

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 125 202**

(21) Número de solicitud: 009701390

(51) Int. Cl.⁶: C12N 15/29

C12N 15/70

C07K 14/415

G01N 33/53

A61K 39/36

(12)

PATENTE DE INVENCION

B1

(22) Fecha de presentación: **24.06.1997**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.1999**

Fecha de concesión: **13.10.1999**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **16.03.2000**

(45) Fecha de publicación del folleto de patente:
16.03.2000

(73) Titular/es: **Bial Industrial Farmacéutica, S.A.**
Alameda de Urquijo, 20-27
48008 Bilbao, Vizcaya, ES

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

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

(54) Título: **ADN recombinante que codifica para epítomos del alérgeno profilina útil para el diagnóstico y tratamiento de alergias.**

(57) Resumen:

ADN recombinante que codifica para epítomos del alérgeno profilina útil para el diagnóstico y tratamiento de alergias.

Las moléculas de ADN recombinante codifican para un polipéptido que tiene al menos un epítopo del alérgeno profilina de plantas seleccionadas del grupo formado por *Cynodon dactylon*, *Phleum pratense*, *Parietaria judaica*, *Helianthus annuus*, *Olea europaea* y *Mercurialis annua*.

El polipéptido se obtiene cultivando un organismo hospedador conteniendo el vehículo de expresión microbiano correspondiente.

Aplicación en el tratamiento y diagnóstico de determinadas alergias.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 125 202 B1

DESCRIPCION

ADN recombinante que codifica para, epitopos del alérgeno profilina, 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 panalérgeno profilina, presente en un gran número de pólenes de plantas, y causante de numerosas reacciones cruzadas entre pólenes y con respecto a alimentos de origen vegetal. En la presente invención se obtienen moléculas de ADN recombinante que codifican para un polipéptido que tiene al menos un epitopo del alérgeno profilina, de una serie de plantas pertenecientes a los grupos de hierbas, malezas y árboles no fagales. En particular a las plantas *Cynodon dactylon*, *Pheleum pratense*, *Parietaria judaica*, *Helianthus annuus*, *Olea europaea*, y *Mercurialis annua*. Todas ellas son plantas con amplia distribución en la Península Ibérica y los pólenes producidos por ellas se encuentran entre los agentes etiológicos de enfermedades alérgicas más importantes en dicho ámbito geográfico. Se describen también métodos de producción de estos polipéptidos recombinantes en sistemas de expresión heterólogos. También se describen eficientes métodos para la purificación de la profilina, tanto si es producida como proteína soluble o como insoluble.

20 **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 (enzymelinked 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. La aplicación de las técnicas del ADN recombinante ha llevado al aislamiento de un gran número de proteínas con características alérgicas [(3) Stewart, G. (1995). *The molecular biology of allergens*. In *Asthma and Rhinitis*. W. Busse and S. Holgate, eds. (Boston: Backwell Scientific Publications), pp. 898-932].

Las profilinas constituyen una ubicua familia de proteínas implicadas en la unión a actina, y que se encuentran en el citoesqueleto de organismos eucariotas [(4) Haarer, B. and Brown, S. (1990). *Structure and function of profilin*. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 17, 71-74; y (5) Theriot, J.A. and Mitchison, T.J. (1993). *The three faces of profilin*. *Cell* 75, 835-838]. Otras funciones adicionales de la profilina han sido reseñadas con anterioridad en la literatura [(6) Machesky, L. and Pollard, T. (1993). *Profilin as a potential mediator of membrane-cytoskeleton communication*. *TIBS* 3, 381-385; y (7) Aderen, A. (1992). *Signal transduction and the actin cytoskeleton*. *TIBS* 17, 438-443]. Las profilinas son prominentes alérgenos que pueden ser aislados de pólenes de árboles, hierbas y malezas, así como de algunos alimentos [(8) Valenta, R., Duchêne, M., Ebner, C., Valent, P., Sillaber, C., Deviller, P., Ferreira, F.,

Tejkl, M., Edelmann, H., Kraft, D., and Scheiner, O. (1992). Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J. Exp. Med.* 175, 377-385; (9) Ebner, C., Hirschwehr, R., Bauer, L., Breiteneder, H., Valenta, R., Ebner, H., Kraft, D., and Scheiner, O. (1995). Allergens, IgE, mediators, inflammatory mechanisms. *J. Allergy Clin. Immunol.* 95, 962-969; (10) Valenta, R., Duchêne, M., Pottenburger, K., Sillaber, C., Valent, P., Bettelheim, P., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D., and Scheiner, O. (1991). Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science* 253, 557-560; (11) van Ree, R., Fernández-Rivas, M., Cuevas, M., van Wijngaarden, M., and Aalberse, R. (1995). Pollen-related allergy to peach and apple: An important role for profilin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 95, 726-734; y (12) Vieths, S., Jankiewicz, A., Wütrich, B., and Baltes, W. (1995). Immunoblot study of IgE binding allergens in celery roots. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 75, 48-55]. Se ha encontrado que pacientes alérgicos a profilina constituyen el 20% de individuos alérgicos a polen [(8)]. Estudios posteriores detectaron reactividad de la profilina de polen de girasol en el 28% de los sueros de pacientes alérgicos a esta planta compuesta [(13) Jiménez, A., Moreno, C., Martínez, J., Martínez, A., Bartolomé, B., Guerra, F., and Palacios, R. (1994). Sensitization to sunflower pollen: only an occupational allergy? *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105, 297-307]. La disponibilidad de este panalérgeno como una proteína recombinante permitiría la caracterización a nivel molecular las regiones implicadas en las reacciones antigénicas, y su uso en diagnóstico y tratamiento de pacientes alérgicos.

El banco de datos SWISS-Prot contiene un gran número de secuencias que codifican para profilinas, de las cuales sólo 10 pertenecen a 6 especies de plantas relacionadas con procesos alérgicos. Estas profilinas clonadas proceden de *Betula verrucosa* (abedul), llamada Bet v 2 [(10)]; *Triticum aestivum* (trigo), clonadas tres isoformas [(14) Rihs, H., Rozynek, P., May-Taube, K., Welticke, B., and Baur, X. (1994). Polymerase chain reaction based cDNA cloning of wheat profilin: a potential plant allergen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105, 190-194]; *Pheleum pratense* [(15) 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]; *Zea mays* (maíz), clonadas tres isoformas [(16) Staiger, C., Goodbody, K., Hussey, P., Valenta, R., Drobak, B., and Lloyd, C. (1993). The profilin multigene family of maize: differential expression of three isoforms. *Plant J.* 4, 631-641]; *Phaseolus vulgaris* (alubia) [(17) Vidali, L., Pérez, H.E., Valdés, V., Noguez, R., Zamudio, F., and Sánchez, F. (1995). Purification, characterization, and cDNA cloning of profilin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 108, 115-123], y *Hordeum vulgare* (cebada) (número de acceso a EMBL Data Bank: U49505).

En el presente estudio se han clonado por primera vez distintas secuencias, que codifican para profilinas de las siguientes especies: *Cynodon dactylon*, *Pheleum pratense*, *Parietaria judaica*, *Helianthus annuus*, *Olea europaea* y *Mercurialis annua*. Estas secuencias codifican para unos polipéptidos de unos 14 kDa, identificados como profilinas en base a: i) Gran similitud con otras profilinas estudiadas. ii) Reactividad frente a sueros obtenidos de conejos inmunizados con profilina purificada a homogeneidad de *Helianthus annuus*. iii) Capacidad de unirse a poli-L-prolina. iv) Reactividad con IgE de sueros de pacientes alérgicos a profilinas. Igualmente se presentan resultados sobre la reactividad cruzada de la profilina con alérgenos comunes relacionados y no relacionados filogenéticamente.

Descripción detallada de la invención

La invención, tal y como se indica en su enunciado se refiere a moléculas de ADN recombinante que codifican para epítomos del alérgeno profilina de *Cynodon dactylon*, *Pheleum pratense*, *Parietaria judaica*, *Helianthus annuus*, *Olea europaea* y *Mercurialis annua*; y a su aplicación para el diagnóstico y tratamiento de alergias.

Descripción de las plantas utilizadas como materia prima

La clonación de la profilina se ha realizado del polen de plantas del tipo hierbas, malezas o árboles. La calidad de los pólenes ha sido controlada para que no contuvieran más del 0.1% de pólenes contaminantes u otras partes de la planta o fragmentos vegetales. Las plantas de las cuales proceden los pólenes son las siguientes:

* Las gramíneas (hierbas), pertenecientes a la Familia *Gramineae*, concretamente:

- *Cynodon dactylon*, llamada en inglés "Bermuda grass", y que pertenece a la subfamilia *Panicoidae* y tribu *Chlorideae*.
- *Pheleum pratense*, llamada en inglés "timothy grass", y que pertenece a la subfamilia *Pooideae*, grupo *Festuciformes* y tribu *Festuceae*.

* Las malezas:

- *Parietaria judaica*, llamada en inglés “wall pellitory”, y que pertenece a la familia *Urticaceae*.
- *Helianthus annuus*, llamada en inglés “sunflower”, y que pertenece a la familia *Compositae*, subfamilia *Tubiflorae*, y tribu *Heliantheae*.
- *Mercurialis annua*, que pertenece a la familia *Euphorbiaceae*

* El árbol, *Olea europaea*, llamado en inglés “olive tree”, perteneciente a la familia *Oleaceae*.

Clonación y secuenciación de genes que codifican para profilinas

La clonación de genes puede realizarse utilizando diversos métodos [(18) Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 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 utilizando diferentes técnicas: 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 diversas fuentes, 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 degenerados, obtenidos por comparación de la secuencia de aminoácidos de todas las profilinas vegetales descritas en el apartado de “estado de la técnica”. 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 400 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 pBluescript (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 [(19) 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 la profilina, y que existía una gran homología con otras profilinas descritas.

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 la profilina para formar una proteína no fusionada utilizando el vector de expresión pKN172 [(20) 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]. La expresión en este plásmido se basa en la interacción de la ARN polimerasa del fago T7 con un promotor específico del mismo fago (promotor del gen $\phi 10$), 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) [(21) 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. El IPTG se añadió, a concentraciones entre 0.6-1 mM, a un cultivo crecido en medio nutritivo (LB ó TB) con ampicilina (100-200 mg/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 $\phi 10$. El cultivo se recogió entre 3-6 horas después de la inducción.

Purificación de la profilina recombinante

El método de purificación de la profilina se basa en la capacidad que ésta tiene para unirse a cadenas de L-prolina. La purificación se realizó en un sólo paso mediante cromatografía de afinidad en columna de Sepharose-poli-L-prolina, según describe Lindberg [(22 Lindberg, U., Schutt, C., Hellsten, E., Tjäder, A., and Hult, T. (1988). The use of poly(L-proline)-Sepharose in the isolation of profilin and profilactin complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 967, 391-400]. Esta resina es una agarosa comercial (Pharmacia Biotech) activada con bromuro de cianógeno (CNBr) a la cual se unen covalentemente péptidos de prolina (Poli-L-prolina) de al menos 5 kDa. Cuando la proteína recombinante no está en forma soluble se debe tratar con 8 M de urea o una mezcla de los detergentes sarcosil/triton X-100, para que pueda ser aplicada a la columna de Sepharose-poli-L-prolina. La profilina pegada específicamente a esta resina, es eluida de la columna mediante 6 M urea, y dializada extensivamente. De esta forma se obtiene una profilina recombinante de gran pureza (>95 %) y en grandes cantidades (10-50 mg/litro de cultivo).

*Aislamiento de la profilina de girasol (*Helianthus annuus*) y su secuenciación proteica*

Se purificó la profilina de girasol (*Helianthus annuus*) mediante cromatografía resolutive desarrollada en dos fases. La proteína así purificada fue identificada como profilina mediante ensayos fisiológicos (unión con poly-L-prolina), bioquímicos (parámetros moleculares y secuencia de aminoácidos) e inmunoquímicos (SDS-PAGE Immunoblottings). Se obtuvieron pesos moleculares de 15.7 kDa en SDS-PAGE y de 19.1 kDa en cromatografía SMARTTM (lo que indica su naturaleza monomérica), así como un pI de 4.5-4.4 (tres isoformas). Se determinó la composición de aminoácidos y la secuencia parcial de la proteína purificada. Seis péptidos internos que fueron secuenciados confirman su identidad profilínica y muestran el mayor grado de similitud con los péptidos de polen de *Zea mays* y semilla de *Phaseolus vulgaris*. Con el fin de evaluar la presencia de proteínas de naturaleza profilínica en un grupo de aeroalérgenos y alérgenos alimentarios, se obtuvo y empleó un antisuero policlonal anti-profilina. Estos resultados se discuten de modo preliminar.

En resumen, esta invención proporciona ADN recombinante que codifica para profilina de un gran número de plantas, tanto hierbas, malezas y árboles. Igualmente proporciona un sistema de expresión microbiano (*E. coli*) para la obtención de grandes cantidades de profilina. Esta expresión puede realizarse en otros sistemas microbianos (*Pseudomonas*, *Bacillus*) o eucarióticos (levaduras o células de insectos). La profilina producida puede ser procesada por tres métodos diferentes, para finalmente ser purificada mediante un sólo paso de cromatografía de afinidad en Sepharose-poli-L-prolina. La profilina purificada por este método no difiere en sus propiedades de unión a IgE de las profilinas naturales. Igualmente se describe la purificación y caracterización completa de la profilina de girasol (*Helianthus annuus*).

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 alérgenos, y a que algunos alérgenos menores, como la profilina están poco representados o parcialmente degradados [(23) Susani, M., Jertschin, P., Dolecek, C., Sperr, W., Valent, P., Ebner, C., Kraft, D., Valenta, R., and Scheiner, O. (1995). High level expression of birch pollen profilin (Bet v 2) in *Escherichia coli*: purification and characterization of the recombinant allergen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 250-263], 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. Los alérgenos recombinantes, profilinas, descritos en esta invención, permiten el diagnóstico de alergias polínicas en las cuales se encuentra implicada la profilina, que son aproximadamente un 20 % del total de alergias a polen [(8)].

Los ADN recombinantes que codifican para los alérgenos profilínicos objeto de la presente invención pueden servir no sólo para la obtención de alérgenos recombinantes útiles para el diagnóstico y tratamiento convencional de alergias, sino también para dos potenciales usos:

- a) Producción de péptidos a partir de dichos alérgenos, que constituyan epítopos de células T, y que por tanto puedan ser vacunas con actividad anergizante (supresora de respuesta Th2).
- b) Obtención de isoformas recombinantes mutantes que no den lugar a fijación de IgE, y que por tanto constituyan tratamientos con reducida capacidad de producción de efectos adversos.

Deposito de las cepas

Las cepas más importantes que se mencionan en la presente solicitud han sido depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo de la Universidad de Valencia, correspondiéndoles los siguientes
5 nos. de orden.

<i>Escherichia coli</i>	CdPRO1 — CECT 4872
<i>Escherichia coli</i>	PjPRO1 — CECT 4873
<i>Escherichia coli</i>	OePRO1 — CECT 4874
<i>Escherichia coli</i>	MaPRO1 — CECT 4875
<i>Escherichia coli</i>	HaPRO2 — CECT 4876
<i>Escherichia coli</i>	PpPRO3 — CECT 4877

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Secuencia de ADNc del gen de la profilina de *Cynodon dactylon*. La secuencia de aminoácidos deducida se muestra debajo de la secuencia de ADN.

Figura 2: Secuencias de ADNc del gen de la profilina (OePRO1) de *Olea europaea* y secuencia de aminoácidos deducida. Las secuencias del ADNc de OePRO2 y OePRO3 situadas debajo de la secuencia principal de OePRO1, indican sólo los cambios existentes con ésta, tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos.

Figura 3: Secuencias de ADNc del gen de la profilina (PpPRO2) de *Pheleum pratense* y secuencia de aminoácidos deducida. La secuencia del ADNc de PpPRO3 situada encima de la secuencia principal de PpPRO2, indica sólo los cambios existentes con ésta, tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos.

Figura 4A: Secuencias de ADNc del gen de la profilina (PjPRO1) de *Parietaria judaica* y secuencia de aminoácidos deducida. La secuencia del ADNc de PjPRO2 situada encima de la secuencia principal de PjPRO1, indica sólo los cambios existentes con ésta, tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos.

Figura 4B: Secuencia de ADNc del gen de la profilina (MaPRO1) de *Mercurialis annua* y secuencia de aminoácidos deducida.

Figura 5: Secuencias de ADNc del gen de la profilina (A) y la secuencia de aminoácidos deducida (B) (HaPRO1, HaPRO2, HaPRO3, HaPRO4, HaPRO5 y HaPRO6) de *Helianthus annuus*. Los guiones indican que la secuencia es idéntica a la mostrada en la parte superior.

Figura 6: Comparación de las secuencias deducidas de aminoácidos de las profilinas de plantas descritas en esta invención con otras secuencias de profilinas de plantas obtenidas en las bases de datos (Swiss-Prot, EMBL, Gene-Bank).

