han, S. (1991). The 40-kilodalton allergen of *Candida albicans* is an alcohol dehydrogenase: molecular cloning and immunological analysis using monoclonal antibodies. Clin. Exp. Allergy **21**, 675-681]. Las proteínas separadas en SDS-PAGE fueron electro-transferidas a membranas de nylon. La membrana es incubada con un agente bloqueante (como puede ser leche desnatada al 5 %
35 en PBS: al cual llamaremos a partir de ahora leche/PBS). La membrana es entonces incubada con los anticuerpos de interés durante varias horas (estos anticuerpos podrán provenir de pacientes o de animales inmunizados). Posteriormente, la membrana se lava varias veces con leche/PBS, y se incuba con un segundo anticuerpo comercial, al cual esta acoplada una enzima (por ejemplo peroxidasa). Este anticuerpo comercial será anti-IgG, en el caso que hayamos utilizado un animal inmunizado, o anti-IgE, si el suero
40 proviene de humanos. La membrana es nuevamente lavada en PBS, y teñida con 4-cloro-1-naftol al 0,06 % en PBS con H₂O₂ al 0.01 %, a temperatura ambiente durante 30 min. La reacción es parada con agua destilada.

Ejemplos relacionados específicamente con la invención

45 *Aislamiento de ADN poli (A+) de polen*

Se aisló el ARN mensajero poli (A+) de 100 mg de polen de olivo siguiendo el protocolo descrito en Quick Prep Micro mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech). El ARN purificado se resuspendió
50 en 400 µl de agua destilada tratada con dietilpirocarbonato, y se determinó su concentración a 260 nm. A partir de 100 mg de polen se obtuvieron unos 8 µg de ARN, que se guardaron a -20°C precipitados con etanol. Este ARN poli (A+) fue utilizado para realizar la síntesis de la primera cadena de ADN complementario, como se expone en el apartado siguiente.

55 *Síntesis de la primera cadena de ADN complementario*

Un µg de ARN poli (A+) obtenido según el apartado siguiente, fue sedimentado por centrifugación a 4°C a 14000 xg durante 30 min. El sobrenadante se lavó con etanol al 70 %, se secó y se resuspendió en 20 µl de agua destilada tratada con dietilpirocarbonato. La solución se calentó a 60°C durante 10
60 min y luego se enfrió en hielo. Posteriormente, se siguió el protocolo descrito en First-Strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia Biotech), salvo que la incubación con la transcriptasa reversa se realizó durante 70 minutos. El cebador utilizado fue la mezcla al azar de hexadeoxinucleótidos, llamado pd(N6)primer

(Pharmacia Biotech). Una vez acabada la reacción, la mezcla se calentó a 90°C durante 5 minutos y se enfrió en hielo, almacenándose posteriormente a -20°C hasta que fue utilizada para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como se explica en el apartado siguiente.

5 Amplificación del gen de profilina por PCR

Los cebadores utilizados de la PCR se basaron en la secuencia del alérgeno Ole e 1 publicada anteriormente [(10)]:

10 * OLEXF (extremo 5' del gen):

5'-AGA GAATTC CATATG **GAGGATGTTCCGCAACCT**-3'

* OLEXR (extremo 3' del gen):

15

5'-AGA AAGCTT CATTACATGTTGGGCGGGTACAT-3'

Los cebadores se componen de la zona de hibridación (en negrita), de varios sitios de corte para las endonucleasas de restricción, *Eco* RI, *Hind* III y *Nde* I, (subrayada), y de unos nucleótidos de anclaje.

20

La reacción de amplificación por PCR del gen que codifica para el alérgeno Ole e 1 tenía los siguientes componentes en un volumen de reacción de 50 µl: tampón de amplificación x10, 5 µl; 200 µM de dNTPs; 100 pmoles de cada oligonucleótido cebador; 2.5 unidades de Taq polimerasa (Bioline, London, UK); 5 µl reacción de ADN complementario obtenido según el ejemplo 5.2.2 y agua destilada estéril hasta 50 pl. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador RoboCycler (Stratagene) en las siguientes condiciones: 4 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 56°C y 2 min a 72°C de amplificación. Se concluyó con una extensión de 6 minutos a 72°C. El producto de la reacción fue sometido a electroforesis en geles de agarosa (2%). La banda de unos 440 pb que correspondía a ADN de Ole e 1 fue extraída del gel por GeneClean (Bio101, La Jolla, CA), utilizando el protocolo descrito por el fabricante.

30

Clonación en pBluescript del gen que codifica para Ole e 1

El fragmento aislado fue digerido con *Hind* III, y posteriormente con *Eco* RI, y las endonucleasas de restricción se inactivaron por calor. Estos fragmentos se ligaron al vector pBluescript digerido con las mismas enzimas. La mezcla de ligación se utilizó para transformar transformar células competentes de *E. coli* DH5α. La selección se realizó en medio LB con ampicilina, X-Gal e IPTG, como se describe en Sambrook y col. Las colonias resultantes, que en este medio presentaban un color blanco, fueron crecidas para aislar su ADN plasmídico, el cual fue digerido simultáneamente con *Eco* RI-*Hind* III, y *Nde* I-*Hind* III. Los clones que, en ambos casos, liberaban un fragmento de 440 pb fueron seleccionados para su posterior análisis.

40

Secuenciación del gen que codifica para Ole e 1

La secuenciación del ADN insertado el pBluescript se realizó basándose en el método de Sanger [(17)], modificado para ser utilizado con dideoxinucleótidos fluorescentes y amplificación en termociclador. El ADN a secuenciar se preparó de la siguiente forma: cultivos de *E. coli* DH5α, conteniendo los plásmidos de interés fueron crecidos en 15 ml de LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, durante 16 horas, a 37°C y con agitación. El ADN se aisló por el método descrito en el apartado A). Las reacciones de secuenciación se realizaron mezclando 700-1000 ng de molde, 25 pmoles del cebador y los reactivos indicados en el kit de secuenciación (PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Termination Cycle Sequencing Kit, Perkin Elmer) siguiéndose las instrucciones del fabricante. Todos los fragmentos fueron secuenciados en las dos direcciones, utilizando cebadores comerciales (M13-20 primer o reverse primer) o cebadores específicos.

55

Se secuenciaron tres insertos de *Olea europaea*, plásmidos pIO14, pIO15 y pIO16, tenían 441 pb y codificaban para polipéptidos de 146 aminoácidos que fueron llamados OLE4, OLE5 y OLE 6, respectivamente.

60 Análisis de las secuencias

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron comparadas mediante el programa GCG con la secuen-

cia publicada anteriormente [(10)], encontrándose variabilidad en 35 posiciones, pero la mayoría de ellas se situaban en la tercera posición de cada codón, por lo que no afectaban a la secuencia de aminoácidos (Fig. 1). La comparación con la secuencia de aminoácidos obtenida por degradación de Edman del alergen natural purificado [(8)], se muestra en la figura 2. Apareció heterogeneidad en 13 posiciones pero manteniendo un alto porcentaje de cambios conservativos. Las secuencias OLE4 y OLE6 tenían sólo un cambio no conservativo con respecto a la natural (Gly¹²⁰ → Arg y Asn¹⁰⁸ → Ser, respectivamente) mientras de OLE5 presentaba dos cambios no conservativos (Asn⁹¹ → Asp y Thr⁹⁵ → Ile).

De acuerdo con la nomenclatura de alergenios aconsejada por la IUIS [(20) King, T., Hoffman, D., Lowenstein, H., Marsh, D., Platts-Mills, T., and Thomas, W. (1994). Allergen Nomenclature. Int. Arch. Allergy Immunol. 105, 224-233], las proteínas codificadas por los clones OLE4 y OLE6, son variantes de la proteína natural Ole e 1.0101 ya que sólo tienen variaciones menores en la secuencia. En base a esto debieran denominarse Ole e 1.0102 y Ole e 1.0103, respectivamente. Por el contrario, las diferencias en la secuencia entre OLE5 y el alergen natural son mayores del 5%, por lo que ambos alergenios deben ser considerados isoalergenios, y debería llamarse Ole e 1.05, según la denominación de isoformas descrita previamente [(21) Valenta, R., Ball, T., Vrtala, S., Duchêne, M., Kraft, D., and Scheiner, O. (1994). cDNA cloning and expression of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen profilin in *Escherichia coli*: comparison with birch pollen profilin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 199, 106-118].

