



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 151 382**

⑫ Número de solicitud: 009800536

⑬ Int. Cl.⁷: C12N 15/29

C07K 14/415

A61K 39/35

G01N 33/53

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **12.03.1998**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.2000**

Fecha de concesión: **21.05.2001**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.07.2001**

⑱ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.07.2001

⑲ Titular/es:
BIAL INDUSTRIAL FARMACEUTICA, S.A.
Alameda de Urquijo, 20-27
48008 Bilbao, Vizcaya, ES

⑳ Inventor/es: **Palacios Peláez, Ricardo;**
Martínez Quesada, Jorge;
Martínez Garate, Alberto y
Asturias Ortega, Juan Andres

㉑ Agente: **Ungría López, Javier**

㉒ Título: **ADN recombinante que codifica para epitopos del alérgeno profilina de *Hevea brasiliensis* útil para el diagnóstico y tratamiento de alergia a látex.**

㉓ Resumen:

ADN recombinante que codifica para epitopos del alérgeno profilina de *Hevea brasiliensis* útil para el diagnóstico y tratamiento de alergia a látex.

La molécula de ADN recombinante tiene un fragmento de 396 nucleótidos de ADNc proveniente de ARNm de *Hevea brasiliensis*. Esta molécula codifica una molécula polipeptídica que contiene al menos un epítipo del alérgeno profilina de la planta del látex (*Hevea brasiliensis*).

El polipéptido puede obtenerse por cultivo de un organismo hospedador que contiene un vehículo de expresión microbiano que se autorreplica en dicho organismo y sirve para expresar la molécula de ADN. Estas moléculas recombinantes tienen aplicación en el diagnóstico y tratamiento de alergias, así como en la producción de vacunas.

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 2 151 382 B1

DESCRIPCION

ADN recombinante que codifica para epitopos del alérgeno profilina de *Hevea brasiliensis* útil para el diagnóstico y tratamiento de alergia a látex.

5 **Campo técnico de aplicación**

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 plantas, y causante de reacciones cruzadas. En la presente invención se proporciona una molécula de ADN recombinante que codifican para un polipéptido que tiene al menos un epitopo del alérgeno profilina de árbol de la familia de las euphorbiaceas (*Hevea brasiliensis*) del cual se obtiene la goma base de látex. Se describe también un método de producción de este polipéptido recombinante en un sistema de expresión heterólogo.

15 **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 [Miyamoto. 1991 Advances in Allergology and Clinical Immunology. Godard, Bousquet, and Michel. The Parthenon Publishing Group-Carnforth.]. Uno de los métodos actuales para remediar las manifestaciones alérgicas es la inmunoterapia. Este método consiste básicamente en modular la respuesta inmune en el paciente mediante la administración regular y en concentraciones crecientes de las proteínas que producen la alergia (extractos alérgicos).

Los métodos de diagnóstico de las enfermedades alérgicas, tales como RIA (immuno-radiometric assay), RAST (radio-allergosorbent test), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), inmunotransferencia, ensayos de liberación de histamina entre otros, dependen de la disponibilidad de alérgenos puros. Los extractos alérgicos aislados de fuentes naturales son complejas mezclas de proteínas y otras moléculas. Su composición, y por lo tanto alergenidad, depende del material usado, el cual varía según las condiciones ambientales, en el caso de los pólenes, la fase de maduración, en el caso de los hongos, las condiciones de crecimiento de los ácaros, etc. Incluso, algunos extractos pueden contener una concentración insuficiente de alérgenos mayores, pueden estar contaminados con componentes no deseados, frente a los cuales el paciente no es alérgico, o ambos. Además, alérgenos importantes pueden perderse durante la extracción debido a proteasas, y los procesos bioquímicos de purificación de alérgenos son laboriosos y costosos. Por estas razones, se ha prestado gran atención a la tecnología del ADN recombinante como una alternativa viable para la producción de alérgenos recombinantes, facilitando así su caracterización a nivel molecular, y su uso en diagnóstico y terapia [Scheiner & Kraft. 1995 Basic and practical aspects or recombinant allergens. Allergy. 50. pp.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 [Stewart. 1995 Asthma and Rhinitis. Busse and Holgate. Backwell Scientific Publications.].