Figura 7: Comparación de las secuencias deducidas de aminoácidos de las profilinas de plantas descritas en esta invención con otras profilinas procedentes de organismos no vegetales. Los residuos idénticos en >90 % de las secuencias han sido marcados con un asterisco. Los números de acceso a la EMBL Data Bank son: Humana I, J03191; Humana II, L10678; *Acanthamoeba*, M38038; *Saccharomyces cerevisiae*, L22204 y *Tetrahymena pyriformis*, D00813.

Figura 8: SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie del proceso de purificación de la profilina CdPRO1 de *Cynodon dactylon*. Carriles 1 y 2, lisado de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo pKN172 sin inserto y con el inserto CdPRO1, respectivamente; carriles 3 y 4, fracciones insoluble y soluble de la muestra del carril 2, respectivamente; carril 5, fracción no retenida en la columna Sepharose-PLP; carril 6, profilina recombinante purificada como elución de urea 6M de la columna de Sepharose-PLP; carril 7, profilina natural purificada.

Figura 9: PAGE teñida con azul de Coomassie del proceso de purificación de la profilina OePRO1 de *Olea europaea*. Carriles 1 y 2, lisado de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo pKN172 sin inserto y con el inserto OePRO1, respectivamente; carriles 3 y 4, fracciones insoluble y soluble de la muestra del carril 2, respectivamente; carril 5, fracción no retenida en la columna Sepharose-PLP; carril 6, lavado de la columna con 2 M de urea; carril 7, profilina recombinante purificada como elución de urea 6M de la columna de Sepharose-PLP; carril 8, profilina natural purificada.

Figura 10: SDS-PAGE teñida con plata de la profilina purificada CdPRO1 de *Cynodon dactylon*. Carriles 1 y 4, profilina recombinante purificada por Sepharose-PLP, 3 y 0.5 mg, respectivamente; carril 2, profilina natural purificada; carril 3, lisado de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo pKN172 con el inserto CdPRO1.

Figura 11: Inmunodetección de profilina recombinante de *Cynodon dactylon* utilizando anticuerpos policlonales antiprofilina. La descripción del gel es idéntica a la descrita en la figura 8.

Figura 12: Inmunodetección de profilina recombinante de *Olea europaea* utilizando anticuerpos policlonales antiprofilina. La descripción del gel es idéntica a la descrita en la figura 9.

Figura 13: Comparación por inmunodetección de la reactividad de IgE procedente de suero de pacientes alérgicos a *Cynodon dactylon* o gramíneas. Se transfirieron proteínas del extracto de *Cynodon dactylon* (E) y profilinas recombinantes purificadas (R y P) y se incubaron con sueros de pacientes (1-8) alérgicos a *Cynodon dactylon*, pool de sueros de alérgicos a gramíneas (G) y de individuos sanos (C).

Figura 14: Inhibición de inmunodetección. Extractos proteicos (E), profilina natural purificada (P) y recombinante purificada (R) de *Cynodon dactylon* 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 *Cynodon dactylon* inhibidos con 10 µg de profilina recombinante (c) o BSA (b) por ml de suero, o sin inhibir (a). Como control se utilizó un pool de sueros de individuos sanos (c).

Figura 15: Simulación de la estructura tridimensional de la profilina PpPRO3 de *Pheleum pratense* y localización de las diferentes regiones en las que se enmarcan los péptidos antigénicos propuestos.

Figura 16: Estructura de los tres péptidos con mayor posibilidades de antigenicidad. La numeración corresponde a la secuencia de aminoácidos en PpPRO3 de *Pheleum pratense*.

Figura 17: SDS-PAGE de la fracción de profilina eluída tras la cromatografía de afinidad (carril 2), extracto completo de polen de girasol (carril 3) y el mismo extracto desprovisto de la fracción de profilina (carril 1).

Figura 18: Cromatografía de SMART realizado mediante gel filtración en columna Superdex 75 PC3.2/30 correspondiente a la fracción de profilina de *Helianthus annuus* obtenida por cromatografía de afinidad.

Figura 19: IEF (pH 3-10) de profilina obtenida tras cromatografía de filtración en gel.

Figura 20: Secuencia de aminoácidos deducida (HaPRO1, HaPRO2, HaPRO3, HaPRO4, HaPRO5 y HaPRO6) de *Helianthus annuus*. Los guiones indican que la secuencia es idéntica a la mostrada en la parte superior. En negrita se indican los resultados de la secuenciación parcial de la profilina purificada de *H. annuus*; los asteriscos indican que la secuencia es idéntica a la mostrada en la parte superior.

Figura 21: Inmunodetección de profilina purificada de girasol incubada con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a polen de gramíneas (carril 1), de girasol (carril 2) y frutos de *Rosaceas* (carril 3).

Figura 22: Inmunodetección de extracto de polen de abedul (carril 1) y extractos de piel de manzana (carril 2), de melocotón (carril 3) y pera (carril 4), incubados con antisuero anti-profilina de girasol.

Figura 23: Inmunodetección de extracto de polen de girasol (carril 1), *Pheleum pratense* (carril 2), caspa de perro (carril 3), *Parietaria judaica* (carril 4), *Dermatophagoides pteronyssinus* (carril 5), *Olea europaea* (carril 6), *Mercurialis annua* (carril 7), *Alternaria alternata* (carril 8), *Aspergillus fumigatus* (carril 9), *Penicillium notatum* (carril 10), y estambres de azafrán (carril 11), incubados con antisuero anti-profilina de girasol.

Modos de realización de la invención

La invención puede ser entendida a partir de los siguientes ejemplos, que no deben considerarse en absoluto limitativos de la misma.

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 [(18)].

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 3 M 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 [(18)].

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 [(18)]. 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 10 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*

Las cepas de *E. coli* DH5α o BL21 (DE3) fueron utilizadas en la mayoría de los experimentos. El ADN fue introducido mediante el protocolo del cloruro calcico, como se describe en [(18)], páginas de 1.76 a 1.84, o mediante el método del cloruro de rubidio, como describe Hanahan [(24) 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 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 presencia de los plásmidos deseados mediante un protocolo rápido de aislamiento de plásmidos. Este protocolo está descrito en las páginas 1.25 a 1.28 de la referencia de Sambrook [(18)].

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

Se siguió básicamente la técnica descrita por Laemmli [(25) Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 277, 680-685], utilizando un aparato de electroforesis MINI-PROTEAN (Bio-Rad, Hercules, 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 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

Se realizó por el método de Shen y cols. con modificaciones [(26) 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 % en PBS: al cual llamaremos a partir de ahora leche/PBS). La membrana es entonces incubado 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 proviene de humanos. La membrana es nuevamente lavado en PBS, y teñido 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.

Preparación de la columna de Sepharosa poli-L-prolina

El primer paso en la purificación de la profilina se realizó mediante cromatografía de afinidad en la columna de Sepharosa activada con CNBr y acoplada a PLP, de acuerdo con Lindberg et al. [(22)]. Este método, en resumen, consiste en humedecer 2 g de Sepharose 4B activada con CNBr (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) en 100 ml de HCl 1mM durante 15 minutos. A continuación, la resina fue lavada a través de un embudo filtrante (porosidad G3) al que se añadió cuatro veces consecutivas 100 ml de HCl 1mM. El gel resultante (unos 7 ml) fue resuspendido en el tampón (KHCO₃, 0.1 M, pH 8.3, KCl 0.5 M); después, se disolvieron 30 mg de Poly-L-proline (PLP, Mr 5000, INC Biochemicals, Aurora, OH, USA) en 2 ml de agua destilada durante 12 h. El material no soluble fue eliminado y el sobrenadante añadido a la resina suspendida en el tampón de acoplamiento. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 2 h. El bloqueo de los grupos activos se realizó filtrando la resina y resuspendiéndola en 10 ml de Glicina 0.5 M, pH 8.5. Seguidamente se procedió al lavado del exceso de ligando con tampón de acetato 0.1 M, pH 4.0 y PBS pH 8.3 ambos conteniendo NaCl 0.5 M. El exceso de agente bloqueante se eliminó por lavado con PBS. Con el conjugado de PLP-Sepharose obtenido se montó una columna de 1x 24 cm equilibrada con PBS.

Agarosa-isoelectroenfoque (IEF)

Esta técnica se realizó utilizando placas de Agarosa Isogel (FMC Bio Products, Rockland, Maine), en el intervalo de pH 3 - 10. Se aplicaron 20 µg de proteína por calle. El punto isoelectrico (pI) de las moléculas en cuestión fue determinado comparando su migración con la de un conjunto de proteínas de pI conocido. El esquema electroforético obtenido se evaluó por análisis de imagen en el sistema BIO-IMAGE (Millipore, Bedford, Mass. USA).

Ejemplos relacionados específicamente con la invención*Aislamiento de ADN poli (A+) de polen*

Se aisló el ARN poli (A+) de 100 mg de polen siguiendo el protocolo descrito en Quick Prep Micro mRNA Purification Test (Pharmacia Biotech). El ARN purificado se resuspendió 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 apartado siguiente.

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 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.

Amplificación del gen de profilina por PCR

Los cebadores utilizados de la PCR fueron obtenidos de comparar diversas secuencias de profilinas de plantas, y teniendo en cuenta la degeneración del código genético:

* PROEXF (extremo 5' del gen):

AGAGAATTCCATATGTCGTGGCA(A/G)(A/G)CGTACGT

* PROEXR (extremo 3' del gen):

AGAAAGCTT(C/T)TACA(G/T)GCC(C/T)TGTTT(G/A/T)A(G/T/C)(G/A/C)AGGTA

Los cebadores se componen de la zona de hibridación (subrayada), de varios sitios de corte para las endonucleasas de restricción, EcoRI, HindIII y NdeI, (en negrita), y de unos nucleótidos de anclaje. Todos los nucleótidos entre paréntesis están en proporciones equimoleculares en esa determinada posición.

La reacción de amplificación por PCR del gen de la profilina tenía los siguientes componentes en un volumen de reacción de 50 μl : tampón de amplificación x10, 5 μl ; 200 mM de dNTPs; 100 pmoles de cada oligonucleótido cebador degenerado; 2,5 unidades de Taq polimerasa (Bioline, London, UK); 5 μl reacción de ADN complementario obtenido según el ejemplo II y agua destilada estéril hasta 50 μl . La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador RoboCycler (Stratagene) en las siguientes condiciones: 4 min a 94°C , seguido de 5 ciclos compuestos de 1 min a 94°C , 2 min a 42°C y 2 min a 72°C . Posteriormente, se realizaron otros 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 400 pb que correspondía a la profilina fue aislada del gel por GeneClean (Bio101, La Jolla, CA), utilizando el protocolo descrito por el fabricante.

Clonación del gen de profilina en pBluescript

El fragmento aislado fue digerido con HindIII, y posteriormente con EcoRI, 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* DH5 α . La selección se realizó en medio LB con ampicilina, X-Gal e IPTG, como se describe en Sambrook y col [(18)]. Las colonias resultantes, que en este medio presentaban un color blanco, fueron crecidas para aislar su ADN plasmídico, el cual fue digerido simultáneamente con EcoRI-HindIII, y NdeI-HindIII. Los clones que, en ambos casos, liberaban un fragmento de 400 pb fueron seleccionados para su posterior análisis.

Secuenciación del gen de profilina

La secuenciación del ADN insertado el pBluescript se realizó basándose en el método de Sanger [(19)] 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* DH5 α , conteniendo los plásmidos de interés fueron crecidos en 15 ml de LB suplementado con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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) siguiendo 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.

Se secuenciaron 16 clones, obteniéndose en algunos casos secuencias representadas por varios clones. Todos los insertos secuenciados estaban flanqueados por un codón de inicio (ATG) y un codón de terminación (TAA o TAG), con los siguientes resultados:

- 5 - Inserto de *Cynodon dactylon*, plásmido pPC19, tenía 396 pb que codificaba para un polipéptido de 131 aminoácidos que fue llamado CdPRO1 (Fig. 1).
- Los insertos de *Olea europaea*, plásmidos pPO11, pPO13 y PPO111, tenían 405 pb y codificaban para polipéptidos de 134 aminoácidos que fueron llamados OePRO1, OePRO2 y OePRO3, respectivamente. Las tres secuencias tenían una identidad del 97 % (Fig. 2).
- 10 - Los insertos de *Pheleum pratense*, plásmidos pPP19 y pPP112, tenían 396 pb y codificaban para polipéptidos de 131 aminoácidos que fueron llamados PpPRO2 y PpPRO3, respectivamente. Las dos secuencias tenían una identidad del 98 % (Fig. 3).
- 15 - Los insertos de *Parietaria judaica* eran de diferente tamaño. El plásmido pPA18 tenía un inserto de 399 pb, que codificaba para un polipéptido de 132 aminoácidos. El plásmido pPA112 tenía un inserto de 396 pb, que codificaba para un polipéptido de 131 aminoácidos. Los polipéptidos fueron llamados PjPRO1 y PjPRO2, respectivamente. Las dos secuencias tenían una identidad del 96 % (Fig. 4A).
- 20 - Inserto de *Mercurialis annua*, tenía 399 pb que codificaba para un polipéptido de 132 aminoácidos que fue llamado MaPRO1 (Fig. 4B).
- Se secuenciaron seis insertos procedentes de *Helianthus annuus*. Dos de ellos, pPG221 y pPG216, correspondían al gen completo, tenía un inserto de 402 pb y codificaban para un polipéptido de 133 aminoácidos. Los cuatro plásmidos restantes, pPG12, pPG14, pPG16, y pPG18, eran secuencias parciales del gen, con su extremo 3' truncados. Los polipéptidos fueron llamados HaPRO1, HaPRO2, HaPRO3, HaPRO4, HaPRO5, y HaPRO6, respectivamente. Las seis secuencias tenían una identidad media del 98 % (Fig. 5).

30 *Análisis de las secuencias*

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con otras profilinas existentes en el banco de datos (EMBL Data Bank y SWISS-Prot) utilizando el paquete informático GCG (Universidad de Wisconsin Genetics Computer Group). Cuando se compararon con otras profilinas vegetales (maíz, cebada, alubia, 35 hierba timotea, abedul, y tabaco) [(10), (14), (15), (16), (17) y (27) Mittermann, I., Swoboda, I., Pierson, E., Eller, N., Kraft, D., Valenta, R., and Heberle-Bors, E. (1995). Molecular cloning and characterization of profilin from tobacco (*Nicotiana tabacum*): increased profilin expression during pollen maturation. Plant. Mol. Biol. 27, 137-146] se encontró una gran homología entre ellas, con más del 70 % de residuos idénticos (Fig. 6). Por el contrario, cuando se comparó un grupo de profilinas vegetales con otras profilinas eucariotas de animales (hombre, toro), levaduras o protistas se encontró una menor homología. Así por ejemplo, la profilina CdPRO1 de *Cynodon dactylon* tenía una identidad del 46 % con *Acanthamoeba castellanii*; del 42 % con *Physarum polycephalum* y del 32 % con la profilina I humana. Se puede observar en la figura 7 las diferencias entre una gran número de profilinas de diferentes orígenes, de todas formas debido a que comparten una función similar, existen unas regiones donde se encuentran un gran número 45 de residuos conservados que serían fundamentales para su función fisiológica.

Subclonación del gen de profilina en el vector de expresión pKN172

50 Los vectores recombinantes (2 µg) derivados del pBluescript fueron digeridos con las endonucleasas de restricción HindIII y NdeI. El fragmento de 400 pb, que contenía el gen de profilina, 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 55 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) [(21)]. 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. 60

Expresión de la profilina en E. coli

E. coli BL21 (DE3) conteniendo el plásmido pPC19, que codificaba para la profilina CdPRO1 de *Cynodon dactylon*, 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 %.

se detectó una banda, por tinción de Coomassie, de unos 14 kDa, que estaba mucho más intensa que en el control de pKN172 sin inserto. La banda, cuantificada por densitometría, constituía un 20-30% de proteína total.

Purificación de la profilina recombinante

Las células, procedentes de la expresión descrita en el apartado anterior se sonicaron en hielo durante 2 minutos, en intervalos de 20 segundos. El extracto obtenido se clarificó por centrifugación a 14000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante, conteniendo la profilina expresada, se distribuyó en alícuotas conteniendo 15 mg de proteína, que se aplicaron a una columna de 1 x 7 cm de Sepharose-poli(L)-prolina. La columna fue lavada con 7 volúmenes de tampón PBS, 3 volúmenes de 2 M urea en PBS, y finalmente la proteína retenida fue eluida con 6 M urea en PBS. Las fracciones que contenían proteína fueron mezcladas y dializadas durante 16 horas frente a agua destilada. La muestra dializada fue liofilizada, y resuspendida en 10 mM Tris-HCl, pH 7.5. Un ejemplo del proceso de purificación de la profilina CdPRO1 de *Cynodon dactylon* se presenta en la figura 8, y de la profilina OePRO1 de *Olea europaea* en la figura 9. Se puede apreciar como el 95 % de la proteína expresada se encuentra en forma soluble. La migración de las profilinas recombinantes era similar a la de la profilina natural utilizada como control. Las preparaciones así obtenidas contenían >99 % de profilina, como se determinó mediante SDS-PAGE seguida de tinción con plata (Fig. 10).