Un resumen de las características fisicoquímicas puede encontrarse en la siguiente tabla:

Plásmido	ADNc	Alergeno	Masa molecular (kDa)	pI
pIO14	OLE4	Ole e 1.0102	16546	6.13
pIO15	OLE5	Ole e 1.05	16615	5.71
pIO16	OLE6	Ole e 1.0103	16420	5.71

Se compararon las secuencias de aminoácidos descritas en esta invención con proteínas existentes en el banco de datos que tuvieran cierta similitud. Estas proteínas encontradas fueron las siguientes, entre paréntesis se indica su número de acceso en la base de datos:

- * Proteína específica del polen de maíz (P33050).
- * Syr v 1, alergen mayor de *Syringa vulgare* (S43242).
- * Proteína específica del polen de arroz (S31710).
- * Proteína específica de anteras de tomate (P13447).
- * Proteína específica del polen de *Arabidopsis thaliana* (Z25693).

Se encontró una significativa homología, que se hacía mayor en ciertas regiones de la proteína. Así, existe una región de siete residuos (VYCDTCR), próxima al extremo N-terminal que se encontraba en todas las proteínas. Igualmente se encontraron un gran número de residuos conservados en todas (o la mayoría de las proteínas), que aparecen resaltados en negrita en la figura 3. La conservación, en posiciones equivalentes, de las seis cisteínas en cinco de las seis proteínas, indicaría que todas ellas pueden tener una estructura secundaria similar, y por lo tanto capacidad de compartir epítomos alérgicos.

Subclonación del gen que codifica para Ole e 1 en el vector de expresión pKN172

Los vectores recombinantes (2 µg) derivados del pBluescript fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *Hind*III y *Nde*I. El fragmento de 440 pb, que contenía el gen que codificaba para el alergen mayor del polen de olivo, fue separado por electroforesis en gel de agarosa y aislado del gel. Este fragmento fue ligado al vector de expresión pKN172, digerido con las mismas enzimas. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5α. Las colonias que portaban los plásmidos recombinantes fueron seleccionadas mediante una PCR analítica, en la cual se utilizó como molde una cantidad minúscula de la colonia. El ADN plasmídico de los clones positivos se analizó mediante endonucleasas de restricción, seleccionándose un clon que tuviera el fragmento deseado. Este plásmido se utilizó para transformar la cepa utilizada en la expresión *E. coli* BL21 (DE3) [(16)]. Esta cepa tiene en su cromosoma un lisógeno del fago λ conteniendo el gen de la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor lacUV. La selección y crecimiento de esta cepa se realizó rutinariamente en placas de LB conteniendo 200 µg/ml de ampicilina.

Expresión del gen que codifica para Ole e 1 en E. coli

E. coli BL21 (DE3) conteniendo el plásmido pIO25, que codificaba para el polipéptido Ole e 1.05 de *Olea europaea*, se creció en LB con 200 µg/ml de ampicilina a 37°C con agitación. A las 16 horas, se diluyó el cultivo hasta una densidad óptica de 0.3-0.4. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.6, se añadió 0.6 mM de IPTG. A las 3 horas de inducción, el cultivo se recogió por centrifugación a 4000 xg durante 5 minutos, y el sedimento, después de pesado, se congeló a -20°C. Las células se resuspendieron en 1/10 del volumen original, utilizando 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 y NaCl 100 mM. Alícuotas de las muestras, conteniendo aproximadamente 20 µg de proteína, se analizaron en SDS-PAGE 12.5 % y posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas fueron incubadas con antisuero antipolen de olivo procedente de conejo. Se detectó una, de unos 18 kDa, que era mucho más intensa que en el control de pKN172 sin inserto.

Subclonación del gen que codifica para Ole e 1 en el vector pGEX-4T-1

El plásmido pIO15 fue digerido con *EcoRI* y *XhoI* y el fragmento conteniendo OLE5 fue aislado por GeneClean, y ligado en los sitios *EcoRI*/*XhoI* del vector de expresión pGEX-4T-1. La mezcla de ligación fue usada para transformar células competentes de *E. coli* DH5α. Los plásmidos recombinantes, denominados pIO35, fueron seleccionados mediante aislamiento de su ADN y posterior análisis de restricción. Estos plásmidos codifican para una proteína de fusión (GST-Ole e 1.05) consistente en la proteína glutatión S-transferasa, una secuencia de 6 aminoácidos sitio de corte de la trombina y el polipéptido Ole e 1.05. Uno de los recombinantes se introdujo en la cepa de *E. coli* BL21 utilizada para la expresión.

Expresión de la fusión génica GST-Ole e 1 en E. coli

Cultivos de *E. coli* BL21 conteniendo pIO35 fueron crecidos a 37°C durante 16 h, posteriormente diluidos con medio LB conteniendo 100 µg/ml de ampicilina, hasta una absorbancia a 600 nm de 0.2. Las células se incubaron hasta una absorbancia de 0.6 e inducidas con 0.6 mM de IPTG. La expresión se llevo a cabo durante 3 horas más, y las células fueron centrifugadas a 4000 xg durante 10 min a 4°C. El análisis por BioImage de muestras de SDS-PAGE indicó que la proteína de fusión GST-Ole e 1 expresada en estas condiciones correspondía al 30 % de la proteína total del cultivo; proporción similar a cuando se expresaba la proteína GST solamente (Fig. 4). Esto indicaría que la proteína Ole e 1 fusionada, no altera la fisiología bacteriana, pudiéndose producir en altas concentraciones.

Purificación de Ole e 1 recombinante

El sedimento de células se resuspendió en 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM NaCl y se suplementó con 100 µg/ml de lisozima, incubándose a 37°C durante 20 min. El lisado fue centrifugado a 17000 rpm durante 20 min a 4°C. Se observó que la proteína de fusión aparecía mayoritariamente como forma insoluble en el precipitado. La solubilización se realizó por tratamiento con urea. El precipitado fue disuelto en glicina/NaOH 0.1 M pH 9.0 conteniendo 8 M de urea, y la urea fue eliminada mediante una columna de 10 ml de Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech), equilibrada en el mismo campón. La fracciones con proteína se suplementaron con 5 mM de DTT y se dejaron durante la noche a 4°C para que las proteínas desnaturalizadas se volvieran a plegar naturalmente. La solución proteica se incubó durante 16 h a 4°C con agitación moderada en presencia de Sepharosa-glutatión, previamente equilibrada con PBS más Tritón X-100 al 1 %. La mezcla se empaquetó en una columna que fue lavada tres veces con 10 volúmenes de PBS. La proteína de fusión fue eluida de la columna por adición de 1 ml de glutatión 10 mM en Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 (Fig. 5). La proteína eluida correspondiente a la fusión GST-Ole e 1.05 está purificada en más de un 90 %. Las fracciones conteniendo proteína de fusión fueron dializadas frente a Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 y liofilizadas. La proteína de fusión (GST-Ole e 1.05) se resuspendió en Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 5 mM y se digirió con 10 unidades de trombina bovina/mg de proteína durante 16 h a temperatura ambiente (Fig. 6). Como se aprecia en el carril 2, la digestión con trombina es total, apareciendo por separado las dos proteínas: GST (26 kDa) y Ole e 1 (18 kDa). Para separar ambas proteínas de la mezcla, se pasó nuevamente por una columna de agarosaglutatión, donde quedo unida la GST, mientras que el alergen recombinante pasaba libremente, obteniéndose de esta forma Ole e 1 recombinante de alta pureza.

Alternativamente la proteína unida a la columna se trato *in situ* con 50 unidades de trombina durante 16 h a temperatura ambiente, y posteriormente fue eluida con PBS.