El látex obtenido del árbol *Hevea brasiliensis*, es un material utilizado en la manufactura de un gran número de productos tanto de uso cotidiano (chupetes, tetinas, juguetes, pinturas, etc.) como sanitario (catéteres, preservativos, guantes de examen, etc.). Las proteínas del látex han demostrado ser unos potentes alérgenos capaces de inducir anafilaxis. El primer grupo de riesgo entre aquellos que pueden padecer más fácilmente alergia a látex es el grupo de alergia ocupacional, que comprende a adultos sensibilizados a látex debido a su profesión, como es el personal sanitario y los trabajadores de la industria de manufactura de productos derivados del látex.

Otro grupo de riesgo son niños con espina bífida, que tienen un alto nivel de exposición a látex debido a las continuas intervenciones quirúrgicas a las que son sometidos. Hasta la fecha han sido registrados ocho alérgenos procedentes del látex en la lista oficial de alérgenos del Subcomité de Nomenclatura de Alérgenos de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS): el factor de elongación (Hev b 1); una 1,3-glucanasa (Hev b 2); una proteína de 24 kDa (Hev b 3); un componente del complejo protéico del microhelix (Hev b 4); una proteína ácida de 16 kDa (Hev b 5); el precursor de la heveína, la heveína, y su fragmento C-terminal (Hev b 6.01, Hev b 6.02, y Hev b 6.03, respectivamente); un homólogo de la

patatina (Hev b 7); y la profilina (Hev b 8).

Las profilinas constituyen una ubicua familia de proteínas que interaccionan específicamente con fosfolípidos de la membrana y con la actina, modulando la capacidad de polimerización de esta proteína. La profilina probablemente une el proceso de remodelación del citoesqueleto con la cadena de transmisión de señales celulares en respuesta de estímulos externos [Machesky & Pollard. 1993 Profilin as a potential mediator of membrane-cytoskeleton communication. *TIBS*. 3. pp.381-385. Aderen. 1992 Signal transduction and the actin cytoskeleton. *TIBS*. 17. pp.438-443. Haarer & Brown. 1990 Structure and function of profilin. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 17. pp. 71-74. Theriot & Mitchison. 1993 The three faces of profilin. *Cell*. 75. pp.835-838.]. Las profilinas son prominentes alérgenos que pueden ser aislados de pólenes de árboles, hierbas y malezas, así como de algunos alimentos [Valenta, Duchêne, Ebner, et al. 1992 Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J. Exp. Med.* 175. pp.377-385. Ebner, Hirachwehr, Bauer, et al. 1995 Allergens, IgE, mediators, inflammatory mechanisms. *J. Allergy Clin. Immunol.* 95. pp.962-969. Valenta, Duchêne, Pettenburger, et al. 1991 Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science*. 253. pp.557-560. van Ree, Fernández Rivas, Cuevas, van Wijngaarden, & Aalberse. 1995 Pollen-related allergy to peach and apple: An important role for profilin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 95. pp.726-734. Vieths, Jankiewicz, Wütrich, & Baltes. 1995 Immunoblot study of IgE binding allergens in celery roots. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 75. pp.48-55.], si bien se encuentran presentes en diferente concentración según el tipo de materia prima de que se trate. Se ha encontrado que pacientes alérgicos a profilina constituyen el 20 % de individuos alérgicos a polen [Valenta, Duchêne, Ebner, et al. 1992 Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J. Exp. Med.* 175. pp.377-385.]. 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 procedentes de múltiples organismos eucariotas, tanto superiores (hombre, pollo, toro, ...), como inferiores (hongos, protozoos, nematodos, insectos, ...). Entre las profilinas de plantas clonadas se encuentran las de *Betula verrucosa* (abedul), llamada Bet v 1 [Valenta, Duchêne, Pettenburger, et al. 1991 Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science*. 253. pp.557-560.]; *Triticum aestivum* (trigo), clonadas tres isoformas [Rihs, Rozynek, May Taube, Welticke, & Baur. 1994 Polymerase chain reaction based cDNA cloning of wheat profilin: a potential plant allergen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105. pp.190-194.]; *Phleum pratense* [Valenta, Ball, Vrtala, Duchêne, Kraft, & Scheiner. 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. pp.106-118.]; *Zea mays* (maíz), clonadas tres isoformas [Staiger, Goodbody, Hussey, Valenta, Drobak, & Lloyd. 1993 The profilin multigene family of maize: differential expression of three isoforms. *Plant J.* 4. pp.631-641.]; *Phaseolus vulgaris* (alubia) [Vidali, Pérez, Valdés, Noguez, Zamudio, & Sánchez. 1995 Purification, characterization, and cDNA cloning of profilin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 108. pp.115-123.], *Hordeum vulgare*, (cebada) (número de acceso a EMBL Data Bank: U49505), *Cynodon dactylon* [Asturias, Arilla, Gómez Bayón, Martínez, Martínez, & Palacios. 1997a Cloning and high level expression of *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) pollen profilin (Cyn d 12) in *Escherichia coli*: purification and characterization of the allergen. *Clin. Experiment. Allergy*. 27. pp.1307-1313.], *Olea europea* (olivo) [Asturias, Arilla, Gómez Bayón, Martínez, Martínez, & Palacios. 1997b Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100. pp.365-372.], *Mercurialis annua* [Vallverdú, Asturias, Arilla, et al. 1997 Characterization of recombinant *Mercurialis annua* major allergen Mer a 1 (profilin). *J. Allergy Clin. Immunol.*] y *Helianthus annuus* (girasol).