Purificación de la profilina recombinante (Método alternativo I)

En los casos en los cuales la profilina expresada en *E. coli* no era soluble, y quedaba en el sedimento después de la lisis bacteriana, se diseñó un procedimiento alternativo. Las células eran resuspendidas en tampón STE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) suplementado con 100 µg/ml de lisozima, e incubadas durante 15 min en hielo. Posteriormente se añadieron 5 mM ditioneitol (DTT) y 1.5 % N-lauril sarcosina (sarcosil), y se agitó 5 s. Las lisis se completaba con una sonicación de 20 s. El lisado se clarificaba por centrifugación, y al sobrenadante se le añadía 2 % de Tritón X-100, y se agitaba otros 5 s. El lisado conteniendo la profilina era aplicado a la columna de poli-L-prolina como se indicará más adelante.

Purificación de la profilina recombinante (Método alternativo II)

Otro método utilizado para la solubilización de la profilina recombinante insoluble es el siguiente: La lisis se realiza en idénticas condiciones que en el ejemplo IX (incubación en tampón STE con lisozima y sonicación de 20 s), pero se clarificaba por centrifugación. El sedimento, conteniendo la profilina insoluble, era solubilizado con 8 M urea en 100 mM glicina-NaOH pH 9.0 y pasado a través de una columna de Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech) equilibrada en 100 mM glicina-NaOH pH 9.0. A la proteína eluida se añadió 5 mM DTT y se dejó incubar a 4°C durante 16 h. La muestra se sometió a cromatografía de afinidad en Sepharosa-poli-L-prolina como se indicará más adelante.

Detección de la profilina recombinante con antisueños de conejo frente a profilina de Helianthus annuus

Se corrieron en SDS-PAGE 12.5 %, diferentes muestras procedentes de los distintos pasos de la expresión y purificación de profilina, y se transfirieron a membranas de PVDF o nitrocelulosa. Las tiras de membrana, conteniendo las proteínas transferidas, se incubaron con diluciones 1:3000 de suero de conejos inmunizados con profilina purificada de polen de girasol. Después de los lavados, se incubaron con diluciones 1:2000 del anticuerpo conjugado a la enzima peroxidasa. Como se muestra en las figuras 11 y 12, se detectó una banda de reacción mayoritaria a 14 kDa, y otra bandas de menor intensidad en torno a 30 kDa, que podría ser debida a la formación de dímeros de profilina, como describe Babich et al. [(28) Babich, M., Foti, L.R.P., Sykaluk, L.L., and Clark, C.R. (1996). Profilin forms tetramers that bind to G-actin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 218, 125-131]. Otras bandas de menor intensidad, que se aprecian sólo en los extractos de *E. coli*, podrían deberse a reacciones inespecíficas ya que también

se observan en el control sin inserto. Las figuras 11 y 12, muestran la gran efectividad de la columna de Sepharosa-poli-L-prolina, ya que solo un 5% de la profilina aparece en la fracción no retenida, tanto en la purificación CdPRO1 de *Cynodon dactylon* que se muestra en la figura 11, como la de OePRO1 de *Olea europaea* que se muestra en la figura 12.

5 *Detección de la profilina recombinante con anticuerpos IgE procedentes de pacientes atópicos*

Se separaron por SDS-PAGE las proteínas del extracto alergénico de *Cynodon dactylon* y la profilina CdPRO1 recombinante, y después de ser transferidas a membranas se incubaron con sueros de pacientes alérgicos a *Cynodon dactylon*. Las profilinas recombinantes mostraron una reactividad similar a las proteínas del extracto natural por las IgE del suero de los pacientes, como se puede observar en la figura 13. Igualmente en pacientes alérgicos a gramíneas, donde la proporción de *Cynodon dactylon* es menor (siendo predominantes las plantas *Poa pratensis*, *Pheleum pratense*, *Lolium perenne*.), también se aprecia reactividad cruzada.

15 *Identidad de epítomos entre la profilina natural y recombinante CdPRO1 de Cynodon dactylon*

Para estudiar si CdPRO1 de *Cynodon dactylon* era idéntica a la profilina natural, se realizaron experimentos de inhibición. Una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *Cynodon dactylon* se incubó con 10 µg de CdPRO1 por ml de suero, o BSA como control. 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 *Cynodon dactylon*, profilinas purificadas naturales o recombinantes transferidos a PVDF. La figura 14 muestra que las IgE antiprofilina presentes en los sueros de los pacientes eran adsorbidas por la profilina recombinante, ya que no eran capaces de detectar ninguna banda de 14 kDa correspondiente a la profilina. La banda que aparece a 32 kDa en la muestra de profilina natural, pudiera ser el alérgeno mayor de *Cynodon dactylon* [(29) Matthiesen, F., Schumacher, M.J., and Lowenstein, H. (1991). Characterization of the major allergen of *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) pollen, *Cyn d* I. J. Allergy Clin. Immunol. 88, 763-774], que en pequeñísimas cantidades copurificaría con la profilina después de un sólo paso por Sepharosa-PLP.

30 *Simulación de la estructura tridimensional de la profilina y predicción de péptidos antigénicos*

Las profilinas de plantas y del eucariota inferior *Acanthamoeba* son lo suficiente homólogas, alrededor del 40%, como para poder realizar un modelo por homología de una profilina de plantas, se ha elegido como base la de *Phleum pratense* PpPRO3.

La estructura seleccionada fue la profilina II de *Acanthamoeba castellanii*, y se realizó según el programa WhatIf, visualizándose mediante el programa INSIGHT II, versión 2.3.5 (Molecular Modeling System). Este modelo tridimensional deducido se presenta en la figura 15. La predicción de las estructuras con posibilidad inmunogénica se realizó teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

- Accesibilidad.
- Factor de temperatura (en estructuras cristalográficas).
- Predicción de la estructura secundaria, teniendo en cuenta que las estructuras en bucle, son las más favorecidas.
- Características de los aminoácidos de la zona.
- Regiones que presenten secuencias diferentes entre mamíferos y plantas.

Este último requisito permite que los péptidos elegidos no sean inmunogénicos en mamíferos, concretamente el hombre. Los péptidos seleccionados según estos criterios aparecen en la figura 16, con todos los péptidos correspondientes a las profilinas secuenciadas.

55 *Purificación y caracterización de la profilina natural de Helianthus annuus*

Purificación cromatográfica de la profilina de Helianthus annuus

El aislamiento de profilinas de polen de girasol mediante cromatografía de afinidad en columna de Sepharosa-PLP resultó altamente efectivo, según se pudo evaluar mediante SDS-PAGE (Fig. 17), ya que tan sólo se observaron unas tenues bandas de contaminantes. El peso molecular de la banda de proteína

determinada por análisis de imagen en el sistema BIO-IMAGE fue de 15.7 kDa.

La fracción 6 M eluída de la columna de Sepharose-PLP que contenía profilina fue purificada posteriormente, con el fin de eliminar los contaminantes menores y para poder llevar a cabo posteriormente la secuenciación de aminoácidos y los ensayos de inmunización. Se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico en el sistema micropreparativo de alta resolución SMARTTM (Pharmacia LKB, Sweden). Se empleó una columna de intercambio aniónico (MonoQ PC 1.6/5). Se aplicaron 40 mg de fracción de profilina mediante inyección de 1 ml de muestra disuelta en Tris-HCl 40 mM, pH 8.0. La elución se llevó a cabo mediante un gradiente lineal generado por la adición de NaCl 1M al tampón inicial. Gracias a esta técnica obtuvimos una muestra de profilina pura, que eluyó como un pico simétrico a una concentración de 0.25 M NaCl.

Para la estimación del peso molecular se empleó también en el sistema SMART con una columna de tamizado molecular Superdex 75 PC 3.2/30. Las muestras se aplicaron a una concentración de 20 mg/ml en tampón fosfato 0.05 M, NaCl 0.15 M pH 7.0 (PBS) mediante inyección de 20 μ l. Se mantuvo un flujo de 40 μ l/min durante todo el proceso cromatográfico y a 8°C. En el calibrado de la columna se emplearon grupos de proteínas de peso molecular conocido.

Utilizando esta técnica se estimó el peso molecular nativo que fue de 19.1 kDa. El perfil cromatográfico obtenido se muestra en la figura 18.

Las muestras de profilina pura fueron también caracterizadas por isoelectroenfoque en geles de agarosa (Agarose-IEF). Aquí, se detectó la presencia de tres isoformas (Fig. 19) con pIs 4.41, 4.46 y 4.50 respectivamente.

Composición de aminoácidos de la profilina de Helianthus annuus

Se determinó la composición en aminoácidos de la profilina purificada por el sistema SMART. Para ello se disolvieron 20 μ l de la muestra de profilina purificada en 200 μ l de agua destilada; de esta disolución, se emplearon 4 μ l para el análisis de aminoácidos en un Beckman Analyser modelo 6300 intercambiador iónico, tras hidrólisis a 115°C durante 16 h., en 100 μ l de HCl 6 N, fenol 0.2% conteniendo también norleucina 2 nmol. Después de la hidrólisis, el ácido fue eliminado en Speedvac y los aminoácidos resultantes se disolvieron en 100 μ l de tampón de muestra Beckman conteniendo 2 nmol de homoserina. El instrumento se utilizó siguiendo los programas del fabricante con el uso de sus tampones. El análisis de los datos se efectuó en un ordenador externo utilizando el software de adquisición de datos Perkin Elmer/Nelson.

Secuenciación proteica de la profilina de Helianthus annuus

Tras observar que el extremo N-terminal de la profilina estaba bloqueada, se decidió llevar a cabo la secuenciación de péptidos internos, para ello se digirió enzimáticamente la muestra con tripsina modificada (Promega), o bien, lisil endopeptidasa (Wako) durante 24 h a 37°C. Los péptidos resultantes fueron reducidos/carboximilados, extraídos con TFA 0.1%, CH₃CN y después sometidos a HPLC de fase reversa utilizando un equipo Hewlett Packard 1090 equipado con un colector de fracciones Isco modelo 2150 y una columna de 25 cm Vydac C-18, equilibrada con un 98% de tampón A (TFA al 0,06%) y un 2% de tampón B (TFA al 0.052%, acetonitrilo 80%). Los péptidos fueron eluidos con el siguiente programa de gradiente: 0-60 min (2-37% B), 60-90 min (37-75% B) y 90-105 min (75-98% B) y fueron detectados por su absorbancia a 210 nm. Las cantidades digeridas, generalmente en el rango de 25-250 pmol fueron fraccionadas en columnas ID de 2.1 mm, eluidas a 0.15 ml/min, mientras que las cantidades mayores lo fueron en columnas de 4.6 mm eluidas a 0.15 ml/min. Después de la carga, los tubos de muestra se aclararon con 50 μ l de ácido trifluoroacético el cual fue entonces sobre añadido en capa sobre el filtro de secuenciación.

El peso molecular de los péptidos se estudió por espectrometría de masas de desorción por láser utilizando un espectrómetro de masas VG/Fisons TofSpec equipado con un láser de nitrógeno (337 nm) y un tubo de dirección lineal de 0.65 m.

La secuenciación de los péptidos resultantes se realizó con secuenciadores Applied Biosystems modelos 470A ó 477. Las secuencias resultantes aparecen en la figura 20 comparandolas con las secuencias obtenidas por la secuenciación de ADNc. Las secuencias peptídicas parciales coinciden en algunos casos con alguna de las secuencias deducidas de los genes clonados. En otros casos, las secuencias no coinciden con las obtenidas por clonación lo que indicaría que la existencia de otras isoformas o variantes no clonadas.

Reactividad cruzada de la profilina de Helianthus annuus

La naturaleza alérgica de la profilina purificada fue confirmada mediante SDS-PAGE Immunoblotting. Para ello, se transfirieron a membranas PVDF tres calles de profilina sometida a electroforesis y se revelaron con una mezcla de sueros humanos positivos a girasol, hierbas y frutos de *Rosaceas* (manzana, pera y melocotón). En los dos últimos casos (hierbas y frutos), la participación de la profilina como alérgeno, ha sido apuntada y definida como causante de la reactividad cruzada. La fijación de IgE a partir de los 3 sueros de grupo en la banda de profilina se puede observar en la figura 21.

La muestra de profilina pura (tras realizar la cromatografía SMART) se empleó para obtener un antisuero policlonal, con el fin de investigar las posibles reacciones cruzadas antigénicas con diferentes extractos alérgicos, mediante SDS-PAGE Immunoblotting. Primeramente, algunos extractos en cuya composición se conocía la existencia de las profilinas se incubaron con suero anti-profilina de girasol (Fig. 22). Como se puede observar, los cuatro extractos analizados mostraron unión de IgG en la banda doblete localizada entre 14.4 y 20.1 kDa correspondiente a la profilina.

Finalmente, se evaluó la posible naturaleza profilínica de las proteínas de diferentes extractos alérgicos comunes. Los resultados se muestran en la figura 23. Se encontraron proteínas fijadoras de IgG (lo que es indicativo de su naturaleza profilínica o de un alto grado de homología) en extractos de polen (*Phleum*, *Olea*, *Parietaria* y *Mercurialis*), así como en estambres de la flor del azafrán y del hongo *Aspergillus fumigatus*. Por otro lado, no se observó ninguna fijación en principio en extractos de epitelio de perro, ácaros u hongos.

Usos y administración

La presente invención cubre el uso de la profilina de las plantas descritas o péptidos sintéticos derivados de ella para tratamientos de insensibilización 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. Tanto la proteína como sus 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 profilinas recombinantes 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 profilinas recombinantes para diagnóstico "in vitro" mediante técnicas de: inmunoensayo, liberación de histamina y test de transformación linfoblástica.

Lista de secuencias

(1) SECUENCIA 1: SEQ ID NO:1

Fragmento de 396 nucleótidos de ADNc proveniente de ARNm de *Cynodon dactylon*

```

1  ATGTCGTGGC AGGCGTACGT GGACGACCAC CTCATGTGCG AGATCGAGGG
51  ACATCACCTC ACCTCCGCCG CCATCATCGG CCATGACGGC ACCGTCTGGG
101 CTCAGAGCGC CGCCTTCCCG GCGTTCAAGC CTGAGGAGAT GGCCAACATC
151 ATGAAGGACT TCGACGAGCC CGGGTTTCTT GCACCCACCG GCCTCTTCCT
201 CGGCCCCACC AAGTACATGG TCATCCAGGG CGAGCCCGGC GCCGTCATCC
251 GCGGAAAGAA GGGATCAGGT GGTGTCACTG TGAAGAAGAC TGGTCAGGCT
301 CTTGTGATCG GCATCTACGA CGAGCCAATG ACCCCCGGAC AGTGCAACAT
351 GGTGATCGAG AAGCTCGGCG ATTACCTCAT TGAACAAGGC ATGTAA

```

(2) SECUENCIA 2: SEQ ID NO:2

Fragmento de 132 aminoácidos proveniente de la traducción de la SEQ ID NO:1.

ES 2 125 202 B1

1 MSWQAYVDDH LMCEIEGHHL TSAAIIGHDG TVWAQSAAFP AFKPEEMANI
 51 MKDFDEPGFL APTGLFLGPT KYMVIQGEPP AVIRGKKKGS GVTVKKTGQA
 5 101 LVIGIYDEPM TPGQCNMVIE KLG DYLIEQG M*

(3) SECUENCIA 3: SEQ ID NO:3

10 Fragmento de 396 nucleótidos de ADNc PpPRO3 proveniente de ARNm de *Pheleum pratense*

1 ATGTCGTGGC AGACGTACGT GGACGAGCAC CTGATGTGCG AGATCGAGGG
 15 51 CCACCACCTC GCCTCCGCGG CCATCCTCGG CCACGACGGC ACCGTCTGGG
 101 CCCAGAGCGC CGACTTCCCC CAGTTCAAGC CTGAGGAGAT CACCGGCATC
 151 ATGAAGGATT TCGACGAGCC GGGGCACCTC GCGGGCAGCG GCATGTTTCGT
 20 201 CGCAGGTGCC AAGTACATGG TCATCCAGGG TGAACCCGGC GCGGTCATCC
 251 GTGGCAAGAA GGGAGCAGGA GGCATCACCA TAAAGAAGAC CGGGCAGGCG
 301 CTGGTCGTCG GCATCTACGA CGAGCCCATG ACCCCTGGGC AGTGCAACAT
 25 351 GGTGGTGGAG AGGCTTGGCG ACTACCTCGT TGAACAAGGC ATGTAG

(4) SECUENCIA 4: SEQ ID NO:4

30 Fragmento de 131 aminoácidos proveniente de la traducción de SEQ ID NO:3 (ADNc PpPRO3) de *Pheleum pratense*

1 MSWQTYVDEH LMCEIEGHHL ASAILGHG TVWAQSADFP QFKPEEITGI
 35 51 MKDFDEPGHL APTGMFVAGA KYMVIQGEPP AVIRGKKKAG GITIKKTGQA
 101 LVVGIYDEPM TPGQCNMVVE RLGDYLVQGM

(5) SECUENCIA 5: SEQ ID NO:5

40 Fragmento de 396 nucleótidos de ADNc PpPRO2 proveniente de ARNm de *Pheleum pratense*.

1 ATGTCGTGGC AGACGTACGT GGACGAGCAC CTGATGTGCG AGATCGAGGG
 45 51 CCATCACCTC GCCTCCGCGG CCATCTTCGG CCACGACGGC ACCGTCTGGG
 101 CCCAGAGCGC CGACTTCCCC CAGTTCAAGC CTGAGGAGAT CACCGGCATC
 50 151 ATGAAGGATT TGGACGAGCC GGGGCACCTC GCGGGCAGCG GCATGTTTCGT
 201 CGCAGCTGCC AAGTACATGG TCATCCAGGG TGAACCCGGC GCGGTCATCC
 251 GTGGCAAGAA GGGAGCAGGA GGCATCACCA TAAAGAAGAC AGGGCAGGCG
 301 CTGGTTGTCG GCATCTACGA TGAGCCCATG ACCCCTGGGC AGTGCAACAT
 55 351 GGTGGTGGAG AGGCTTGGCG ACTACCTCGT TGAACAAGGC ATGTAG

(6) SECUENCIA 6: SEQ ID NO:6

60 Fragmento de 131 aminoácidos proveniente de la traducción de SEQ ID NO:5 (ADNc PpPRO2) de *Pheleum pratense*.

ES 2 125 202 B1

1 MSWQTYVDEH LMCEIEGHHL ASAAIFGHDG TVWAQSADFP QFKPEEITGI
51 MKDLDEPGHL APTGMFVAAA KYMVIQGE PG AVIRGKKGAG GITIKKTGQA
5 101 LVVGIYDEPM TPGQCNMVVE RLGDYLVEQG M

(7) SECUENCIA 7: SEQ ID NO:7 Fragmento de 396 nucleótidos de ADNc PjPRO2 proveniente de ARNm de *Parietaria judaica*.