Detección de Ole e 1 recombinante con antisueros de conejo frente a extracto de polen de olivo

Se corrieron en SDS-PAGE 12.5 %, diferentes muestras procedentes de los distintos pasos de la expresión y purificación de Ole e 1.05 recombinante, y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas conteniendo las proteínas transferidas, se incubaron con diluciones 1:3000 de suero de conejos inmunizados con extractos de polen de olivo. Después de los lavados, se incubaron con diluciones 1:1000 del anticuerpo anti-IgE humano conjugado a la enzima peroxidasa. La proteína de fusión detectada por este antisuero tien una masa molecular de 43 kDa, producto de la suma de la proteína GST y Ole e 1. El resto de las bandas que aprarecen son debidas a interacciones inespecíficas, ya que también aparecen en la muestra que no expresa la proteína de fusión (carril 1). La proteína GST no tiene reactividad con el antisuero, lo que indica que la señal encontrada pertenece sólo a la proteína recombinante Ole e 1. La figura 8 muestra la detección de Ole e 1 después de digerir con trombina.

Detección de la Ole e 1 recombinante con anticuerpos IgE procedentes de pacientes atópicos

Se separaron por SDS-PAGE las proteínas del extracto de polen de *Olea europaea* y Ole e 1.06 recombinante, y después de ser transferidas a membranas de PDVF, se incubaron con sueros de pacientes alérgicos a polen de olivo. El alergen recombinante mostró una reacción similar a las proteínas del extracto natural por las IgE del suero de los pacientes, como se puede observar en la figura 9. La doble banda observada en los extractos y en Ole e 1 natural es debida a las formas glicosiladas y sin glicosilar. La banda glicosilada suele tener mayor intensidad debido a la reacción con IgEs que reconocen epítomos glucídicos [(22) Batanero, E., Villalba, M., Monsalve, R., and Rodríguez, R. (1996). Cross-reactivity between the major allergen from olive pollen and unrelated glycoproteins: Evidence or an epitope in the glycan moiety of the allergen. J. Allergy Clin. Immunol. 97, 1264-1271].

La proteína recombinante difiere de la natural en que posee en su extremo amino-terminal seis aminoácidos extra, resultado del proceso de clonación (Gly-Ser-ProGlu-Phe-His-Met). Estos aminoácidos no interfieren en la capacidad de unir IgGs procedentes del suero de conejo inmunizado o IgEs procedentes de sueros de pacientes sensibilizados a olivo.

Identidad de epítomos entre la Ole e 1 natural y recombinante

Para estudiar si Ole e 1.05 de *Olea europaea* era idéntico a Ole e 1 natural, se realizaron experimentos de inhibición, tanto de epítomos desnaturalizados después de electroforesis (Western-inhibición), como de epítomos sin desnaturalizar (ELISA-inhibición).

Ensayos de Western-inhibición

Un pool de sueros de pacientes alérgicos a *Olea europaea* se incubó con 10 µg por ml de suero de las siguientes proteínas: Ole e 1 natural, aislada por electroelución; Ole e 1.05 recombinante, o profilina recombinante de *Olea europaea*. Como control negativo se utilizó BSA y como control positivo extracto proteico de *Olea europaea*. La adsorción se realizó durante toda la noche a 4°C con agitación moderada. Estos sueros se utilizaron para detectar reactividad con extractos proteicos de *Olea europaea* transferidos a PVDF. La figura 10 muestra que las IgE anti-Ole e 1 presentes en los sueros de los pacientes eran adsorbidas por Ole e 1 recombinante, ya que no eran capaces de detectar ninguna banda de 20-18 kDa correspondiente a Ole e 1. Si bien se observa que la inhibición con Ole e 1 natural produce unos immunoblots más claros, debido a que este alergen es capaz de unir IgEs específicos de epítomos glucídicos. Estos epítomos están bastante conservados en un gran número de organismos, como se ha descrito recientemente [(22)]. La inhibición con el extracto de *Olea europaea* produce, como era de esperar, immunoblots sin bandas de reacción debido a la unión por el extracto de la mayoría de los anticuerpos.

Ensayos de ELISA-inhibición

En la fase sólida se pegaron 5 µg de extracto de *Olea europaea* por pocillo en tampón bicarbonato 0.1 M, pH 9.6, y fueron bloqueados con tampón de bloqueo (PBS suplementado con 0.05 % de Tween 20 y 1 % de BSA). La fase líquida estaba compuesta por un pool de suero de pacientes alérgicos a polen de olivo (diluído 1:4), que se preincubó en presencia de diferentes proteínas: Ole e 1 natural, aislada por electroelución; Ole e 1.05 recombinante, o profilina recombinante de *Olea europaea*. Como control negativo se utilizó BSA y como control positivo extracto proteico de *Olea europaea*. La adsorción se realizó durante toda la noche a 4°C con agitación moderada. En la figura 11, se observa un efecto similar al observado con los ensayos de Western-inhibición. El alergen natural produce algo más de inhibición que el alergen recombinante, a concentraciones altas de proteína. Nuevamente esto puede ser debido a

la capacidad de la forma glicosilada del alérgeno natural de poder secuestrar IgEs anti epítomos glucídicos [(22)]. El alérgeno recombinante debido a que no se encuentra glicosilado no puede realizar esta función. La producción de alérgenos recombinantes glicosilados puede realizarse mediante la utilización de sistemas de expresión que produzcan glicosilación, como pueden ser expresión en levaduras o células animales (ambos contemplados en esta invención).

Reactividad cruzada de Ole e 1 con otros polenes de Oleaceas

La reactividad cruzada del polen de olivo con el de otros árboles de su misma Familia *Oleaceae* descrita previamente [(24) Kernerman, S., McCullough, J., Green, J., and Ownby, D. (1992). Evidence of cross-reactivity between olive, ash, privet, and Russian olive tree pollen allergens. *Ann. Allergy* **69**, 493-496] y [(25) Martín-Orozco, E., Cárdena, B., Del Pozo, V., De Andrés, B., Villalba, M., Gallardo, S., Rodríguez-García, M., Fernández, M., Alché, J., Rodríguez, R., Palomino, P., and Lahoz, C. (1994). *Ole e 1*: Epitope mapping, cross-reactivity with other *Oleaceae* pollens and ultrastructural localization. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **104**, 160-170], se observa claramente en los experimentos de inmunodetección realizados con diferentes extractos de oleaceas incubados con suero de un paciente alérgico a olivo (Fig. 12). Se pueden apreciar proteínas de 40 y 20 kDa que unen fuertemente IgEs, y que podrían ser monómeros y formas agregadas del alérgeno Ole e 1. Se aprecian igualmente proteínas de menor tamaño, que podrían tratarse de profilinas. La unión de IgEs a la proteína similar a Ole e 1 en el extracto de *Ligustrum vulgare* (Lig v 1), es menor, pero recientemente se ha visto que los alérgenos mayores de *Olea europaea* (Ole e 1), *Ligustrum vulgare* (Lig v 1) y *Syringa vulgare* (Syr v 1) tienen una alta identidad de secuencia [(23) Rodríguez, R., Villalba, M., Batanero, E., Monsalve, R., López-Otín, C., Lahoz, C., and González de la Peña, M.A. (1995). Allergens from olive tree and related species. In A. Basomba and J. Sastre, eds. (Bologna, Italy: Monduzzi Editore), pp. 671-677]. Como se observa en la figura 13, los perfiles de hidrofobicidad de Ole e 1 y Syr v 1, son casi idénticos, lo que ratifica los resultados obtenidos por inmunoblotting y comparación de secuencias, y apoya la posibilidad de utilizar el alérgeno recombinante descrito en esta invención como proteína útil para el diagnóstico y tratamiento de alergias a pólenes procedentes de otras plantas de la Familia *Oleaceae*.

Usos y administración

La presente invención cubre el uso del alérgeno mayor Ole e 1 de plantas de la familia *Oleaceae* o péptidos sintéticos derivados de él, para tratamientos de desensibilización en mamíferos. El método de desensibilización implica la administración repetida por vías parenteral (subcutánea, intravenosa o intramuscular), oral, nasal o rectal del alérgeno en cuestión. Este alérgeno puede ser tanto la proteína recombinante completa, como péptidos de la proteína que constituyan epítomos de células T para la población de pacientes alérgicos al polen de olivo. Estos (poli)péptidos pueden administrarse tanto solos como en combinación con otros diluyentes, de acuerdo con la legislación vigente y los procedimientos galénicos al uso. Un rango desde 1 picogramo a 10 miligramos por aplicación puede ser usado.