En el presente estudio se han clonado por primera vez una secuencia, que codifica para la profilina de *Hevea brasiliensis*. Esta secuencia codifica para un polipéptido de 14.2 kDa, identificado como profilina 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 está relacionada con la clonación de un alérgeno de *Hevea brasiliensis* llamado profilina.

1. Descripción de las plantas utilizadas como materia prima

La clonación de la profilina se ha realizado del material genético aislado de la hoja de la planta euphorbiacea de porte arbóreo, *Hevea brasiliensis*. De los canales laticíferos de esta planta, perteneciente a la Familia Euphorbiaceae, Orden Euphorbiales, se obtiene la goma látex empleada para la producción del látex. Las hojas fueron obtenidas de la cepa RRIC 133 procedente del Instituto de Investigación en Goma de Sri Lanka (Rubber Research Institute of Sri Lanka).

2. Clonación y secuenciación de genes que codifican para profilinas

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

A partir de 100 mg de hojas, 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* DH5a 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 [Sanger, Nicklen, & Coulson. 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74. pp.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.

3. 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 [Way, Pope, Gooch, Hawkins, & Weeds. 1990 Identification of a region in segment 1 of gelsolin critical for actin binding. EMBO J. 9. pp.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 f10), 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) [Studier & Moffatt. 1986 Use of bacteriophage T7 polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. 189. pp.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 f10. El cultivo se recogió entre 3-6 horas después de la inducción.

4. 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 *Sephrose-poli-L-prolina*, según describe Lindberg [Lindberg, Schutt, Hellsten, Tjäder, & Hult. 1988 The use of

poly(L-proline)-Sephacrose in the isolation of profilin and profilactin complexes. Biochim. Biophys. Acta. 967. pp.391-400.]. Esta resina es una agarosa comercial (Pharmacia Biotech) activada con bromuro de cianógeno (CNBr) a la cual se une covalentemente 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
 5 obtiene una profilina recombinante de gran pureza (>95 %) y en grandes cantidades (10-50 mg/litro de cultivo).

En resumen, esta invención proporciona ADN recombinante que codifica para profilina de *Hevea brasiliensis*, árbol del cual se extrae el látex que sirve posteriormente para la manufacturación de un gran
 10 número de productos tanto de uso cotidiano como médico y tiene gran importancia en manifestaciones alérgicas. 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 es purificada mediante un sólo paso de cromatografía de afinidad en Sepharose-poli-L-prolina. La profilina purificada
 15 por este método no difiere en sus propiedades de unión a IgE de las profilinas naturales. La invención también describe métodos de diagnóstico utilizando esta profilina recombinante.

Aplicaciones de la invención

Los métodos de diagnóstico, tanto *in vitro* como *in vivo*, que actualmente se utilizan se basan en el uso
 20 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 [Susani, Jertschin, Dolecek, et al. 1995 High level expression of birch pollen profilin (Bet v 2) in *Escherichia coli*: purification and characterization of the recombinant allergen. Biochem. Biophys. Res.
 25 Commun. 215. pp.250-263.], es interesante el uso de preparaciones reproducibles de alérgenos puros obtenidos mediante la tecnología de ADN recombinante [Scheiner & Kraft. 1995 Basic and practical aspects of recombinant allergens. Allergy. 50. pp.384-391.]. 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
 30 de inmunoterapia más individualizada, y por ello eficiente. El alérgeno recombinante, profilina descrito en esta invención, permite el diagnóstico de alergias polínicas en las cuales se encuentra implicada la profilina, que son aproximadamente un 20 % del total de alergias a polen [Valenta, Duchêne, Ebner, et al. 1992 Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. J. Exp. Med. 175. pp.377-385.].