1 ATGTCGTGGC AGGCGTACGT CGATGACCAC CTTATGTGCG ACGTCGGCGA
51 CGGCAATACA CTCGCTTCCG CCGCCATCAT CGGCCACGAT GGCAGCGTTT
15 101 GGGCTCAGAG CGCTAACTTC CCTCAGTTGA AGCCAGAAGA GGT TACTGGA
151 ATCATGAATG ATTTTAATGA GGGTGGATTT CTTGCCCCAA CCGGGTTGTT
201 CCTTGGAGGT ACAAAGTATA TGGTGATCCA AGGGGAGTCT GGAGCCGTGA
20 251 TCGGGAAGAA GGGTCTTGGA GGTGCCACTT TGAAGAAAAC TGGGCAAGCA
301 ATTGTTATTG GCATTTACGA CGAACCAATG ACCCCAGGAC AATGCAATTT
351 GGTAGTAGAG AGGTTGGGCG ATTACCTCCT AGAACAAGGC ATGTAG

(8) SECUENCIA 8: SEQ ID NO:8

Fragmento de 131 aminoácidos proveniente de la traducción de SEQ ID NO:7 (ADNc PjPRO2) de *Parietaria judaica*.

1 MSWQAYVDDH LMCDVGDGNT LASAAIIGHD GSVWAQSANF PQLKPEEVTG
51 IMNDFNEGGF LAP TGLFLGG TKY MVIQGES GAVIGKKGSG GATLKKKTGQA
35 101 IVIGIYDEPM TPGQCNLVVE RLGDYLLEQG M

(9) SECUENCIA 9: SEQ ID NO:9

Fragmento de 399 nucleótidos de ADNc PjPRO1 proveniente de ARNm de *Parietaria judaica*.

1 ATGTCGTGGC AGGCGTACGT TGATGACCAC CTTATGTGCG ACGTCGGCGA
45 51 CGGCAATACA CCCGCTTCCG CCGCTATCAT CGGCCATGAT GGCAGCGTTT
101 GGGCTCAGAG CGCTAACTTC CCTCAGTTGA AGCCAGAAGA GGT TACTGGA
151 ATCATGAATG ATTTTAATGA AGCTGGATTT CTTGCCCCAA CCGGGTTGTT
50 201 CCTTGGAGGT ACAAAGTATA TGGTGATCCA AGGGGAGTCT GGAGCCGTGA
251 TTCGTGGGAA GAAGGGTTCT GGAGGTGCCA CTTTGAAGAA AACTGGGCAA
301 GCAATTGT TA TTGGCATT TA CGACGAGCCA ATGACCCAG GACAATGCAA
55 351 TTTGGTAGTA GAGAGGTTGG GCGATTACCT TCTCGAACAG GGCCTGTAG

(10) SECUENCIA 10: SEQ ID NO:10

Fragmento de 132 aminoácidos proveniente de la traducción de SEQ ID NO:9 (ADNc PjPRO1) de *Parietaria judaica*.

ES 2 125 202 B1

1 MSWQAYVDDH LMCDVGDGNT PASAAIIGHD GSVWAQSANF PQLKPPEEVTG
 51 IMNDFNEAGF LAPTGLFLGG TKYMVIQGES GAVIRGKKGS GGATLKKTGQ
 5 101 AIVIGIYDEP MTPGQC�LVV ERLGDYLLLEQ GL

(11) SECUENCIA 11: SEQ ID NO:11

10 Fragmento de 405 nucleótidos de ADNc OePRO1 proveniente de ARNm de *Olea europaea*.

1 ATGTCGTGGC AGGCGTACGT TGATGATCAT TTGATGTGTG ACATTGAGGG
 15 51 CCATGAAGAC CACCGCCTCA CCGCAGCTGC CATCGTCGGC CATGACGGTT
 101 CTGTTTGGGC TCAGAGCGCT ACCTTCCCTC AGTTCAAGCC AGAGGAGATG
 151 AATGGAATTA TGACAGATTT CAATGAACCT GGTCATCTGG CACCAACAGG
 20 201 CCTACATCTT GGAGGAACAA AGTATATGGT GATTCAAGGA GAGGCTGGAG
 251 CTGTCATCCG TGGAAAGAAG GGATCTGGTG GTATTACCAT TAAGAAGACT
 301 GGCCAAGCAC TAGTTTTTGG TATCTACGAG GAGCCTGTAA CTCCAGGACA
 25 351 ATGCAACATG GTTGTGCGAGA GGTGGGAGA CTACCTGGTC GAACAAGGCA
 401 TGTA

(12) SECUENCIA 12: SEQ ID NO:12

30 Fragmento de 134 aminoácidos proveniente de la traducción de SEQ ID NO:11 (ADNc OePRO1) de *Olea europaea*.

35 1 MSWQAYVDDH LMCDIEGHED HRLTAAAIIVG HDGSVWAQSA TFPQFKPEEM
 51 NGIMTDFNEP GHLAPTGLHL GGTKYMVIQG EAGAVIRGKK GSGGITIKKT
 101 GQALVFGIYE EPVTPGQCNM VVERLGDYLV EQGM

40 (13) SECUENCIA 13: SEQ ID NO:13

Fragmento de 405 nucleótidos de ADNc OePRO2 proveniente de ARNm de *Olea europaea*.

45 1 ATGTCGTGGC AGGCGTACGT TGATGATCAT TTGATGTGTG ACATTGAGGG
 51 CCATGAAGGC CACCGCCTCA CCGCAGCTGC CATCGTCGGC CATGACGGTT
 50 101 CTGTTTGGGC TCAGAGCGCT ACCTTCCCTC AGTTCAAGCC AGAGGAGATG
 151 AATGGAATTA TGACAGATTT CAATGAACCT GGTCATCTGG CACCAACAGG
 201 CCTACATCTT GGAGGAACAA AGTATATGGT GATTCAAGGA GAGGCTGGAG
 251 CCGTCATCCG TGGAAAGAAG GGATCTGGTG GTATTACCAT TAAGAAGACT
 55 301 GGCCAAGCAC TAGTTTTTGG TATCTACGAG GAGCCTGTAA CTCCAGGACA
 351 ATGCAACATG GTTGTGCGAGA GGTGGGAGA CTACCTGCTT GAACAAGGCC
 60 401 TGTA

ES 2 125 202 B1

(14) SECUENCIA 14: SEQ ID NO:14

Fragmento de 134 aminoácidos proveniente de la traducción de SEQ ID NO:13 (ADNc OePRO2) de *Olea europaea*.

5

```

1 MSWQAYVDDH LMCDIEGHEG HRLTAAAIVG HDGSVWAQSA TFPQFKPEEM
51 NGIMTDFNEP GHLAPTGLHL GGTKYMQVIG EAGAVIRGKK GSGGITIKKT
10 101 GQALVFGIYE EPVTPGQCNM VVERLGDYLL EQGL

```

(15) SECUENCIA 15: SEQ ID NO:15

Fragmento de 405 nucleótidos de ADNc OePRO3 proveniente de ARNm de *Olea europaea*.

15

```

1 ATGTCGTGGC AGGCGTACGT TGATGATCAT TTGATGTGTG ACATTGAGGG
51 CCATGAAGGC CACCGCCTCA CCGCAGCTGC CATCGTCGGC CATGACGGTT
20 101 CTGTTTGGGC TCAGAGCGCT ACCTTCCCTC AGTTCAAGCC AGAGGAGATG
151 AATGGAATTA TGACAGATTT CAATGAACCT GGTCATCTGG CACCAACAGG
201 CCTACATCTT GGAGGAACAA AGTATATGGT GATTCAAGGA GAGGCTGGAG
25 251 CTGTCATCCG TGGAAAGAAG GGATCTGGTG GTATTACCAT TAAGAAGACT
301 GGCCAAGCAC TAGTTTTTGG TATCTACGAG GAGCCTGTAA CTCCAGGACA
351 ATGCAACATG GTTGCCGAGA GGTGCGGAGA CTACCTGCTA GAACAAGGCC
30 401 TGTAG

```

(16) SECUENCIA 16: SEQ ID NO:16

Fragmento de 134 aminoácidos proveniente de la traducción de SEQ ID NO:15 (ADNc OePRO3) de *Olea europaea*.

35

```

1 MSWQAYVDDH LMCDIEGHEG HRLTAAAIVG HDGSVWAQSA TFPQFKPEEM
40 51 NGIMTDFNEP GHLAPTGLHL GGTKYMQVIG EAGAVIRGKK GSGGITIKKT
101 GQALVFGIYE EPVTPGQCNM VAERLGDYLL EQGL

```

(17) SECUENCIA 17: SEQ ID NO:17

Fragmento de 402 nucleótidos de ADNc HaPRO1 proveniente de AMm de *Helianthus annuus*.

45

```

1 ATGTCGTGGC AGGCGTACGT CGATGAACAC TTGATGTGCG ACATTGAAGG
50 51 TACTGGCCAG CATCTCACAT CTGCCGCTAT TCTCGGTCTC GACGGTACTG
101 TTTGGGCTCA GAGCGCTAAG TTTCCACAGT TTAAACCTGA GGAGATGAAA
151 GGCATCATTA AGGAATTCGA CGAAGCTGGT ACTCTTGCTC CAACAGGTAT
55 201 CTTTCATCGCG GTTGCAAAAT ATATGGTACT CCAAGGAGAG CCTGGAGCTG
251 TTATCCGTGG AAAGAAGGGA GCTGGAGGAA TATGCATCAA GAAAACGGGC
301 CAAGCTATGA TTATGGGAAT TTACGACGAG CCCGTTGCTC CTGGACAATG
60 351 CAACATGGTT GTTGAGAGGC TTGGCGATTA CCTCCTCGAA CAAGGCATGT
401 AA

```

ES 2 125 202 B1

(18) SECUENCIA 18: SEQ ID NO:118

Fragmento de 133 aminoácidos proveniente de la traducción de SEQ ID NO:17 (ADNc HaPRO1) de *Helianthus annuus*.

5

```
1 MSWQAYVDEH LMCDIEGTGQ HLTSAAILGL DGTVWAQSAK FPQFKPEEMK
51 GIIKEFDEAG TLAPTGMFIA GAKYMLQGE PGAVIRGKKG AGGICIKKTG
101 QAMIMGIYDE PVAPGQCNMV VERLGDYLLE QGM
```

(19) SECUENCIA 19: SEQ ID NO:19

Fragmento de 402 nucleótidos de ADNc HaPRO2 proveniente de ARNm de *Helianthus annuus*.

15

```
1 ATGTCGTGGC AGGCGTACGT CGATGAACAC TTGATGTGCG ACATTGAAGG
51 TACTGGCCAG CATCTCACAT CTGCCGCTAT TCTCGGTCTC GACGGTACTG
20 101 TTTGGGCTCA GAGCGCTAAG TTTCCACAGT TCAAACCCGA GGAGATGAAA
151 GGCATCATTA AGGAATTCGA CGAAGCTGGT ACTCTTGCTC CAACAGGTAT
201 GTTCATCGCG GGTGCAAAAT ATATGGTACT CCAAGGAGAG CCCGGAGCTG
25 251 TTATCCGTGG AAAGAAGGGA GCTGGAGGAA TATGCATCAA GAAAACGGGC
301 CAAGCTATGA TTATGGGAAT TTACGACGAG CCCGTTGCTC CTGGACAATG
351 CAACATGGTT GTTGAGAGGC TTGGCGATTA CCTGCTCGAA CAAGGCATGT
30 401 AA
```

(20) SECUENCIA 20: SEQ ID NO:20

Fragmento de 133 aminoácidos proveniente de la traducción de SEQ ID NO:19 (ADNc HaPRO2) de *Helianthus annuus*.

35

```
1 MSWQAYVDEH LMCDIEGTGQ HLTSAAILGL DGTVWAQSAK FPQFKPEEMK
40 51 GIIKEFDEAG TLAPTGMFIA GAKYMLQGE PGAVIRGKKG AGGICIKKTG
101 QAMIMGIYDE PVAPGQCNMV VERLGDYLLE QGM
```

(21) SECUENCIA 21: SEQ ID NO:21

45

Fragmento de 390 nucleótidos de ADNc HaPRO3 proveniente de AMm de *Helianthus annuus*.

```
1 ATGTCGTGGC AGACGTACGT CGATGAACAC TTGATGTGCG ACATTGAAGG
50 51 TACTGGCCAG CATCTCACAT CTGCCGCTAT TCTCGGTCTC GACGGTACTG
101 TTTGGGCTCA GAGCGCTAAG TTTCCACAGT TTAAACCTGA GGAGATGAAA
55 151 GGCATCATTA AGGGATTCTGA CGAAGCTGGT ACTCTTGCTC CAACAGGTAT
201 GTTTATCGCG GGTGCAAAAT ATATGGTACT CCAAGGAGAG CCTGGAGCTG
251 TTATCCGTGG AAAGAAGGGA GCTGGAGGAA TATGCATCAA GAAAACGGGC
60 301 CAAGCTATGA TTATGGGAAT TTACGACGAG CCCGTTGCTC CTGGACAATG
351 CAACATGGTT GTTGAGAGGC TCGGTGACTA CCTCTAATGA
```

ES 2 125 202 B1

(22) SECUENCIA 22: SEQ ID NO:22

Fragmento de 128 aminoácidos proveniente de la traducción de SEQ ID NO:21 (ADNc HaPRO3) de *Helianthus annuus*.

5

```
1 MSWQTYVDEH LMC DIEGTGQ HLTSAAILGL DGTVWAQSAK FPQFKPEEMK
51 GIIKGFDEAG TLAPTGMFIA GAKYMLQGE PGAVIRGKKG AGGICIKKTG
10 101 QAMIMGIYDE PVAPGQCNMV VERLGDYL
```

(23) SECUENCIA 23: SEQ ID NO:23

15 Fragmento de 390 nucleótidos de ADNc. HaPRO4 proveniente de ARNm de *Helianthus annuus*.

```
1 ATGTCGTGGC AGACGTACGT CGATGAACAC TTGATGTGCG ACATTGAAGG
20 51 TACTGGCCAC CATCTCACAT CTGCCGCTAT TCTCGGTCTC GACGGTACTG
101 TTTGGGCTCA GAGCGCTAAG TTTCCACAGT TTAAACCTGA GGAGATGAAA
151 GGCATCATTA AGGAATTCGA CGAAGCTGGT ACTCTTGCTC CAACAGGTAT
25 201 GTTCATCGCG GGTGCAAAAT ATATGGTACT CCAAGGAGAG CCTGGAGCTG
251 TTATCCGTGG AAAGAAGGGA GCTGGAGGAA TATGCATCAA GAAAACGGGC
301 CAAGCTATGA TTATGGGAAT TTACGACGAG CCCGTTGCTC CTGGACAATG
30 351 CAACATGGTT GTTGAGAGGC TCGGTGACTA CCTCTAATGA
```

(24) SECUENCIA 24: SEQ ID NO:24

35 Fragmento de 128 aminoácidos proveniente de la traducción de SEQ ID NO:23 (ADNc HaPRO4) de *Helianthus annuus*.

```
1 MSWQTYVDEH LMC DIEGTGH HLTSAAILGL DGTVWAQSAK FPQFKPEEMK
40 51 GIIKEFDEAG TLAPTGMFIA GAKYMLQGE PGAVIRGKKG AGGICIKKTG
101 QAMIMGIYDE PVAPGQCNMV VERLGDYL
```

(25) SECUENCIA 25: SEQ ID NO:25

45 Fragmento de 390 nucleótidos de ADNc HaPRO5 proveniente de ARNm de *Helianthus annuus*.

```
1 ATGTCGTGGC AGACGTACGT CGATGAACAC TTGATGTGCG ACATTGAAGG
50 51 TACTGGCCAG CATCTCACAC CTGCCGCTAT TCTCGGTCTC GACGGTACTG
101 TATGGGCTCA GAGCGCTAAG TTTCCACAGT TTAAACCTGA GGAGATGAAA
55 151 GGCATCATTA AGGAATTCGA CGAAGCTGGT ACTCTTGCTC CAACAGGTAT
201 GTTCATCGCG GGTGCAAAAT ATATGGTACT CCAAGGAGAG CCTGGAGCTG
251 TTATCCGTGG AAAGAAGGGA GCTGGAGGAA TATGCATCAA GAAAACGGGC
60 301 CAAGCTATGA TTATGGGAAT TTACGACGAG CCCGTTGCTC CTGGACAATG
351 CAACATGGTT GTTGAGAGGC TCGGTGACTA CCTCTAATGA
```

ES 2 125 202 B1

(26) SECUENCIA 26: SEQ ID NO:26

Fragmento de 128 aminoácidos proveniente de la traducción de SEQ ID NO:25 (ADNc HaPRO5) de *Helianthus annuus*.