La presente invención también cubre la utilización de Ole e 1 recombinante para cualquier uso diagnóstico in vivo tales como: Prick test, intradermo-reacción o pruebas de Provocación, utilizando un rango desde 1 picogramo a 10 miligramos por aplicación. También cubre la utilización de Ole e 1 recombinante para diagnóstico in vitro mediante técnicas de: inmunoensayo, liberación de histamina y test de transformación linfoblástica, de degranulación de basófilos, etc.

Lista de secuencias

(1) SECUENCIA 1: SEQ ID NO:1

Fragmento de 441 nucleótidos de ADNc de OLE4 proveniente de ARNm de *Olea europaea*.

1	ATGGAGGATG	TTCCGCAACC	TCCTGTTTCT	CAATTCACA	TTCAGGGACA
51	AGTTTATTGT	GATACATGCC	GTGCTGGATT	CATTACTGAA	CTTAGCGAGT
101	TCATTCCAGG	TGCTAGTGTA	CGCCTCCAAT	GCAAAGACAA	GGAGAATGGA
151	GACGTAACAT	TTACTGAGAT	AGGTTACACG	AGAGCCGAAG	GACTCTATAG
201	CATGCTCGTG	GAACGTGATC	ACAAGAATGA	GTTCTGTGAA	ATCACACTAA
251	TTTCAAGTGG	CAGAAAAGAT	TGTAATGAAA	TTCCTACTGA	AGGATGGGCA
301	AAACCATCAT	TGAAATTTAT	ACTCAATACT	GTAAATGGCA	CCACACGCAC
351	CGTAAATCCT	CTTAGATTCT	ACAAGAAAGA	AGCTCTTCCA	AAATGTGCAC
401	AGGTCTATAA	TAAGTCTGGT	ATGTACCCGC	CCAACATGTA	A

ES 2 125 201 A1

(2) SECUENCIA 2: SEQ ID NO:2

Fragmento de 146 aminoácidos proveniente de la traducción de SEQ ID NO:1 (ADNc OLE4) de *Olea europaea*.

```

5          1  MEDVPQPPVS QFHIQQQVYC DTCRAGFITE LSEFIPGASV RLQCKDKENG
          51  DVTFTTEIGYT RAEGLYSMLV ERDHKNEFCE ITLISSGRKD CNEIPTGWA
          101  KPSLKFILNT VNGTTRTVNP LRFYKKEALP KCAQVYNKLG MYPPNM

```

(3) SECUENCIA 3: SEQ ID NO:3

Fragmento de 441 nucleótidos de ADNc de OLE5 proveniente de ARNm de *Olea europaea*.

```

15          1  ATGGAGGATG TTCCGCAACC TCCAGTTTCT CAATTCACAC TTCAGGCACA
          51  GGTATTATTGT GACACATGTC GTTCTCGATT CATTACTGAA CTTAGCGAGT
          101  TCATCCCAGG TGCCAGTGTA CGCCTCCAAT GCAGAGAAAA GGAGAATGGA
          151  GACATAACAT TTAAGTATGAT AGGTTACACA AGAGCAGAAG GACTCTATAG
          201  CATGCTCGTC GAACGTGATC ACAAGAACGA GTTTTGTGAA ATCAGACTGA
20          251  TTTCAAGTGG CAGAAAAGAT TGTGATGAAA TTCCTATTGA AGGATGGGCA
          301  AAACCATCAT TAAATTTTAT ACTCAATACA GTAAATGGCA CTACACGCAC
          351  CGTAAATCCT CTTGGCTTCT TCAAGAAAGA AGCTCTTCCA AAATGTGCAC
          401  AAGTCTATAA TAAGCTGGGT ATGTACCCGC CCAACATGTA A

```

(4) SECUENCIA 4: SEQ ID NO:4

Fragmento de 146 aminoácidos proveniente de la traducción de SEQ ID NO:3 (ADNc OLE5) de *Olea europaea*.

```

30          1  MEDVPQPPVS QFHIQQQVYC DTCRSRFITE LSEFIPGASV RLQCREKENG
          51  DITFTTEIGYT RAEGLYSMLV ERDHKNEFCE ITLISSGRKD CDEIPIEGWA
          101  KPSLKFILNT VNGTTRTVNP LGFFKKEALP KCAQVYNKLG MYPPNM

```

(5) SECUENCIA 5: SEQ ID NO:5

Fragmento de 441 nucleótidos de ADNc de OLE6 proveniente de ARNm de *Olea europaea*.

```

40          1  ATGGAGGATG TTCCGCAACC TCCTGTTTCT CAATTCACAC TTCAGGGACA
          51  AGTTTATTGT GATACATGCC GTGCTGGATT CATTACTGAA CTTAGCGAGT
          101  TCATTCCAGG TGCTAGTGTA CGCCTCCAAT GCAAAGACAA GGAGAATGGA
          151  GACGTAACAT TTAAGTATGAT AGGTTACACG AGAGCTGAAG GACTCTATAG
          201  CATGCTCGTG GAACGTGATC ACAAGAATGA GTTCTGTGAA ATCAGACTAA
45          251  TTTCAAGTGG CAGAAAAGAT TGTAATGAAA TTCCTACTGA AGGATGGGCA
          301  AAACCATCAT TGAAATTTAT ACTCAGTACT GTAAATGGCA CCACACGCAC
          351  TGTAATCCT CTTGATTCT ACAAGAAAGA AGCTCTTCCA AAATGTGCAC
          401  AAGTCTATAA TAAGCTGGGT ATGTACCCGC CCAACATGTA A

```

(6) SECUENCIA 6: SEQ ID NO:6

Fragmento de 146 aminoácidos proveniente de la traducción de SEQ ID NO:5 (ADNc OLE6) de *Olea europaea*.

```

55          1  MEDVPQPPVS QFHIQQQVYC DTCRAGFITE LSEFIPGASV RLQCKDKENG
          51  DVTFTTEIGYT RAEGLYSMLV ERDHKNEFCE ITLISSGRKD CNEIPTGWA
          101  KPSLKFILST VNGTTRTVNP LGFYKKEALP KCAQVYNKLG MYPPNM

```

REIVINDICACIONES

1. Moléculas de ADN recombinantes, **caracterizadas** porque codifican para un polipéptido que tiene al menos un epitopo del alérgeno mayor de *Olea europaea*.

2. Molécula de ADN recombinante, según la reivindicación 1, **caracterizada** por ser un fragmento de 441 nucleótidos de ADNc de OLE5 proveniente de ARNm de *Olea europaea* con la SEQ ID NO:3

3. Moléculas polipeptídicas recombinantes de alérgeno mayor de *Olea europaea* útiles para el diagnóstico y tratamiento convencional de alergias polínicas, **caracterizadas** porque contienen al menos un epitopo del alérgeno mayor de *Olea europaea*.

4. Molécula polipeptídica recombinante, según la reivindicación 3, **caracterizada** por ser un fragmento de 146 aminoácidos proveniente de la traducción de la SEQ ID NO:3 (ADNc OLE5) de *Olea europaea*, correspondiente a la SEQ ID NO:4

5. Un vehículo microbiano de expresión en un organismo hospedador transformado que sea autoreplacable y sirva para expresar el ADN de las reivindicaciones 1 y 2 para producir los polipéptidos indicados en las reivindicaciones 3 y 4.

6. Un organismo hospedador, tanto eucariota como procariota, transformador con el vehículo de expresión capaz, en dicho organismo, de autoreplacable y sirva para expresar el ADN de las reivindicaciones 1 y 2 para producir los polipéptidos indicados en las reivindicaciones 3 y 4.