Depósito de la cepa

La cepa más importante que se menciona en la presente solicitud ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia, correspondiéndole el siguiente número de orden: *Escherichia coli* HbPROI, CECT 4994.

Breve explicación de las figuras

Figura 1: Secuencia de ADNc del gen de la profilina de *Hevea brasiliensis*. La secuencia de aminoácidos deducida se muestra debajo de la secuencia de ADN. La localización de los cebadores empleados en
 45 la clonación está subrayado. El posible sitio de fosforilación ha sido recuadrado.

Figura 2: Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de la profilina de *Hevea brasiliensis*, descrita en esta invención, con otras secuencias de profilinas de plantas.

Figura 3: Comparación de las secuencias deducidas de aminoácidos de la profilina de *Hevea brasiliensis*, descrita 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 4: SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie del proceso de purificación de la profilina HbPROI de *Hevea brasiliensis*. Carriles 1 y 2, lisado de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo pKN172 sin inserto y con el inserto HbPROI, respectivamente; carril 3, profilina recombinante purificada como elución de urea 6M de la columna de Sepharose-PLP; carril 4, fracción no retenida en la columna de Sepharose-PLP; carril 5, profilina natural purificada.

Figura 5: Inmunodetección de profilina recombinante utilizando anticuerpos policlonales anti-profilina de girasol. Carriles 1 y 2, lisado de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo pKN172 sin inserto y con el inserto HbPROI, respectivamente; carril 3, profilina recombinante purificada como elución de urea

6M de la columna de Sepharose-PLP; carril 4, fracción no retenida en la columna de Sepharose-PLP; carril 5, profilina natural purificada.

Figura 6: Actividad biológica "in vivo" de las profilinas natural y recombinante de látex mediante prueba cutánea en PRICK.

Figura 7: Comparación por inmunodetección de la reactividad de IgEs procedentes de suero de pacientes alérgicos a látex. Profilina recombinante de látex (HbPRO) se sometió a electroforesis y posteriormente se transfirió a membranas de PVDF, que se incubaron con sueros de pacientes alérgicos a látex (carriles 1 a 11), pool de sueros de pacientes alérgicos a profilina de girasol (carril 12), anti-suero de conejo antiprofilina (carril 13), pool de sueros de individuos sanos (14), y tampón (carril 15).

Modos de realización de la invención

La invención puede ser entendida a partir de los siguientes ejemplos.

1. Técnicas básicas de la tecnología del ADN recombinante y bioquímica

Como muchas de las técnicas de ADN recombinante empleadas en esta invención son utilizadas rutinariamente por personal cualificado en el tema, es mejor introducir una corta descripción de estas técnicas más que describirlas cada vez que se utilicen. Excepto donde existe una indicación específica, todos estos protocolos están descritos en la referencia Sambrook et al [Sambrook, Fritsch, & Maniatis. 1989 Molecular cloning: a laboratory manual. Anonymous Cold Spring Harbor Laboratory.].

1.1. 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 mg/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 ml de 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA y 100 mg/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 ml de agua destilada estéril, y se guardó a -20 °C.

1.2. 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 Mg de ADN y la reacción se incuba de 1 a 3 horas a las temperaturas recomendadas por el fabricante. La reacción se para calentando a 85°C durante 10 min, o por extracción con fenol seguida de precipitación de ADN con etanol. Esta técnica está descrita también en las páginas de 5.28 a 5.32 de la referencia Sambrook et al [Sambrook, Fritsch, & Maniatis. 1989 Molecular cloning: a laboratory manual. Anonymous Cold Spring Harbor Laboratory.].

1.3. 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 Trisborato, como se describe en las páginas 6.3 a 6.15 de la referencia de Sambrook [Sambrook, Fritsch, & Maniatis. 1989 Molecular cloning: a laboratory manual. Anonymous Cold Spring Harbor Laboratory.]. 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.

1.4. 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 ml 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.