5

```

1 MSWQTYVDEH LMCDIEGTGQ HLTAAAILGL DGTVWAQSAK FPQFKPEEMK
51 GIIKEFDEAG TLAPTGMFIA GAKYMLQGE PGAVIRGKKG AGGICIKKTG
101 QAMIMGIYDE PVAPGQCNMV VERLGDYL

```

(27) SECUENCIA 27: SEQ ID NO:27

Fragmento de 390 nucleótidos de ADNc HaPRO6 proveniente de ARNm de *Helianthus annuus*.

15

```

1 ATGTCGTGGC AGACGTACGT CGATGAACAC TTGATGTGCG ACATTGAAGG
51 TACTGGCCAG CATCTCACAT CTGCCGCTAT TCTCGGTCTC GACGGTACTG
101 TTTGGGCTCA GAGCGCTAAG TTTCCACAGT TTAAACCTGA GGAGATGAAA
151 GGCATCATTA AGGAATTCGA CGAAGCTGGT ACTCTTGCTC CAACAGGTAT
201 GTTCATCGCG GGTGCAAAAT ATATGGTACT CCAAGGAGAG CCTGGAGCTG
251 TTATCCGTGG AAAGAAGGGA GCTGGAGGAA TATGCATCAA GAAAACGGGC
301 CAAGCTATGA TTATGGGAAT TTACGACGAG CCCGTTGCTC CTGGACAATG
351 CAACATTGTT GTTGAGAGGC TCGGTGACTA CCTCTAATGA

```

(28) SECUENCIA 28: SEQ ID NO:28

Fragmento de 128 aminoácidos proveniente de la traducción de SEQ ID NO:27 (ADNc HaPRO6) de *Helianthus annuus*.

35

```

1 MSWQTYVDEH LMCDIEGTGQ HLTAAAILGL DGTVWAQSAK FPQFKPEEMK
51 GIIKEFDEAG TLAPTGMFIA GAKYMLQGE PGAVIRGKKG AGGICIKKTG
101 QAMIMGIYDE PVAPGQCNIV VERLGDYL

```

(29) SECUENCIA 29: SEQ ID NO.:

Fragmento de 402 nucleótidos de ADNc MaPRO1 proveniente de ARNm de *Mercurialis annua*.

45

```

1 ATGTCGTGGC AGACGTACGT CGACGACCAT TTGATGTGCG ACATTGATGG
51 ACAAGGCCAG CATCTCGCCG CTGCTTCCAT TGTGGCCAC GACGGTAGCA
101 TTTGGGCTCA GAGCGCCTCT TTTCTCAGT TGAAACCAGA GGAGATCACC
151 GGCATTATGA AGGATTTTGA TGAGCCAGGT CATCTTGCTC CTACAGGCTT
201 GTACATTGCA GGCACAAAAT ATATGGTTAT CCAGGGCGAA AGTGGCGCTG
251 TAATCCGTGG AAAGAAGGGA TCGGGAGGGA TCACTATAAA GAAACTGGC
301 CAAGCTCTTG TGTTCGGAAT CTACGAGGAG CCGGTAAGTC CGGGACAGTG
351 CAACATGGTG GTTGAGAGGC TCGGTGACTA CCTCATAGAA CAAGGCATGT
401 AA

```

ES 2 125 202 B1

(30) SECUENCIA 30: SEQ ID NO: 30

Fragmento de 133 aminoácidos proveniente de la traducción de SEQ ID NO:29 (ADNc MaPRO1)
Mercurialis annua.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

```
1      MSWQTYVDDH LMCDIDGQQQ HLAAASIVGH DGSIWAQSAS FPQLKPEEIT
51     GIMKDFDEPG HLAPTGLYIA GTKYMVIQGE SGAVIRGKKG SGGITIKKTG
101    QALVFGIYEE PVTPGQCNMV VERLG DY LIE QGM
```

REIVINDICACIONES

1. Moléculas de ADN recombinante **caracterizadas** porque codifican para un polipéptido que tiene al menos un epitopo del alérgeno profilina, de plantas seleccionadas del grupo formado por *Cynodon dactylon*, *Pheleum pratense*, *Parietaria judaica*, *Helianthus annuus*, *Olea europaea* y *Mercurialis annua*.
5
2. Molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1, **caracterizada** por ser un fragmento de 396 nucleótidos de ADNc proveniente de ARNm de *Cynodon dactylon* con la SEQ ID NO: 1.
3. Molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1, **caracterizada** por ser un fragmento de 396 nucleótidos de ADNc PpPRO3 proveniente de ARNm de *Pheleum pratense* con la SEQ ID NO: 3.
10
4. Molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1, **caracterizada** por ser un fragmento de 399 nucleótidos de ADNc PjPRO1 proveniente de ARNm de *Parietaria judaica* con la SEQ ID NO: 9.
5. Molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1, **caracterizada** por ser un fragmento de 405 nucleótidos de ADNc OePRO1 proveniente de ARNm de *Olea europaea* con la SEQ ID NO: 11.
15
6. Molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1, **caracterizada** por ser un fragmento de 402 nucleótidos de ADNc HaPRO2 proveniente de ARNm de *Helianthus annuus* con la SEQ ID NO: 19.
20
7. Molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1, **caracterizada** por ser un fragmento de 402 nucleótidos de ADNc MaPRO1 proveniente de ARNm de *Mercurialis annua* con la SEQ ID NO: 29.
8. Moléculas polipeptídicas de alérgenos profilínicos recombinantes útiles para el diagnóstico y tratamiento convencional de alergias polínicas, **caracterizadas** porque contienen al menos un epitopo del alérgeno profilina de plantas seleccionadas del grupo formado por *Cynodon dactylon*, *Pheleum pratense*, *Parietaria judaica*, *Helianthus annuus*, *Olea europaea* y *Mercurialis annua*.
25
9. Molécula polipeptídica recombinante, según la reivindicación 16, **caracterizada** por ser un fragmento de 132 aminoácidos proveniente de la SEQ ID NO: 1 de *Cynodon dactylon*, correspondiente a la SEQ ID NO: 2.
30
10. Molécula polipeptídica recombinante, según la reivindicación 16, **caracterizada** por ser un fragmento de 131 aminoácidos proveniente de la traducción de la SEQ ID NO: 3 (ADNc PpPRO3) de *Pheleum pratense*, correspondiente a la SEQ ID NO: 4.
35
11. Molécula polipeptídica recombinante, según la reivindicación 16, **caracterizada** por ser un fragmento de 132 aminoácidos proveniente de la traducción de la SEQ ID NO: 9 (ADNc PjPRO1) de *Parietaria judaica*, correspondiente a la SEQ ID NO: 10.
40
12. Molécula polipeptídica recombinante, según la reivindicación 16, **caracterizada** por ser un fragmento de 134 aminoácidos proveniente de la traducción de la SEQ ID NO: 11 (ADNc OePRO1) de *Olea europaea*, correspondiente a la SEQ ID NO: 12.
13. Molécula polipeptídica recombinante, según la reivindicación 16, **caracterizada** por ser un fragmento de 133 aminoácidos proveniente de la traducción de la SEQ ID NO: 19 (ADNc HaPRO2) de *Helianthus annuus*, correspondiente a la SEQ ID NO: 20.
45
14. Molécula polipeptídica recombinante, según la reivindicación 16, **caracterizada** por ser un fragmento de 134 aminoácidos proveniente de la traducción de la SEQ ID NO: 29 (ADNc MaPRO1) de *Mercurialis annua*, correspondiente a la SEQ ID NO: 30.
50
15. Un vehículo microbiano de expresión en un organismo hospedador transformado que sea autorreplicable y sirva para expresar el ADN de las reivindicaciones 1 a 7 para producir los polipéptidos indicados en las reivindicaciones 8 a 14.
55
16. Un organismo hospedador, tanto eucariota como procariota, transformado con el vehículo de expresión capaz, en dicho organismo, de autorreplicable y sirva para expresar el ADN de las reivindicaciones 1 a 7 para producir los polipéptidos indicados en las reivindicaciones 8 a 14.
60
17. Un organismo hospedador según la reivindicación 16, que puede ser *Escherichia coli*.

18. Un método para producir un polipéptido que contenga al menos un epítipo de los alérgenos profilínicos, que implique el cultivo del organismo hospedador conteniendo el vehículo de expresión microbiano, que en el organismo mencionado se autorreplique y sirva para expresar el ADN de las reivindicaciones 1 a 7.

19. Un preparado que contenga un polipéptido con al menos un epítipo de los alérgenos profilínicos mencionados y producido por el método según la reivindicación 18.

20. Un preparado que contenga un polipéptido con al menos un epítipo de los alérgenos profilínicos mencionados y producido por síntesis química según las secuencias SEQ ID Nos: 2, 4, 10, 12, 20 y 30.

21. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1 a 14 para el diagnóstico in vitro de alergias.

22. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1 a 14 para la producción de vacunas destinadas al tratamiento convencional de alergias.

23. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1 a 14, para la producción de péptidos que constituyen epítipos de células T capaces de actuar como vacunas con actividad anergizante (supresora de la respuesta Th2).

24. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1 a 14, para la producción de isoformas recombinantes mutantes que no den lugar a fijación de IgE para el tratamiento de alergias con reducida capacidad de producción de efectos adversos.

ES 2 125 202 B1

ATGTCGTGGCAGGCGTACGTGGACGACCACCTCATGTGCGAGATCGAGGGACATCACCTC	60
M S W Q A Y V D D H L M C E I E G H H L	20
ACCTCCGCCGCCATCATCGGCCATGACGGCACCGTCTGGGCTCAGAGCGCCGCCTTCCCG	120
T S A A I I G H D G T V W A Q S A A F P	40
GCGTTCAAGCCTGAGGAGATGGCCAACATCATGAAGGACTTCGACGAGCCCGGGTTTCTT	180
A F K P E E M A N I M K D F D E P G F L	60
GCACCCACCGGCCTCTTCCTCGGCCCCACCAAGTACATGGTCATCCAGGGCGAGCCCCGC	240
A P T G L F L G P T K Y M V I Q G E P G	80
GCCGTCATCCGCGGAAAGAAGGGATCAGGTGGTGTCACTGTGAAGAAGACTGGTCAGGCT	300
A V I R G K K G S G G V T V K K T G Q A	100
CTTGTGATCGGCATCTACGACGAGCCAATGACCCCCGGACAGTGCAACATGGTGATCGAG	360
L V I G I Y D E P M T P G Q C N M V I E	120
AAGCTCGGCGATTACCTCATTGAACAAGGCATGTAA	396
K L G D Y L I E Q G M *	132

Fig. 1

1 ATGTCGTGGCAGGCGTACGTTGATGATCATTTGATGTGTGACATTTGAGGGCCATGAAGACCAACCGCCTCAACCGAGCTGCCATCGTGGGCCATGACGGTTCT 102
1 M S W Q A Y V D D H L M C D I E G H E D H R L T A A A I V G H D G S 34
OePRO2 -G-
OePRO3 -G-
G

103 GTTTGGGCTCAGAGCGCTACCTTCCCTCAGTTCAAGCCAGAGAGATGAATGGAATTAAGACAGATTTCAATGAACCTGGTCTATCTGGCACCAACAGGCCTA 204
35 V W A Q S A T F P Q F K P E E M N G I M T D F N E P G H L A P T G L 68
205 CATCTTGGAGGAACAAGTATATGGTGATTCAAGGAGAGGCTGGAGCTGTCTATCCGTGGAAGAAGGATCTGGTGGTATTACCATTAAGAAGACTGGCCAA 306
69 H L G G T K Y M V I Q G E A G A V I R G K K G S G G I T I K T G Q 102
OePRO2 --C
OePRO3

307 GCACTAGTTTTTGGTATCTACGAGGAGCCTGTAACTCCAGGACAATGCAACATGGTTGTCGAGAGGTTGGGAGACTACCTGGTCTGAAACAAGGCATGTAA 405
103 A L V F G I Y E E P V T P G Q C N M V V E R L G D Y L V E Q M * 135
OePRO2 C-T
OePRO3 C-A
L L

Fig. 2

ATG TCG TGG CAG ACG TAC GTG GAC GAG GAC CTG ATG TGC GAG ATC GAG GGC CAT CAC CTC	60
Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Glu Ile Glu Gly His Leu	20
GCC TCC GCG GCC ATC TTC GGC CAC GAC GGC ACC GTC TGG GCC CAG AGC GCC GAC TTC CCC	120
Ala Ser Ala Ala Ile Phe Gly His Asp Gly Thr Val Trp Ala Gln Ser Ala Asp Phe Pro	40
CAG TTC AAG CCT GAG GAG ATC ACC GGC ATC ATG AAG GAT TTG GAC GAG CCG GGC CAC CTC	180
Gln Phe Lys Pro Glu Glu Ile Thr Gly Ile Met Lys Asp Leu Asp Glu Pro Gly His Leu	60
Gly	
G	
GCC CCC ACC GGC ATG TTC GTC GCA GCT GCC AAG TAC ATG GTC ATC CAG GGT GAA CCC GGC	240
Ala Pro Thr Gly Met Phe Val Ala Ala Ala Lys Tyr Met Val Ile Gln Gly Glu Pro Gly	80
GCG GTC ATC CGT GGC AAG AAG GGA GCA GGA GGC ATC ACC ATA AAG AAG ACA GGC CAG GCG	300
Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly Ala Gly Ile Thr Ile Lys Lys Thr Gly Gln Ala	100
C	
CTG GTT GTC GGC ATC TAC GAT GAG CCC ATG ACC CCT GGC CAG TGC AAC ATG GTG GAG	360
Leu Val Val Gly Ile Tyr Asp Glu Pro Met Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Val Val Glu	120
AGG CTT GGC GAC TAC CTC GTT GAA CAA GGC ATG TAG	396
Arg Leu Gly Asp Tyr Leu Val Glu Gln Gly Met End	132

Fig. 3

ATG	TCG	TGG	CAG	GCG	TAC	GTT	GAT	GAC	CAC	CTT	ATG	TGC	GAC	GTC	GGC	GAC	GGC	AAT	ACA
Met	Ser	Trp	Gln	Ala	Tyr	Val	Asp	His	Leu	Met	Cys	Asp	Val	Gly	Asp	Gly	Asn	Thr	
Leu																			
T																			
CCC	GCT	TCC	GCC	GCT	ATC	ATC	GAT	GAT	GGC	AGC	GTT	TGG	GCT	CAG	AGC	GCT	AAC	TTC	
Pro	Ala	Ser	Ala	Ala	Ile	Ile	His	Asp	Gly	Ser	Val	Trp	Ala	Gln	Ser	Ala	Asn	Phe	
CCT	CAG	TTG	AAG	CCA	GAA	GAG	GTT	ACT	GGA	ATC	ATG	AAT	GAT	TTT	AAT	GAA	GCT	GGG	TTT
Pro	Gln	Leu	Lys	Pro	Glu	Glu	Val	Thr	Gly	Ile	Met	Asn	Asp	Phe	Asn	Glu	Ala	Gly	Phe
CTT	GCC	CCA	ACC	GGG	TTG	TTC	CTT	GGA	GGT	ACA	AAG	TAT	ATG	GTG	ATC	CAA	GGG	GAG	TCT
Leu	Ala	Pro	Thr	Gly	Leu	Phe	Leu	Gly	Gly	Thr	Lys	Tyr	Met	Val	Ile	Gln	Gly	Glu	Ser
GGA	GCC	GTG	ATT	CGT	GGG	AAG	AAG	GGT	TCT	GGA	GGT	GCC	ACT	TTG	AAG	AAA	ACT	GGG	CAA
Gly	Ala	Val	Ile	Arg	Gly	Lys	Lys	Gly	Ser	Gly	Gly	Ala	Thr	Leu	Lys	Lys	Thr	Gly	Gln
GCA	ATT	GTT	ATT	GGC	ATT	TAC	GAC	GAG	CCA	ATG	ACC	CCA	GGA	CAA	TGC	AAT	TTG	GTA	GTA
Ala	Ile	Val	Ile	Gly	Ile	Tyr	Asp	Glu	Pro	Met	Thr	Pro	Gly	Gln	Cys	Asn	Leu	Val	
GAG	AGG	TTG	GGC	GAT	TAC	CTT	CTC	GAA	CAG	GGC	CTG	TAG							
Glu	Arg	Leu	Gly	Asp	Tyr	Leu	Leu	Glu	Gln	Gly	Leu	End							