7. Un organismo hospedador según la reivindicación 6, que puede ser *Escherichia coli*.

8. Un método para producir un polipéptido que contenga al menos un epitopo del alérgeno Ole e 1 y de otros similares de especies pertenecientes a la Familia Oleaceae, que implique el cultivo del organismo hospedador conteniendo el vehículo de expresión microbiano, que en el organismo mencionado se autoreplique y sirva para expresar el ADN de las reivindicaciones 1 y 2.

9. Un preparado que contenga un polipéptido con al menos un epitopo del alérgeno Ole e 1 y de otros similares de especies pertenecientes a la Familia Oleaceae mencionados, y producido por el método según la reivindicación 12.

10. Un preparado que contenga un polipéptido con al menos un epitopo del alérgeno Ole e 1 y de otros similares de especies pertenecientes a la Familia Oleaceae mencionados, y producido por síntesis química según las secuencias SEQ ID NOs: 4.

11. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1 a 4 para el diagnóstico "in vitro" de alergias.

12. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1 a 4, para la producción de vacunas destinadas al tratamiento convencional de alergias.

13. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1 a 4, para la producción de péptidos que constituyen epítomos de células T capaces de actuar como vacunas con actividad anergizante (supresora de la respuesta Th2).

14. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1 a 4, para la producción de isoformas recombinantes mutantes que no den lugar a fijación de IgE para el tratamiento de alergias, y por lo tanto tengan reducida su capacidad de producir efectos adversos.

ES 2 125 201 A1

```

1
Ole3 ATG GAG GAT GTT CCG CAA CCT CCA GTT TCT CAA TTT CAC ATT CAG GGA CA
OLE4 --- --- --- --- --- --- --- --T --- --- --- --- --- --- ---
OLE6 --- --- --- --- --- --- --- --T --- --- --- --- --- --- ---
OLE5 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

51
Ole3 G GTT TAT TGT GAT ACA TGC CGT GCT GGA TTC ATT ACT GAA CTT AGC GAG T
OLE4 A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
OLE6 A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
OLE5 - --- --- --- --C --- --T --- T-- --- --- --- --- --- --- ---

101
Ole3 TC ATC CCA GGT GCC AGT TTA CGC CTC CAA TGC AAA GAC AAG GAG AAT GGA
OLE4 -- --T --- --- --T --- G-- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
OLE6 -- --T --- --- --T --- G-- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
OLE5 -- --- --- --- --- --- G-- --- --- --- --- -G- --A --- --- ---

151
Ole3 GAC GTA ACA TTT ACT GAG GTA GGT TAC ACG AGA GCA GAA GGA CTC TAC AG
OLE4 --- --- --- --- --- --- A-- --- --- --- --- --C --- --- --- --T --
OLE6 --- --- --- --- --- --- A-- --- --- --- --- --T --- --- --- --T --
OLE5 --- A-- --- --- --- --- A-- --- --- --A --- --- --- --- --T --

201
Ole3 C ATG CTC GTG GAA CGT GAT CAC AAG AAT GAG TTC TGT GAA ATC ACA CTG A
OLE4 - --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --A -
OLE6 - --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --A -
OLE5 - --- --- --C --- --- --- --- --- --C --- --T --- --- --- ---

251
Ole3 TT TCA AGT GGC AGA AAA GAT TGT AAT GAA ATT CCT ACT GAA GGA TGG GTA
OLE4 -- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -C-
OLE6 -- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -C-
OLE5 -- --- --- --- --- --- --- --- G-- --- --- --- -T- --- --- --- -C-

301
Ole3 AAA CCA TCA TTA AAA TTT ATA CTC AAC ACA GTA AAT GGC ACC ACA CGC AC
OLE4 --- --- --- --G --- --- --- --- --T --T --- --- --- --- --- ---
OLE6 --- --- --- --G --- --- --- --- -GT --T --- --- --- --- --- ---
OLE5 --- --- --- --- --- --- --- --T --- --- --- --- --- --T --- ---

351
Ole3 C GTA AAT CCT CTT GGA TTT TTC AAG AAA GAA GCT CTT CCA AAA TGT GCA C
OLE4 - --- --- --- --- A-- --C -A- --- --- --- --- --- --- --- ---
OLE6 T --- --- --- --- --- --C -A- --- --- --- --- --- --- --- ---
OLE5 - --- --- --- --- --C --C --- --- --- --- --- --- --- --- ---

401
Ole3 AA GTC TAT AAT AAG TTG GGA ATG TAC CCG CCC AAC ATG TAA
OLE4 -G --- --- --- --- C-- --T --- --- --- --- --- --- --- ---
OLE6 -G --- --- --- --- C-- --T --- --- --- --- --- --- --- ---
OLE5 -- --- --- --- --- C-- --T --- --- --- --- --- --- --- ---

```

Fig. 1

ES 2 125 201 A1

	1				50
Ole e 1	MEDVPQPPVS	QFHIQGQVYC	DTCRAGFITE	LSEFIPGASL	RLQCKDKENG
	I		PSR	V	R I K
OLE4				V	
OLE5			SR	V	RE
OLE6				V	
	51				100
Ole e 1	DVTFTEVGYT	RAEGLYSMLV	ERDHKNEFCE	ITLISSGRKD	CNEIPTGWA
	S		I		
OLE4	 I ...				
OLE5	I I ...				D I
OLE6	 I ...				
	101				146
Ole e 1	KPSLKFKLNT	VNGTTRTVNP	LGFFKKEALP	KCAQVYNKLG	MYPPNM
	I	D	Y		
OLE4			R.Y		
OLE5					
OLE6	 S .		Y		

Fig. 2

ES 2 125 201 A1

	1				50
OLE6			MEDVP	QPPVSQ..FH	IQGQVYCDTC
Olee1c			MEDVP	QPPVSQ..FH	IQGQVYCDTC
OLE4			MEDVP	QPPVSQ..FH	IQGQVYCDTC
OLE5			MEDVP	QPPVSQ..FH	IQGQVYCDTC
Lila			EDVP	QPPIPQ..FH	IQGQVYCDTC
Lat52		MAKAIVLLSA	LCILALANFA	HCRPEV..FD	VEGKVYCDTC
Arabi		.AKLVMLLV	CILPAIVAAR	RGNIGKNTMV	VQGSTYCDIC
Rice	MASLR.....	TIPVIFGILF	YVLASTATAT	DA..PD..YV	VQGRVYCDTC
Zm13	MASVPAPATT	TAAVILC..L	CVVLSCAAAD	DPNLPD..YV	IQGRVYCDTC
					* *
	51				100
OLE6	RAGFIT.ELS	EFIPGASVRL	QCKDKENGDV	TFTEIGYTRA	EGLYSMLVER
Olee1c	RAGFIT.ELS	EFIPGASLRL	QCKDKENGDV	TFTEVGYTRA	EGLYSMLVER
OLE4	RAGFIT.ELS	EFIPGASVRL	QCKDKENGDV	TFTEIGYTRA	EGLYSMLVER
OLE5	RSRFIT.ELS	EFIPGASVRL	QCREKENGDI	TFTEIGYTRA	EGLYSMLVER
Lila	RARFIT.ELS	EFIPGASIRL	QCKDRENGKI	TFTEIGYTRA	EGLYSMLVEG
Lat52	RVQFET.KLS	ENLEGATVKL	QCRNISTEAE	TFSVEGVTDK	DGKYKLTVNG
Arabi	KFGFETPESS	YFIPGATVKL	SCKDRKTXEE	VYTDKAVSDK	EGKYKFIVHD
Rice	RAEFET.NVT	EYIKGAKVRL	ECKHFGTDKV	ERAIDGVTDK	TGTYKIELKD
Zm13	RAGFVT.NVT	EYIAGAKVRL	ECKHFGTGKL	ERAIDGVTDK	TGTYTIELKD
			*		
	101				150
OLE6	DHKNEFCEIT	LISSGRKDCN	EIPTEGWAKP	SLKFILN.TV	NGTTRTVNPL
Olee1c	DHKNEFCEIT	LISSGRKDCN	EIPTEGWAKP	SLKFILN.TV	NGTTRTVNPL
OLE4	DHKNEFCEIT	LISSGRKDCN	EIPTEGWAKP	SLKFILN.TV	NGTTRTVNPL
OLE5	DHKNEFCEIT	LISSGRKDCD	EIPTEGWAKP	SLKFILN.TV	NGTTRTVNPL
Lila	DHKNEFCEIT	LISSGREDCD	EIPVEGWAKP	SLKFILN.TV	NGTTRTVNPI
Lat52	DHENDICEVT	VVKSPREDCK	E.SVSGYEKA	RIECSDNVGI	HNAVRFANPL
Arabi	DHRDQMCDVL	LVKSSDKTCS	KISV.GREKS	RVILNHYSGI	ARRSDML...
Rice	SHEEDICEVV	LVHSPLANCS	EIEAE.RDRA	RVLLTRNVGI	CDNLRLANPL
Zm13	SHEEDICQVV	LVASPRKDCD	EVQAL.RDRA	GVLLTRNVGI	SDSLRPANPL
			*		
	151				176
OLE6	GFYKKEALPK	CAQVYNKLGM	YPPNM.		
Olee1c	GFYKKEALPK	CAQVYNKLGM	YPPNM.		
OLE4	RFYKKEALPK	CAQVYNKLGM	YPPNM.		
OLE5	GFYKKEALPK	CAQVYNKLGM	YPPNM.		
Lila	GFYKKEALPK	CTQVYNKLGM	YPPNM.		
Lat52	FFMKAESVQG	CKEALDELGL	FPLEF.		
Arabi					
Rice	GYLKDYHCP.	SAALLKQFDL	ADDNE		
Zm13	GYFKDVPLPV	CAALLKQLDS	DDDDQ		
			*		