1.5. Transformación de *E. coli* con ADN

Las cepas de *E. coli* DH5a o BL21 (DE3) fueron utilizadas en la mayoría de los experimentos. El ADN fue introducido mediante el protocolo del cloruro cálcico, como se describe en Sambrook [Sambrook, Fritsch, & Maniatis. 1989 Molecular cloning: a laboratory manual. Anonymous Cold Spring Harbor Laboratory,], páginas de 1.76 a 1.84, o mediante el método del cloruro de rubidio, como describe Hanahan [Hanahan. 1983 Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166. pp.557-580.]. La selección se realizó en LB sólido con ampicilina (100 mg/ml) y cuando fue necesario se añadieron a cada placa de Petri: 40 ml de X-gal (20 mg/ml en dimetilformamida), y 4 ml de IPTG (200 mg/ml).

1.6. 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 [Sambrook, Fritsch, & Maniatis. 1989 Molecular cloning: a laboratory manual. Anonymous Cold Spring Harbor Laboratory.].

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

Se siguió básicamente la técnica descrita por Laemmli [Laemmli. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227. pp.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 BioRad para bajos pesos moleculares. El cálculo de los pesos moleculares y los análisis densitométricos de los geles se realizó utilizando un analizador de imagen (Bio-Image, Millipore Corp, Bedford, MA).

1.8. Análisis por inmunotransferencia

Se realizó por el método de Shen y cols. con modificaciones [Shen, Choo, Lee, et al. 1991 The 40-kilodalton allergen of *Candida albicans* is an alcohol dehydrogenase: molecular cloning and immunological analysis using monoclonal antibodies. Clin. Experiment. Allergy. 21. pp.675-681.]. Las proteínas separadas en SDS-PAGE fueron electro-transferidas a filtros de nylon. El filtro es incubado con un agente bloqueante (como puede ser leche desnatada al 5 % en PBS: al cual llamaremos a partir de ahora leche/PBS). El filtro es entonces incubado con los anticuerpos de interés durante varias horas (estos anticuerpos podrán provenir de pacientes o de animales inmunizados). Posteriormente, el filtro se lava varias veces con leche/PBS, y se incuba con un segundo anticuerpo comercial, al cual está acoplada una enzima (por ejemplo peroxidasa). Este anticuerpo comercial será anti-IgG, en el caso que hayamos utilizado un animal inmunizado, o antiIgE, si el suero proviene de humanos. El filtro 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.

1.9. Preparación del extracto de látex

El material utilizado como materia prima fue látex comercial poco amoniaco. El material se congeló y posteriormente fue homogeneizado con una trituradora. Las proteínas fueron extraídas mediante agitación en PBS pH 7.3 a 37 °C durante 10 horas. Las proteínas solubilizadas fueron separadas de la fracción gomosa mediante filtración a través de filtros de vidrio, dializadas (10 kDa cut-off) y liofilizadas.

1.10. 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. [Lindberg, Schutt, Hellsten, Tjäder, & Hult. 1988 The use of poly(L-proline)-Sepharose in the isolation of profilin and profilactin complexes. Biochim. Biophys. Acta. 967. pp.391-400.]. 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, 0.1M, 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.

2. Ejemplos relacionados específicamente con la invención

2.1. Aislamiento de ADN poli (A+) de polen

Se aisló el ARN poli (A+) de 100 mg de hojas de *Hevea brasiliensis*, previamente machacadas en presencia de nitrógeno líquido, siguiendo el protocolo descrito en Quick Prep Micro mRNA Purification kit (Pharmacia Biotech). El ARN purificado se resuspendió en 400 ml de agua destilada tratada con dietilpirocarbonato, y se determinó su concentración a 260 nm. A partir de 100 mg de hojas se obtuvieron unos 4 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.

2.2. 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 FirstStrand 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.

2.3. 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(C/G/A/T)A(G/T/C)GAGGTAGTCACC
GAGCC

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 determinanda 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.

2.4. 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 células competentes de *E. coli* DH5a. La selección se realizó en medio LB con ampicilina, X-Gal e IPTG, como se describe en Sambrook y col [Sambrook, Fritsch, & Maniatis. 1989 Molecular cloning: a laboratory manual. Anonymous Cold Spring Harbor Laboratory.]. 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.