Fig. 4 A

ATG TCG TGG CAG ACG TAC GTC GAC CAT TTG ATG TGC GAC ATT GAT GGA CAA GGC CAG 60
M S W Q T Y V D H L M C D I D G Q G Q 21
 CAT CTC GCC GCT GCT TCC ATT GTT GGC CAC GAC GGT AGC ATT TGG GCT CAG AGC GCC TCT 120
H L A A A S I V G H D G S I W A Q S A S 41
 TTT CCT CAG TTG AAA CCA GAG GAG ATC ACC GGC ATT ATG AAG GAT TTT GAT GAG CCA GGT 180
F P Q L K P E E I T G I M K D F D E P G 61
 CAT CTT GCT CCG ACA GGC TTG TAC ATT GCA GGC ACA AAA TAT ATG GTT ATC CAG GGC GAA 240
H L A P T G L Y I A G T K Y M V I Q G E 81
 AGT GGC GCT GTA ATC CGT GGA AAG AAG GGA TCG GGA GGG ATC ACT ATA AAG AAA ACT GGC 300
S G A V I R G K K G S G G I T I K K T G 101
 CAA GCT CTT GTG TTC GGA ATC TAC GAG GAG CCG GTA ACT CCG GGA CAG TGC AAC ATG GTG 360
Q A L V F G I Y E E P V T P G Q C N M V 121
 GTT GAG AGG CTC GGT GAC TAC CTC ATA GAA CAA GGC ATG TAA 402
V E R L G D Y L I E Q G M * 135

Fig. 4B

ES 2 125 202 B1

																	51
G221	ATG	TCG	TGG	CAG	GCG	TAC	GTC	GAT	GAA	CAC	TTG	ATG	TGC	GAC	ATT	GAA	GGT
G216	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G2	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G6	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G4	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G8	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
																	102
G221	ACT	GGC	CAG	CAT	CTC	ACA	TCT	GCC	GCT	ATT	CTC	GGT	CTC	GAC	GGT	ACT	GTT
G216	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G4	---	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G6	---	---	---	---	---	---	C--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A
																	153
G221	TGG	GCT	CAG	AGC	GCT	AAG	TTT	CCA	CAG	TTT	AAA	CCT	GAG	GAG	ATG	AAA	GCC
G216	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C	---	C	---	---	---	---
G4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
																	204
G222	ATC	ATT	AAG	GAA	TTC	GAC	GAA	GCT	GGT	ACT	CTT	GCT	CCA	ACA	GGT	ATG	TTC
G216	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G2	---	---	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T
G6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
																	255
G221	ATC	GCG	GGT	GCA	AAA	TAT	ATG	GTA	CTC	CAA	GGA	GAG	CCC	GGA	GCT	GTT	ATC
G216	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
																	306
G221	CGT	GGA	AAG	AAG	GGA	GCT	GGA	GGA	ATA	TGC	ATC	AAG	AAA	ACG	GGC	CAA	GCT
G216	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Fig. 5A

ES 2 125 202 B1

357

G221	ATG	ATT	ATG	GGA	ATT	TAC	GAC	GAG	CCC	GTT	GCT	CCT	GGA	CAA	TGC	AAC	ATG
G216	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T
G2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

402

G221	GTT	GTT	GAG	AGG	CTT	GGC	GAT	TAC	CTG	CTC	GAA	CAA	GGC	ATG	TAA
G216	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G4	---	---	---	---	--C	--T	--C	---	--C	---	---	---	---	---	---
G8	---	---	---	---	--C	--T	--C	---	--C	---	---	---	---	---	---
G2	---	---	---	---	--C	--T	--C	---	--C	---	---	---	---	---	---
G6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Fig. 5A (cont.)

ES 2 125 202 B1

	1				50
G217	MSWQAYVDEH	LMCDIEGTGQ	HLTSAAILGL	DGTVWAQSAK	FPQFKPEEMK
G221	-----	-----	-----	-----	-----
G4	-----	-----H	-----	-----	-----
G8	-----	-----	-----	-----	-----
G2	-----	-----	-----	-----	-----
G6	-----	-----	---P-----	-----	-----
	51				100
G217	GIIKEFDEAG	TLAPTGMFIA	GAHYMVLQGE	PGAVIRGKKG	AGGICIKKTG
G221	-----	-----	-----	-----	-----
G4	-----	-----	-----	-----	-----
G8	-----	-----	-----	-----	-----
G2	---G-----	-----	-----	-----	-----
G6	-----	-----	-----	-----	-----
	101			133	
G217	QAMIMGIYDE	PVAPGQCNMV	VERLGDYLLE	QGM	
G221	-----	-----	-----	---	
G4	-----	-----	-----		
G8	-----	-----I-	-----		
G2	-----	-----	-----		
G6	-----	-----	-----		

Fig. 5B

ES 2 125 202 B1

	1				50
G217t7	MSWQAYVDEH	LMCDIEG.TG	QHLTSAAILG	LDGTVWAQSA	KFPQFKPEEM
G221t7	MSWQAYVDEH	LMCDIEG.TG	QHLTSAAILG	LDGTVWAQSA	KFPQFKPEEM
G4	MSWQTYVDEH	LMCDIEG.TG	HHLTSAAILG	LDGTVWAQSA	KFPQFKPEEM
G8	MSWQTYVDEH	LMCDIEG.TG	QHLTSAAILG	LDGTVWAQSA	KFPQFKPEEM
G2	MSWQTYVDEH	LMCDIEG.TG	QHLTSAAILG	LDGTVWAQSA	KFPQFKPEEM
G6	MSWQTYVDEH	LMCDIEG.TG	QHLTPAAILG	LDGTVWAQSA	KFPQFKPEEM
Pa12	MSWQAYVDDH	LMCDVGD..G	NTLASAAIIG	HDGSVWAQSA	NFPQLKPEEV
Pa8	MSWQAYVDDH	LMCDVGD..G	NTPASAAIIG	HDGSVWAQSA	NFPQLKPEEV
O11	MSWQAYVDDH	LMCDIEGHEG	HRLTAAAIIG	HDGSVWAQSA	TFPQFKPEEM
O3	MSWQAYVDDH	LMCDIEGHEG	HRLTAAAIIG	HDGSVWAQSA	TFPQFKPEEM
O1	MSWQAYVDDH	LMCDIEGHED	HRLTAAAIIG	HDGSVWAQSA	TFPQFKPEEM
Betula	MSWQTYVDEH	LMCDIDGQAS	NSL.ASAIVG	HDGSVWAQSS	SFPQFKPQEI
Nicotiana	MSWQTYVDDH	LMADIEGQQG	HHLAAAAILG	HDGSVWAQSS	TFPKFKPEEI
Triticum1	MSWQTYVDDH	LCCEIDGQ..	.HLTSAAILG	HDGSVWTESP	NFPKFKPEEI
Triticum2	MSWQAYVDDH	LCCEIDGQ..	.HLTSAAILG	HDGSVWAESP	NFPKFKPEEI
Hordeum	MSWQTYVDDH	LCCEIDGQ..	.HLTSAAILG	HDGRVWVQSP	NFPQFKPEEI
Triticum3	MSWKAYVDDH	LCCEIDGQ..	.NLTSAAILG	HDGSVWAQSP	NFPQFKPEEN
P12	MSWQTYVDEH	LMCEIEGH..	.HLASAAILG	HDGTVWAQSA	DFPQFKPEEI
P9	MSWQTYVDEH	LMCEIEGH..	.HLASAAIFG	HDGTVWAQSA	DFPQFKPEEI
Phleum	MSWQTYVDEH	LMCEIEGH..	.HLASAAILG	HDGTVWAQSA	DFPQFKPEEI
Zea1	MSWQTYVDEH	LMCEIEGH..	.HLTSAAIVG	HDGATWAQST	AFPEFKPEEM
Zea2	MSWQAYVDEH	LMCEIEGH..	.HLASAAIVG	HDGAAWAQST	AFPEFKTEDM
C9	MSWQAYVDDH	LMCEIEGH..	.HLTSAAIIG	HDGTVWAQSA	AFPAFKPEEM
Zea3	MSWQTYVDEH	LMCEIEGH..	.HLSSAAIVG	HDGAVWAQST	AFQFKPEEM
Phaseolus	MSWQTYVDDH	LLCEIEGN..	.HLTHAAILG	QDGSVWAKSA	SFPQFKPEEI
	51				100
G217t7	KGIIKEFDEA	GTLAPTGMFI	AGAKYMLVQG	EPGAVIRGKK	GAGGICIKKT
G221t7	KGIIKEFDEA	GTLAPTGMFI	AGAKYMLVQG	EPGAVIRGKK	GAGGICIKKT
G4	KGIIKEFDEA	GTLAPTGMFI	AGAKYMLVQG	EPGAVIRGKK	GAGGICIKKT
G8	KGIIKEFDEA	GTLAPTGMFI	AGAKYMLVQG	EPGAVIRGKK	GAGGICIKKT
G2	KGIIKEFDEA	GTLAPTGMFI	AGAKYMLVQG	EPGAVIRGKK	GAGGICIKKT
G6	KGIIKEFDEA	GTLAPTGMFI	AGAKYMLVQG	EPGAVIRGKK	GAGGICIKKT
Pa12	TGIMNDFNEG	GFLAPTGLFL	GGTKYMVIQG	ESGAVI.GKK	GSGGATLKKT
Pa8	TGIMNDFNEA	GFLAPTGLFL	GGTKYMVIQG	ESGAVIRGKK	GSGGATLKKT
O11	NGIMTDFNEP	GHLAPTGLHL	GGTKYMVIQG	EAGAVIRGKK	GSGGITIKKT
O3	NGIMTDFNEP	GHLAPTGLHL	GGTKYMVIQG	EAGAVIRGKK	GSGGITIKKT
O1	NGIMTDFNEP	GHLAPTGLHL	GGTKYMVIQG	EAGAVIRGKK	GSGGITIKKT
Betula	TGIMKDFEEP	GHLAPTGLHL	GGIKYMVIQG	EAGAVIRGKK	GSGGITIKKT
Nicotiana	TNIMKDFDEP	GHLAPTGLFL	GGAKYMVIQG	EPGAVIRGKK	GSGGITIKKT
Triticum1	AGIVKDFEEP	GHLAPTGLFL	GGTKYMVIQG	EPGVVIRGKK	GTGGITIKKT
Triticum2	AGIVKDFEEP	GHLAPTGLFL	GGTKYMVIQG	EPGVVIRGKK	GTGGITIKKT
Hordeum	AGIIKDFDEP	GHLAPTGLFL	GGTKYMVIQG	EPGVVIRGKK	GTGGITIKKT
Triticum3	AGIVKDFEEP	GHLAPTGLFL	GGTKYMVIQG	EPGVVIRGKK	GTGGITIKKT
P12	TGIMKDFDEP	GHLAPTGMFV	AGAKYMVIQG	EPGAVIRGKK	GAGGITIKKT
P9	TGIMKDLDEP	GHLAPTGMFV	AAAKYMVIQG	EPGAVIRGKK	GAGGITIKKT
Phleum	TGIMKDFDEP	GHLAPTGMFV	AGAKYMVIQG	EPGRVIRGKK	GAGGITIKKT
Zea1	AAIMKDFDEP	GHLAPTGLIL	GGTKYMVIQG	EPGAVIRGKK	GSGGITVKKT
Zea2	ANIMKDFDEP	GHLAPTGLFL	GPTKYMVIQG	EPGAVIRGKK	GSGGITVKKT
C9	ANIMKDFDEP	GFLAPTGLFL	GPTKYMVIQG	EPGAVIRGKK	GSGGVTVKKT
Zea3	TNIIKDFDEP	GFLAPIGLFL	GPTKYMVIQG	EPGAVIRGKK	GSGGITVKKT
Phaseolus	TGIMNDFNEP	GTLAPTGLYI	GGTKYMVIQG	EPGSVIRGKK	GPGGVTVKKT

	101				144
G217t7	GQAMIMGIYD	EPVAPGQCNM	VVERLGDYLL	EQGM*.....	
G221t7	GQAMIMGIYD	EPVAPGQCNM	VVERLGDYLL	EQGM*.....	
G4	GQAMIMGIYD	EPVAPGQCNM	VVERLGDYL.		
G8	GQAMIMGIYD	EPVAPGQCNI	VVERLGDYL.		
G2	GQAMIMGIYD	EPVAPGQCNM	VVERLGDYL.		
G6	GQAMIMGIYD	EPVAPGQCNM	VVERLGDYL.		
Pa12	GQAIVIGIYD	EPMTPGQCNI	VVERLGDYLL	EQGM*.....	
Pa8	GQAIVIGIYD	EPMTPGQCNI	VVERLGDYLL	EQGL*.....	
O11	GQALVFGIYE	EPVTPGQCNM	VAERLGDYLL	EQGL*.....	
O3	GQALVFGIYE	EPVTPGQCNM	VVERLGDYLL	EQGL*.....	
O1	GQALVFGIYE	EPVTPGQCNM	VVERLGDYLV	EQGM*.....	
Betula	GQALVFGIYE	EPVTPGQCNM	VVERLGDYLI	DQGL.....	
Nicotiana	NQALIFGIYE	EPVTPGQCNM	VVEKIRDYLV	DQGY.....	
Triticum1	GMALILGIYD	EPMTPGQCNI	VVERLGDYLI	DQGYWVPSSN	
Triticum2	GMALILGIYD	EPMTPGQCNI	VVERLGDYLI	DQGYVVGSHH	HHHH
Hordeum	GMPLILGIYD	EPMTPGQCNI	VVERLGDYLV	EQGF*.....	
Triticum3	GMALILGIYD	EPMTPGQCNI	VVERLGDYLI	DQGYCGSHHH	HHH.
P12	GQALVVGIYD	EPMTPGQCNM	VVERLGDYLV	EQGM.....	
P9	GQALVVGIYD	EPMTPGQCNM	VVERLGDYLV	EQGM.....	
Phleum	GQALVVGIYD	EPMTPGQCNM	VVERLGDYLV	EQGM.....	
Zea1	GQSLIIGIYD	EPMTPGQCNI	VVERLGDYLL	EQGM.....	
Zea2	GQALVVGIYD	EPMTPGQCNM	VVERLGDYLL	EQGM.....	
C9	GQALVIGIYD	EPMTPGQCNM	VIEKLGDYLI	EQGM*.....	
Zea3	GQALVIGIYD	EPMTPGQCNM	VVERLGDYLV	EQGL.....	
Phaseolus	NLALVIGIYD	EPMTPGQCNM	IVERLGDYLI	EQGL.....	