Fig. 3

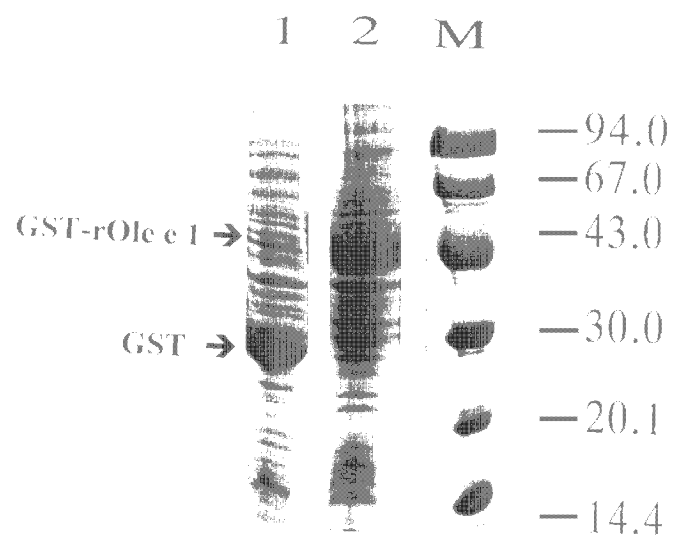


Fig. 4

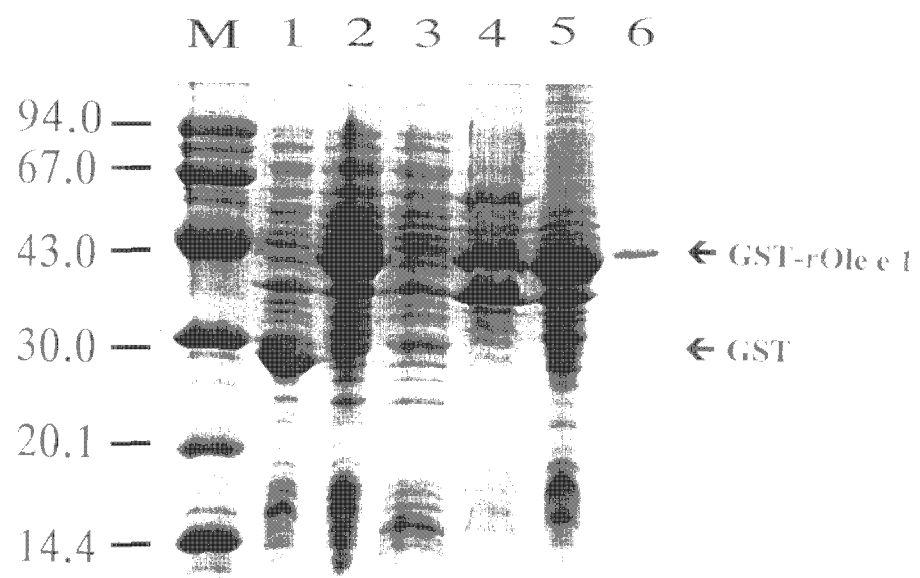
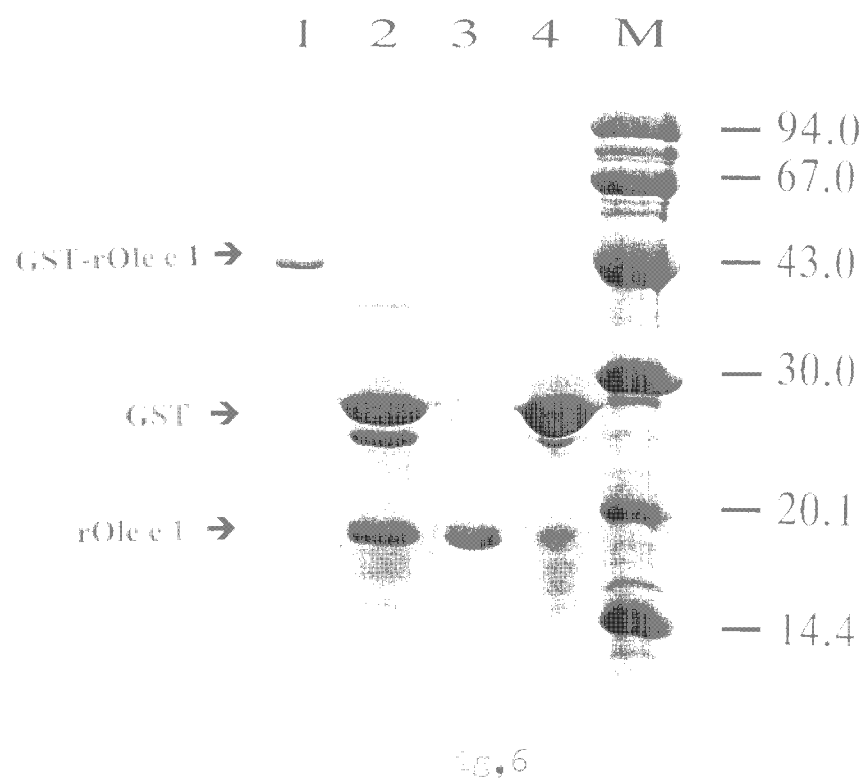