2.5. Secuenciación del gen de profilina

La secuenciación del ADN insertado en el pBluescript se realizó basándose en el método de Sanger [Hahnan. 1983 Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166. pp.557-580.] 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* DH5a, conteniendo los plásmidos de interés fueron crecidos en 15 ml de LB suplementado con 100 mg/ml de ampicilina, durante 16 horas, a 37 °C y con agitación. El ADN se aisló por el método descrito en el apartado A). Las reacciones de secuenciación se realizaron mezclando 700-1000 ng de molde, 25 pmoles del cebador y los reactivos indicados en el kit de secuenciación (PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Termination Cycle Sequencing Kit, Perkin Elmer) siguiéndose las instrucciones del fabricante. Todos los fragmentos fueron secuenciados en las dos direcciones, utilizando cebadores comerciales (M13 -20 primer o reverse primer) o cebadores específicos.

El inserto de ADN complementario de *Hevea brasiliensis* tenía 396 pares de bases y codificaba para un polipéptido de 131 aminoácidos que fue llamado HbPRO1 (Fig. 1).

2.6 Análisis de las secuencias

El inserto de ADN complementario codifica para una proteína con una masa molecular teórica de 14194 Da y un punto isoeléctrico de 4.66. No se encontraron posibles sitios de glicosilación (N_xT/S), pero se localizó un posible sitio de fosforilación por una proteína quinasa (S/T_xR/K) en el residuo 93.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con otras profilinas existentes en el banco de datos (ENBL Data Bank y SWISS-Prot) utilizando el paquete informático GCG (Universidad de Wisconsin Genetics Computer Group) y el programa BLAST [Altschul, Madden, Schaffer, et al. 1997 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 23. pp.3389-3402.]. Cuando se compararon con otras profilinas vegetales (maíz, cebada, alubia, hierba timotea, abedul, y tabaco) [Staiger, Goodbody, Hussey, Valenta, Drobak, & Lloyd. 1993 The profilin multigene family of maize: differential expression of three isoforms. Plant J. 4. pp.631-641. Mittermann, Swoboda, Pierson, et al. 1995 Molecular cloning and characterization of profilin from tobacco (*Nicotiana tabacum*): increased profilin expression during pollen maturation. Plant Mol. Biol. 27. pp.137-146. Vidali, Pérez, Valdés, Noguez, Zamudio, & Sánchez. 1995 Purification, characterization, and cDNA cloning of profilin from *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiol. 108. pp.115-123. Valenta, Duchêne, Pettenburger, et al. 1991 Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. Science. 253. pp.557-560. Valenta, Ball, Vrtala, Duchêne, Kraft, & Scheiner. 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. pp.106-118. Rihs, Rozynek, May Taube, Welticke, & Baur. 1994 Polymerase chain reaction based cDNA cloning of wheat, profilin: a potential plant allergen. Int. Arch. Allergy Immunol. 105. pp.190-194.] se encontró una gran homología entre ellas (Fig. 2). La mayor homología se encontró con la profilina de *Phaseolus vulgaris* (83 % aminoácidos idénticos) y maíz (81 %), y la más baja homología con la profilina-4 de *Arabidopsis thaliana*, con un 72 % de aminoácidos idénticos. 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 HbPRO1 de *Hevea brasiliensis* tenía una identidad del 44 % con la de hongos deslizantes como *Distyostelium discoideum*; del 43 % con la de insectos (*Drosophila melanogaster*); del 34 % con la de levaduras (*Candida albicans*); y del 40 % con la de protistas como *Acanthamoeba castellanii*. La identidad con la profilina I humana fue del 30 %. Se puede observar en la figura 3 las diferencias

entre un gran número de profilinas de diferentes orígenes. Por el contrario, debido a que comparten una función similar, se pueden encontrar unas regiones donde existen un gran número de residuos conservados (marcados en la figura).

5 2.7 Subclonación del gen de profilina en el vector de expresión pKN172

Los vectores recombinantes (2 mg) 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* DH5a. Las colonias que portaban los plásmidos recombinantes fueron seleccionadas mediante una PCR analítica, en la cual se utilizó como molde una cantidad minúscula de la colonia. El ADN plasmídico de los clones positivos se analizó mediante endonucleasas de restricción, seleccionándose un clon que tuviera el fragmento deseado. Este plásmido se utilizó para transformar la cepa utilizada en la expresión *E. coli* BL21 (DE3) [Studier & Moffatt. 1986 Use of bacteriophage T7 polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. 189. pp.113-130.]. Esta cepa tiene en su cromosoma un lisogeno del fago 1 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 mg/ml de ampicilina.