Fig. 6

Fig 7

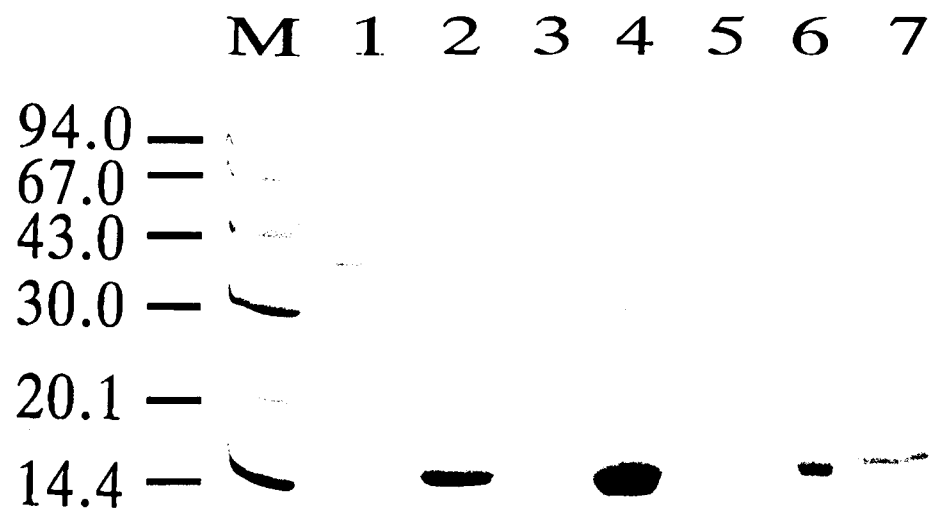
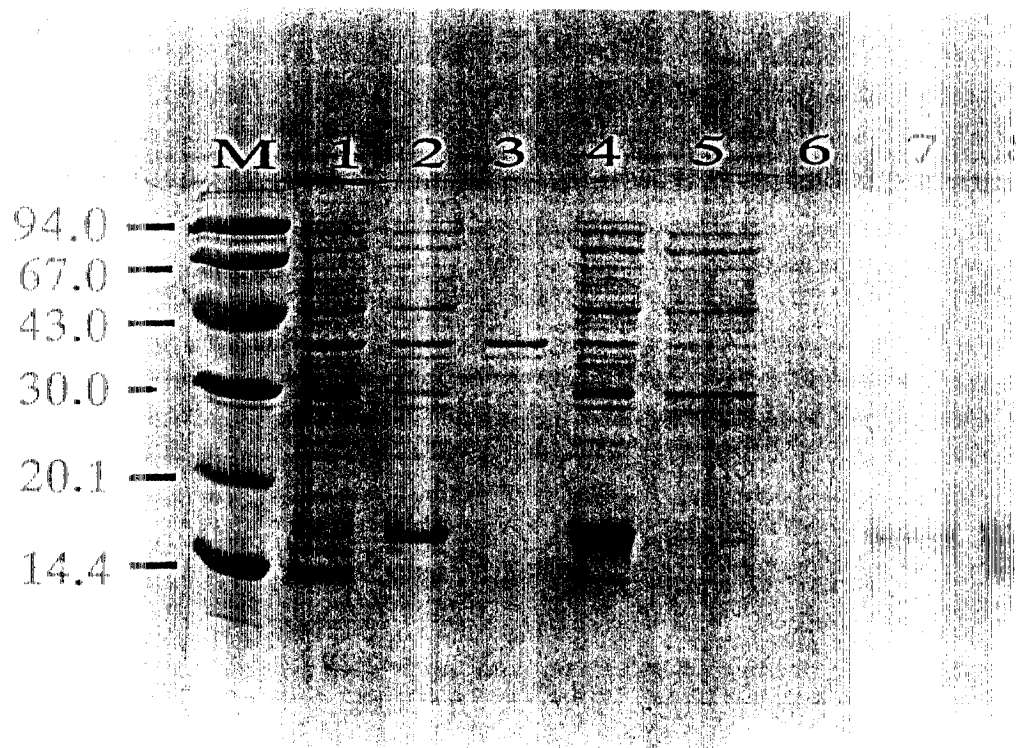


Fig. 8



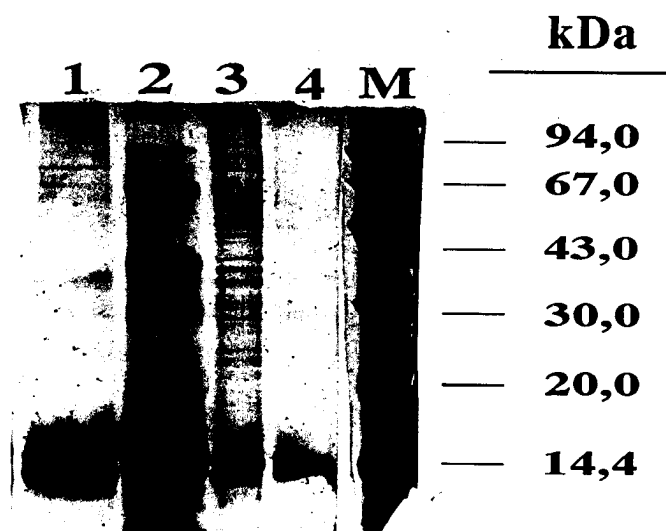


Fig. 10

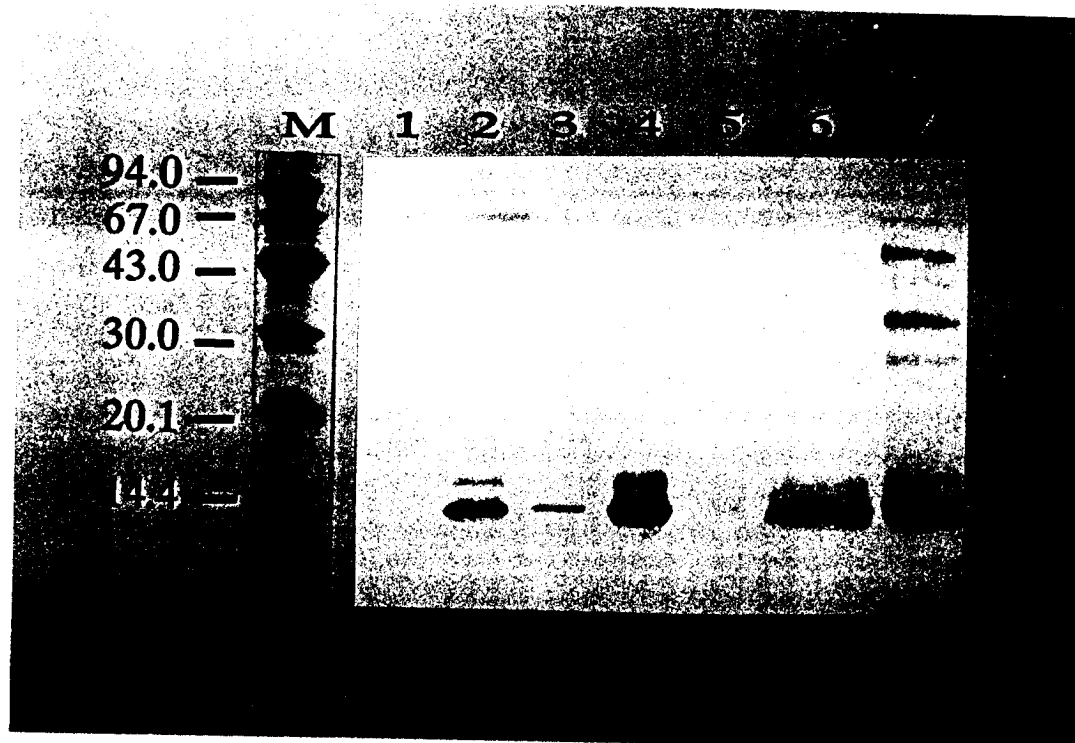


Fig. 11

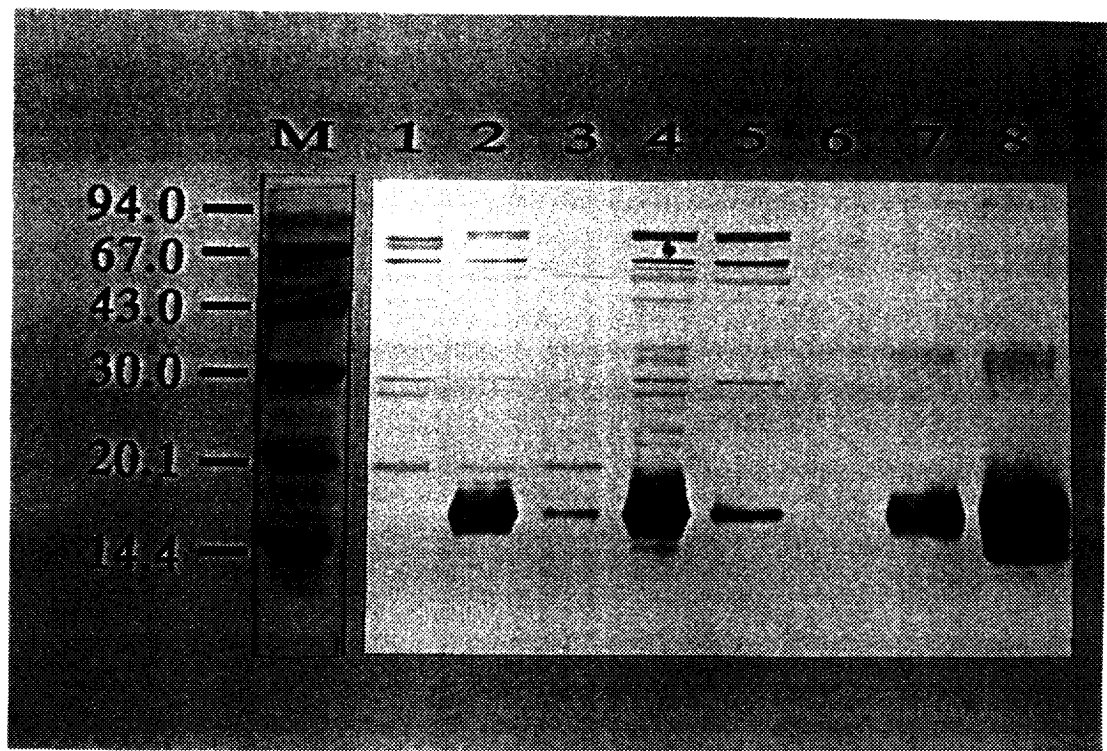


Fig. 12

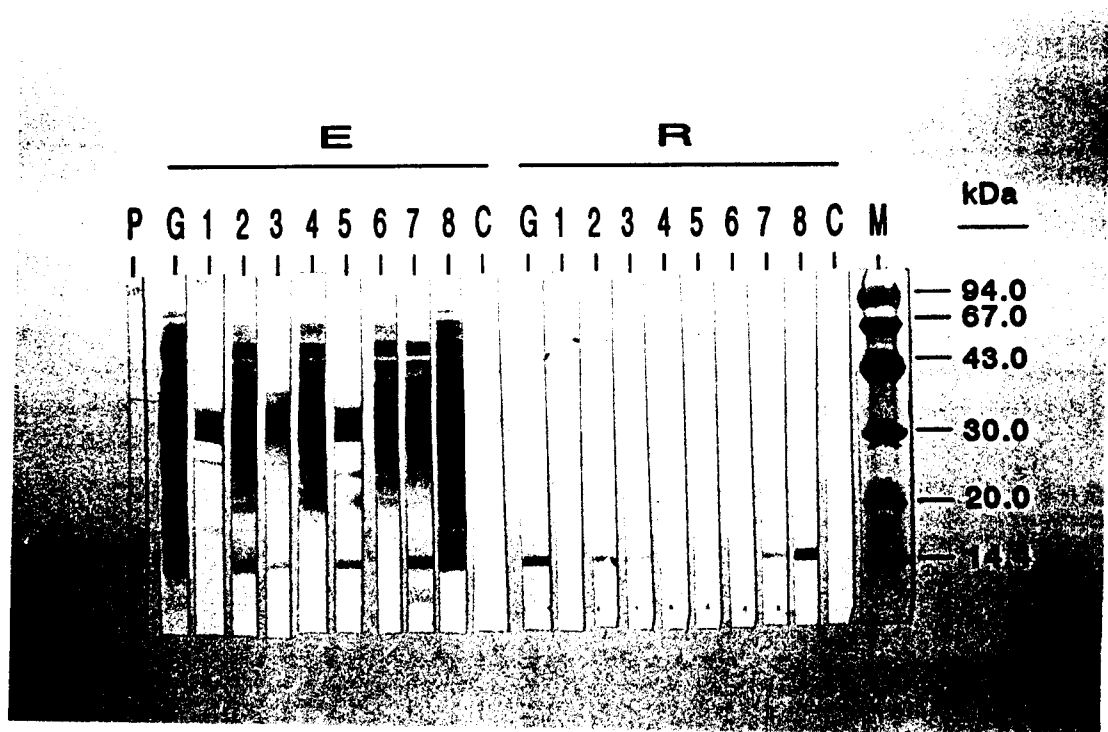


Fig. 13

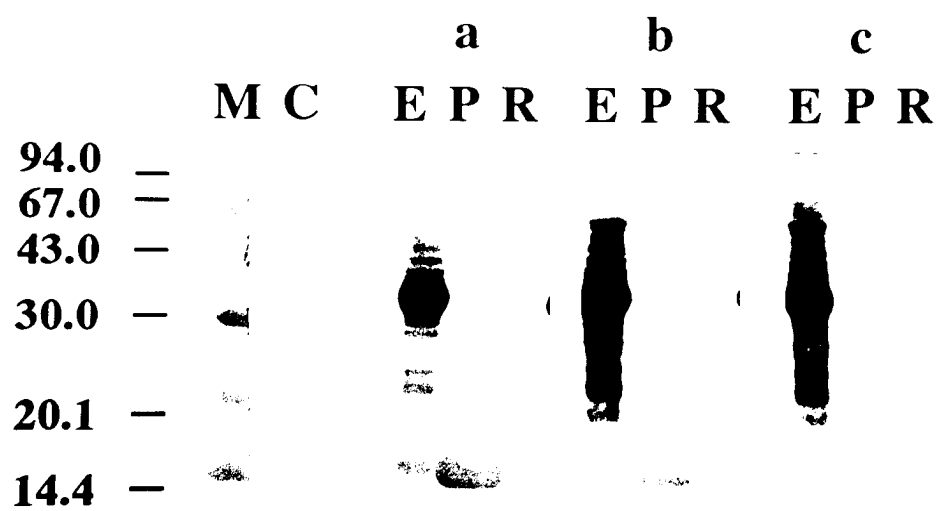


Fig. 14

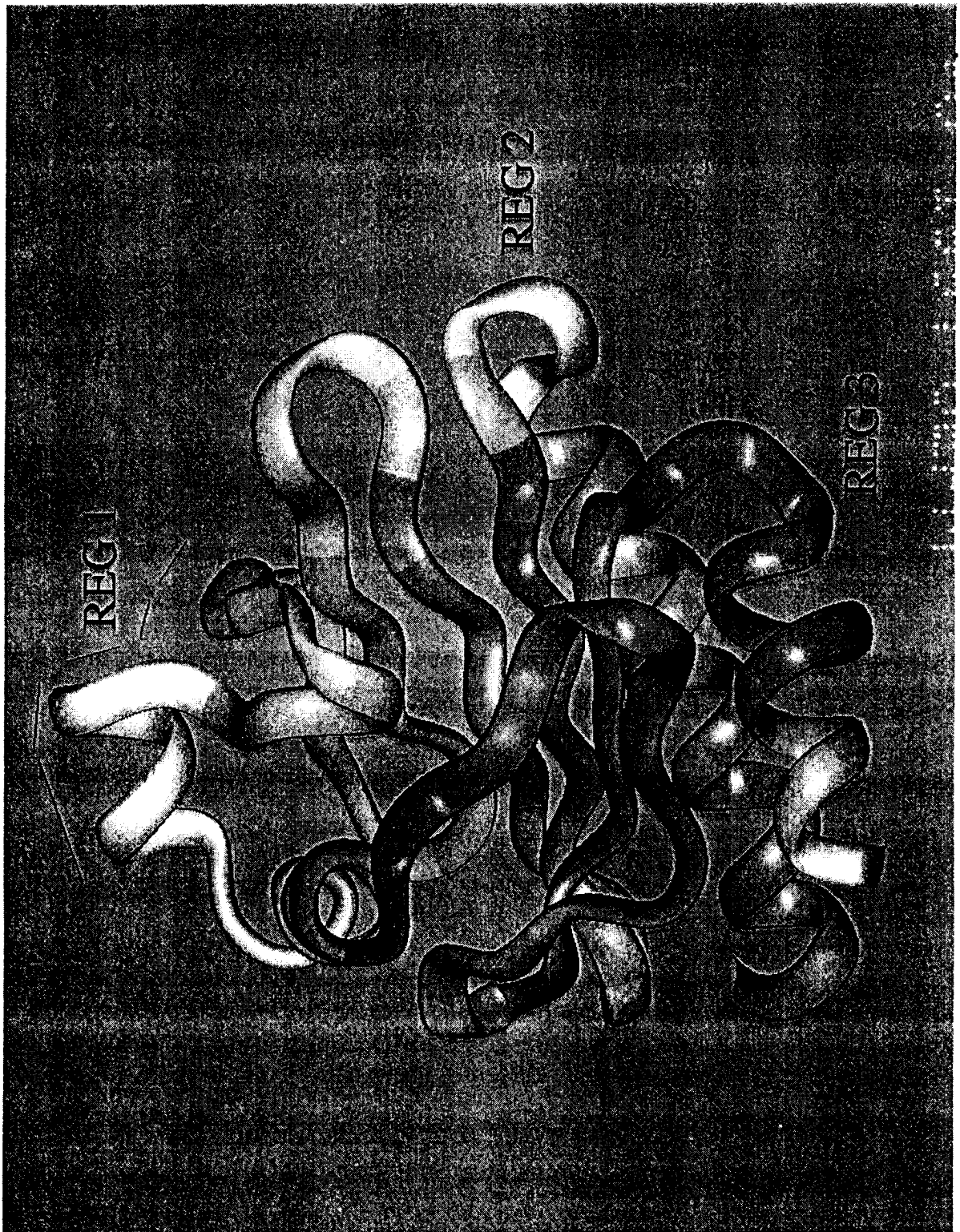
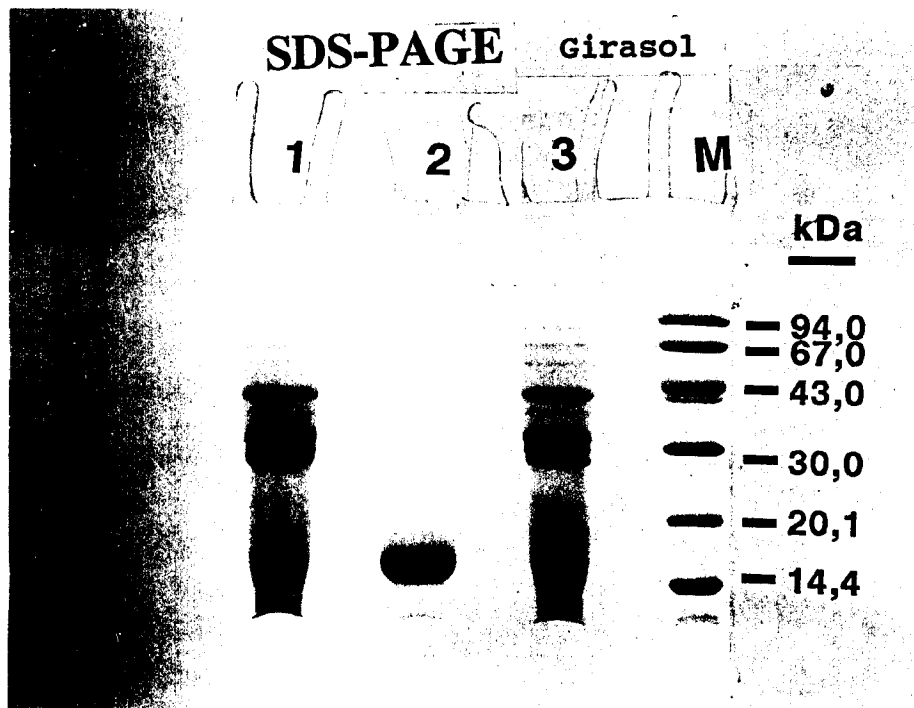