Fig.5



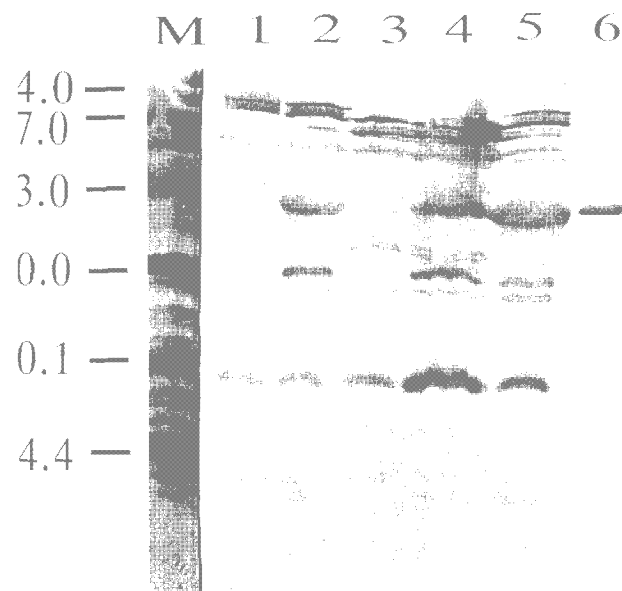
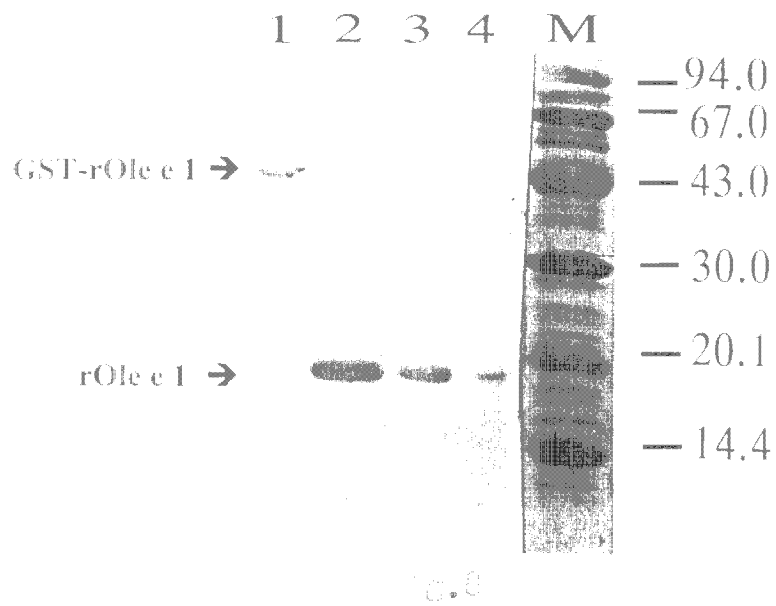