Fig. 15

	Péptido II (11→21)		Péptido I (55→70)		Péptido III (106→115)
<i>Phleum pratense</i>	MCEIEGH	HLAS.....	EPGHLAPTGMFVAGAK.....	DEPMTPGQCN	
<i>Cynodon dactylon</i>	-----	--T-	---F-----L-L-PT-	-----	
<i>Parietaria judaica</i>	--DVD-N	T---	-A-F-----L-LG-T-	-----	
<i>Helianthus annuus</i>	--D---TGQ	--T-	-A-T-----I----	---VA----	
<i>Olea europaea</i>	--D-----EGHR-TA		-----LHLG-T-	E--V-----	

Fig. 16



Cromatografía SMART (Gel filtración, columna Superdex 75 PC 3.2/30)
Fracción Profilina de Helianthus tras C. afinidad

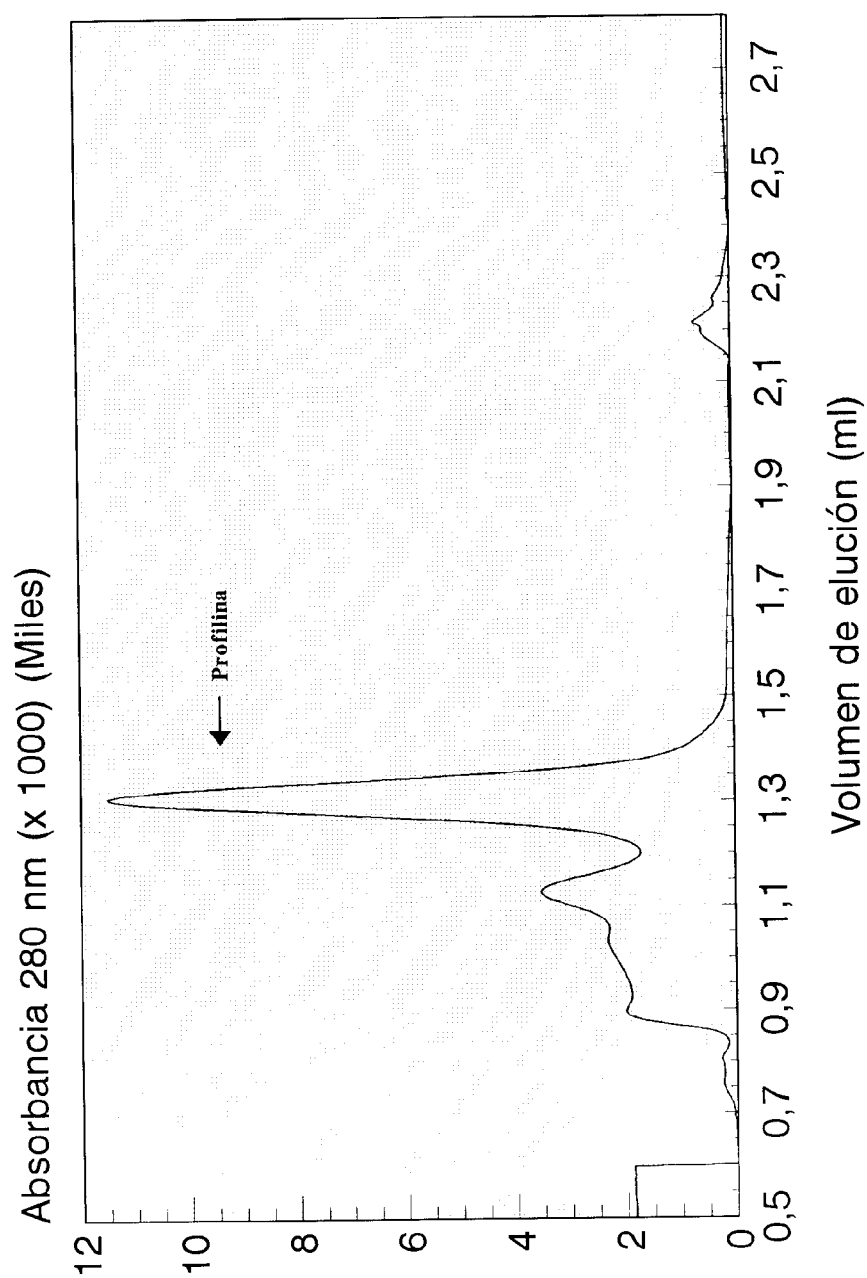
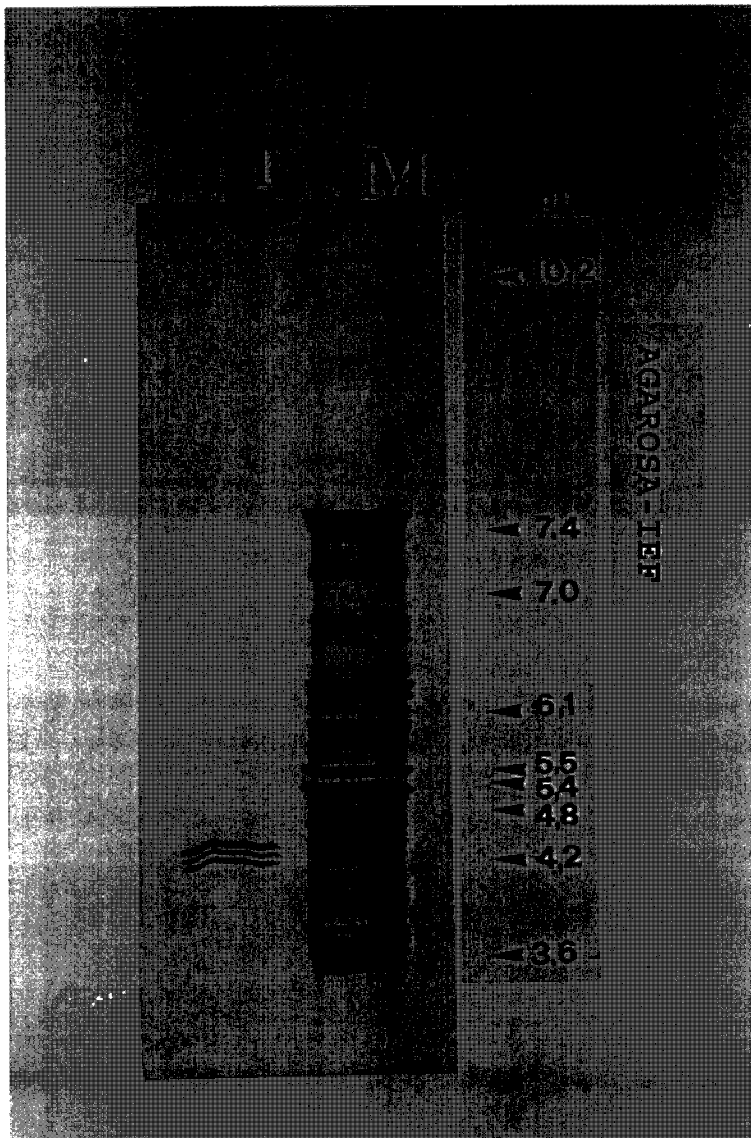


Fig. 18



ES 2 125 202 B1

	1				50
G217	MSWQAYVDEH	LMCDIEGTGQ	HLTSAAILGL	DGTVWAQSAK	FPQFKPEEMK
G221	-----	-----	-----	-----	-----
G4	-----	-----H	-----	-----	-----
G8	-----	-----	-----	-----	-----
G2	-----	-----	-----	-----	-----
G6	-----	-----	---P---	-----	-----

	51				100
G217	GIIKEFDEAG	TLAPTGMFIA	GAKYMVLQGE	PGAVIRGKKG	AGGICIKKTG
G221	-----	-----	-----	-----	-----
G4	-----	-----	-----	-----	-----
G8	-----	-----	-----	-----	-----
G2	---G---	-----	-----	-----	-----
G6	-----	-----	-----	-----	-----
	G** *	** *	***** *	***** *	
	*Q***	*****T*	*Q*****I***	*****	
	AP*	HW*			
	101				133
G217	QAMIMGIYDE	PVAPGQCNMV	VERLGDYLLE	QGM	
G221	-----	-----	-----	---	
G4	-----	-----	-----		
G8	-----	-----I-	-----		
G2	-----	-----	-----		
G6	-----	-----	-----		

Fig. 20

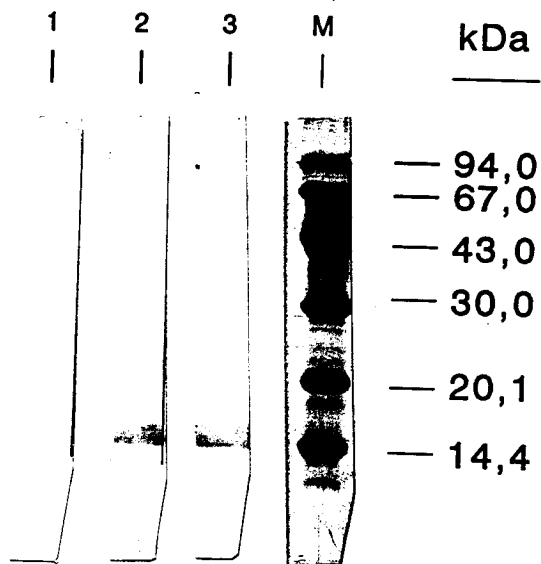


Fig. 21

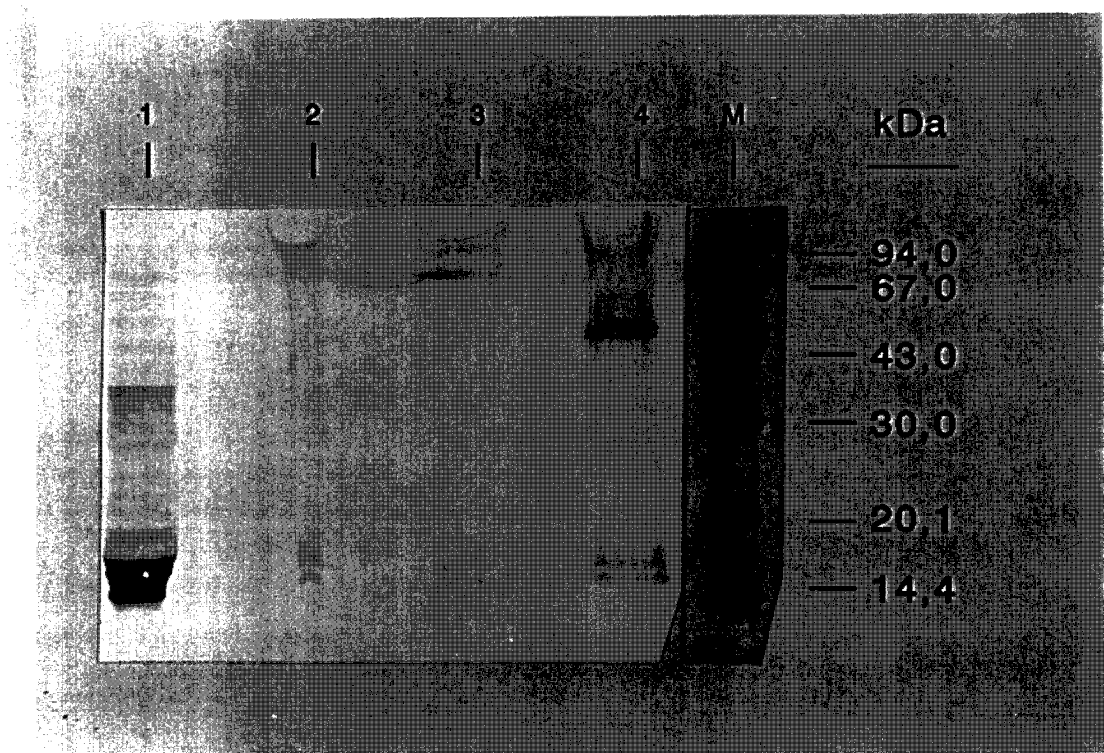


Fig. 22

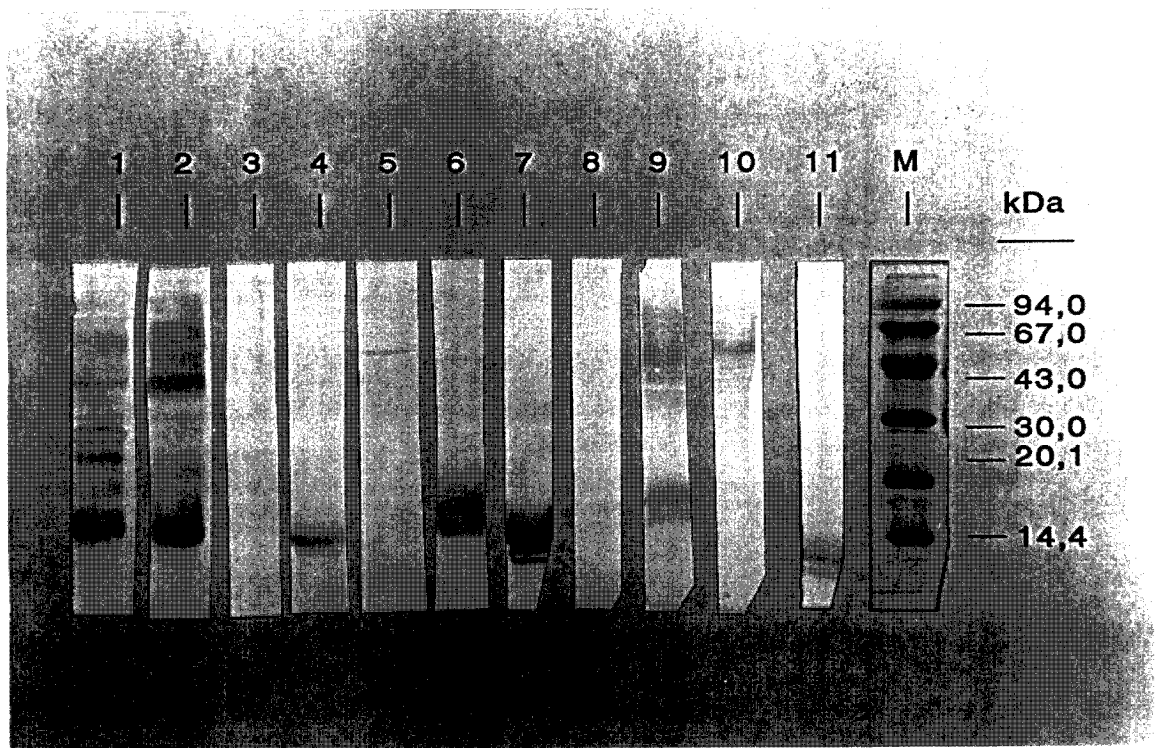


Fig. 23



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 125 202
⑫ N.º solicitud: 9701390
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	ASTURIAS, J.A. et al., "Recombinant DNA technology in Allergology: Cloning and expression of plant profilins", ALLERGOLOGIA ET IMMUNOPHATOLOGIA, 1997, Vol. 25, No. 3, págs. 127-134. Ver el documento completo	1-24
X	VALENTA, R. et al., "cDNA cloning and expression of timothy grass (Phleum pratense) pollen profilin in Escherichia coli: comparison with birch pollen profilin", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 1994, Vol. 199, No. 1, págs. 106-118. Ver el documento completo	1,3,8,10 15-24
X	ARILLA, M.C. et al., "Production and characterization of profilin monoclonal antibodies", ALLERGOLOGIA ET IMMUNOPHATOLOGIA, 1997, Vol. 25, No. 3, págs. 145-151. Ver el documento completo	8-14, 20-24
X	VALLVERDU, A. et al., "Mercurialis annua: Characterization of main allergens and cross-reactivity with other species", INT. ARCH. ALLERGY IMMUNOL., 1997, Vol. 112, págs. 356-364. Ver el documento completo	14,20-24
A	WO 9203551 A (BIOMAY BIOTECHNIK PRODUKTIONS & HANDELSGESELLSCHAFT) 05.03.1992 Ver el documento completo	1-24

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
1/1