Fig.7



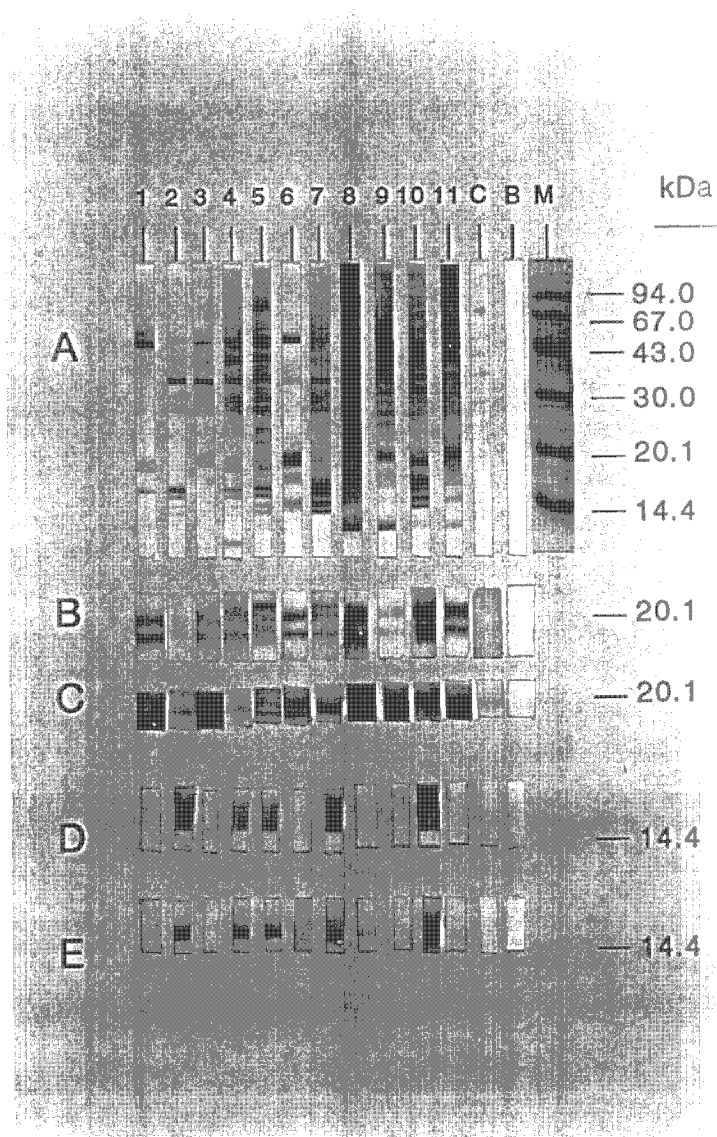


Fig.9

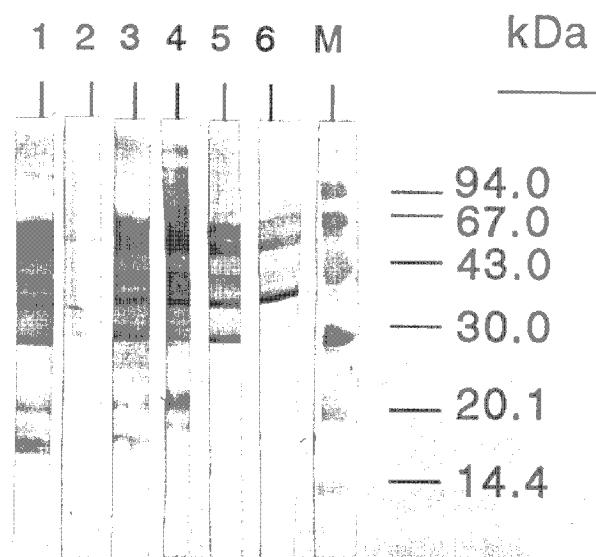


Fig. 10

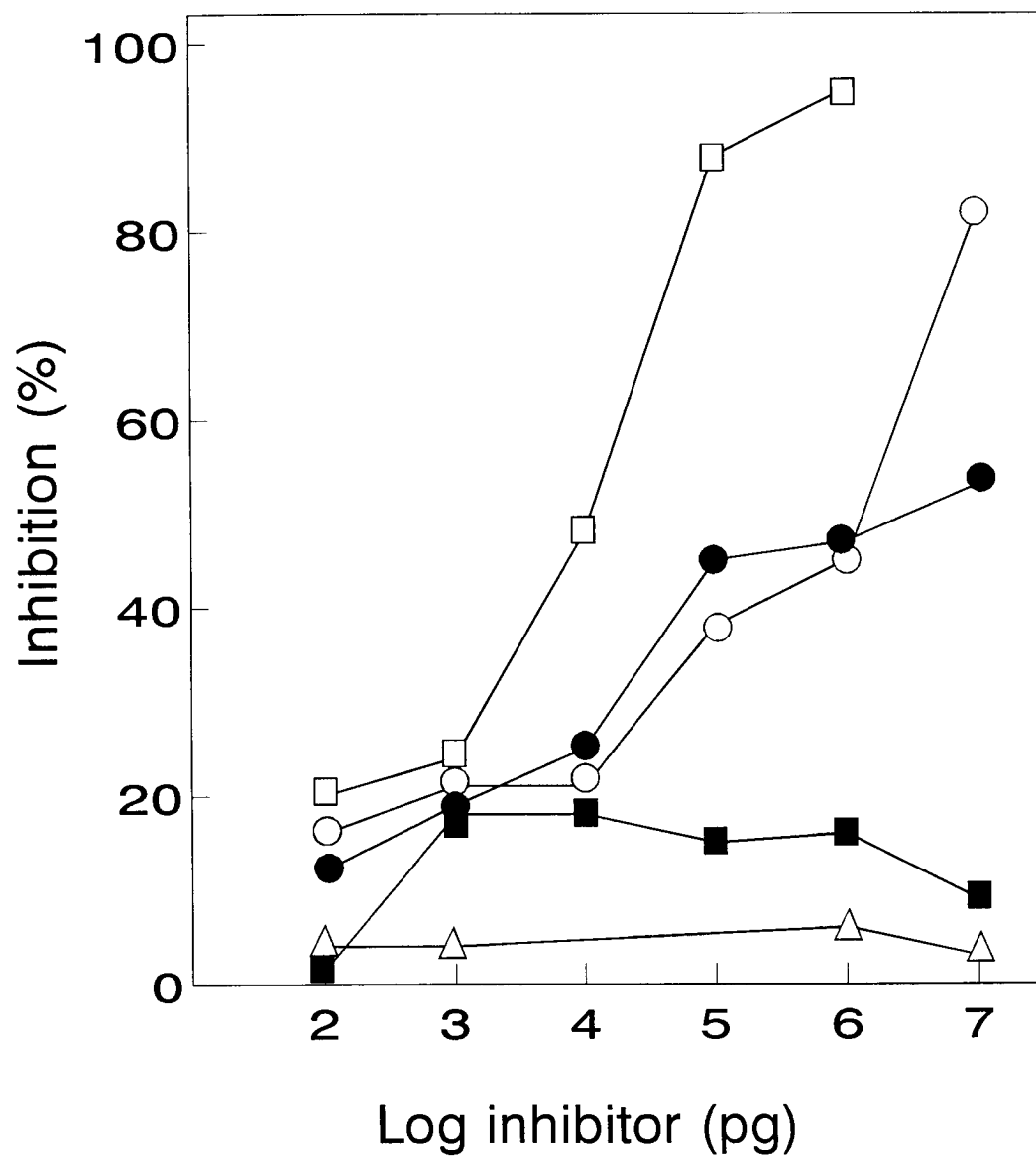


Fig. 11

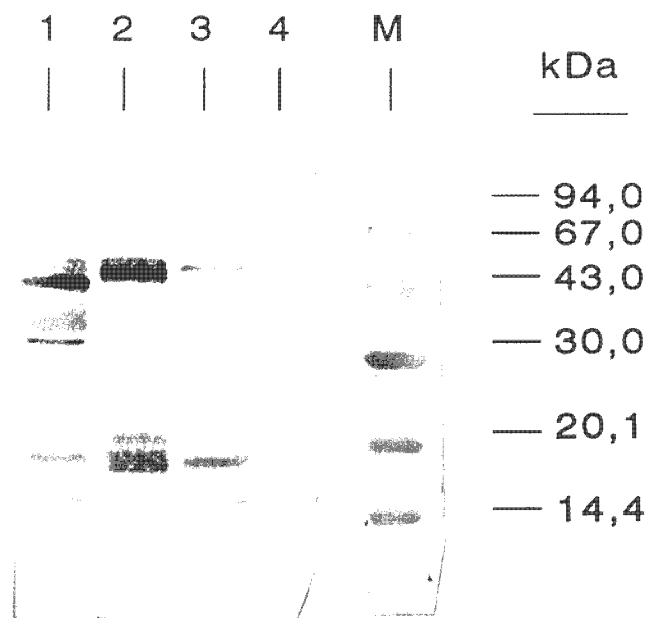


Fig.12

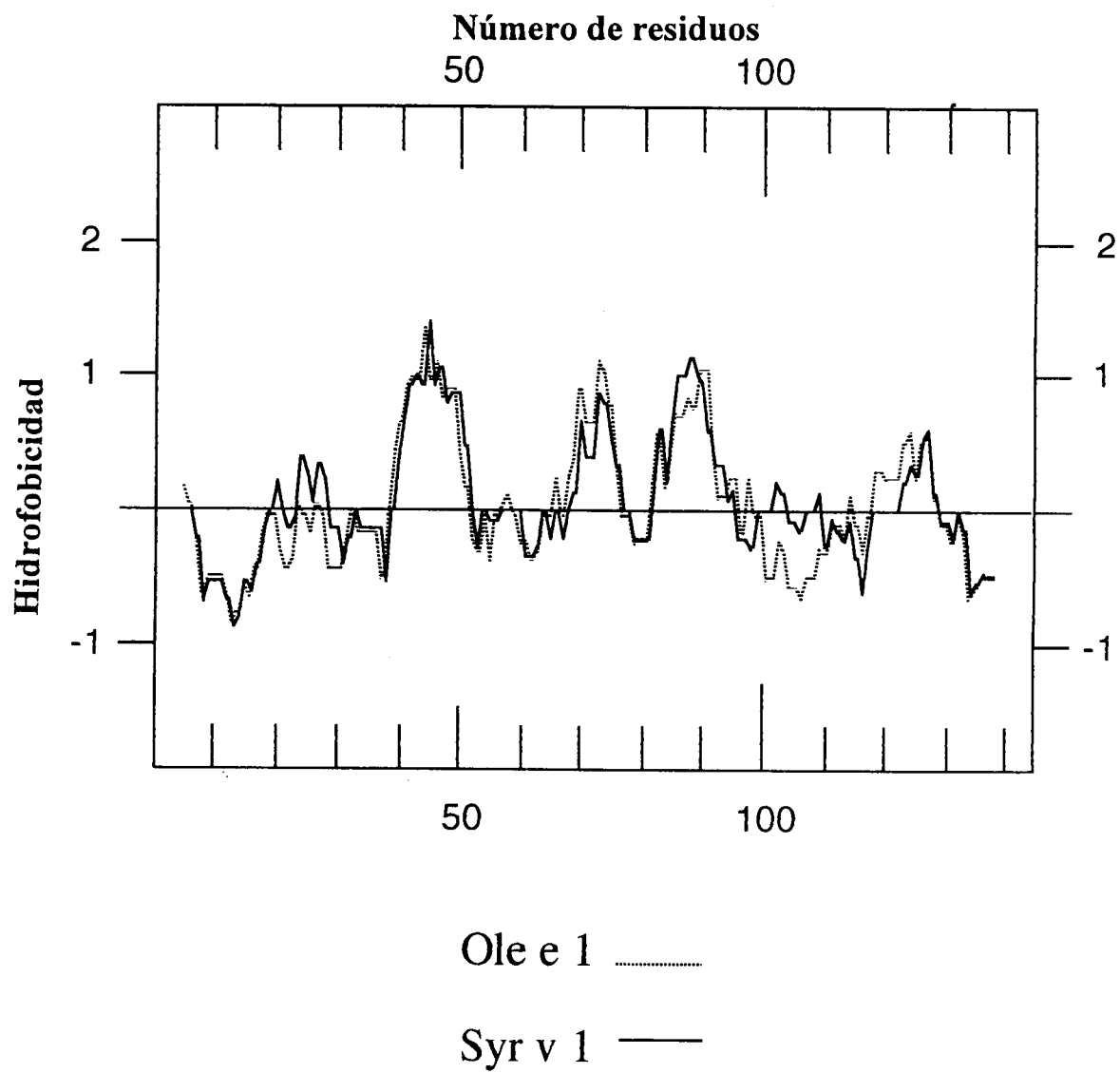


Fig. 13



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 125 201
⑫ N.º solicitud: 9701389
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **24.06.97**
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C12N15/29, 15/70, C07K14/415, G01N33/53, A61K39/36

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	VILLALBA, M. et al., "Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1994, Vol. 269, No. 21, págs. 15217-15222. Ver el documento completo	1-14
X	VILLALBA, M. et al., "The amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree (Olea europaea) pollen", EUR. J. BIOCHEM., 1993, Vol. 216, págs. 863-869. Ver el documento completo	3,4
Y	Ver el documento completo	1,2,5-14
X	VILLALBA, M. et al., "Isolation of three allergenic fractions of the major allergen from Olea europaea pollen and N-terminal amino acid sequence", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 1990, Vol. 172, No. 2, págs. 523-528. Ver el documento completo	3,4
Y	BATANERO, E. et al., "Isolation, cDNA cloning and expression of Lig v I, the major allergen from privet pollen", CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, 1996, Vol. 26, págs. 1401-1410. Ver el documento completo	1,2,5-14
A	BATANERO, E. et al., "Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from lilac pollen", EUR. J. BIOCHEM., 1994, Vol. 221, págs. 187-193. Ver el documento completo	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
12.01.99

Examinador
J.L. Vizán Arroyo

Página
1/2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 125 201
⑫ N.º solicitud: 9701389
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **24.06.97**
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C12N15/29, 15/70, C07K14/415, G01N33/53, A61K39/36

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9203551 A (BIOMAY BIOTECHNIK PRODUKTIONS & HANDELSGESELLSCHAFT) 05.03.1992 Ver todo el documento	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
12.01.99

Examinador
J.L. Vizán Arroyo

Página
2/2