20 2.8. Expresión de la profilina en *E. coli*

E. coli BL21 (DE3) conteniendo el plásmido con el inserto que codificaba para la profilina HbPRO1 de *Hevea brasiliensis*, se creció en LB con 200 mg/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. Alicuotas de las muestras, conteniendo aproximadamente 20 mg 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 más del 60 % de proteína total.

35 2.9. 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 alicuotas conteniendo 15-20 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 (Fig. 4). La migración de la profilina recombinante es levemente diferente de la observada para la profilina natural debido probablemente a los drásticos procesos químicos a que es sometida la goma látex después de su extracción. La producción final fue de 17,6 mg de profilina purificada por cada litro de cultivo bacteriano.

50 2.10. Detección de la profilina recombinante con antisueros 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 membrana de PVDF. Las tiras de nitrocelulosa, 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 la figura 5, 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. [Babich, Foti, Sykaluk, & Clark. 1996 Profilin forms tetramers that bind to G-actin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 218. pp.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. La figura 5 muestra 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.

2.11. Purificación y caracterización de la profilina natural de *Hevea brasiliensis*

El aislamiento de profilina de látex mediante cromatografía de afinidad en columna de Sepharosa-PLP (sección 1.10) resultó altamente efectivo, según se pudo evaluar mediante SDS-PAGE (Fig. 4), ya que tan sólo se observaron unas tenues bandas contaminantes. Por el contrario, el rendimiento de la purificación fue sólo del 1.6%, porcentaje inferior a otros rendimientos descritos para profilinas de pólenes [Asturias, Arilla, Gómez Bayón, Martínez, Martínez, & Palacios. 1997b Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen. J. Allergy Clin. Immunol. 100. pp.365-372. Asturias, Arilla, Gómez Bayón, Martínez, Martínez, & Palacios. 1997b Cloning and high level expression of *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) pollen profilin (Cyn d 12) in *Escherichia coli*: purification and characterization of the allergen. Clin. Experiment. Allergy. 27. pp.1307-1313.]. Esto indicaría que la cantidad de profilina presente en el extracto de látex es muy pequeña, como ya ha sido sugerido por otros autores [Vallier, Balland, Harf, Valenta, & Deviller. 1995 Identification of profilin as an IgE-binding component in látex from *Hevea brasiliensis*: Clinical implications. Clin. Experiment. Allergy. 25. pp.332-339.].

2.12. Reactividad de la profilina recombinante de látex en prueba cutánea (PRICK)

La reactividad “in vivo” de la profilina recombinante se estudió mediante pruebas de diagnóstico cutáneas en PRICK. Se prepararon diferentes concentraciones de profilinas de látex naturales y recombinantes purificadas en solución salina conteniendo glicerol al 50 % y fenol al 0,25 %. Como control negativo se utilizó el mismo diluyente, y como control positivo histamina al 10 %. Las pruebas se realizaron colocando unos 30 ml de solución en el antebrazo de paciente alérgicos a látex, y pinchando levemente la epidermis con una lanceta. Después de 15 minutos, se midió el contorno de la pápula producida. Una representación del tamaño de las pápulas se muestra en la Tabla I y en la fig. 6. En todos los casos, la profilina natural da una señal en prueba cutánea mayor que la recombinante. Como se puede observar en la figura 6, (Representación gráfica del área de la pápula en mm² frente al Log Concentración de alérgeno en mg/ml. Con un ■ se representa la profilina natural y con o la profilina recombinante) ambas preparaciones son reactivas “in vivo”, si bien la forma recombinante lo es en menor medida.

TABLA 1

Rast a profilina de látex

Paciente	Profilina natural			Histamina	Profilina recombinante			Histamina
	0,25 mg/ml	0,05 mg/ml	0,025 mg/ml		1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,01 mg/ml	
1	82,8	86,0	34,0	79,3	46,2	7,0	-	53,2
2	89,0	40,4	27,2	47,0	26,9	2,8	-	108,6
3	93,6	75,0	50,0	54,0	73,1	44,6	22,6	78,5
4	86,8	61,9	20,7	90,9	41,9	16,7	17,7	21,0
5.	24,5	26,4	19,0	42,5	16,7	8,1	-	62,9
6.	31,7	19,9	16,7	38,2	26,3	5,9	-	32,8
7	141,7	48,9	11,6	58,0	62,4	4,3	4,8	50,5
8	51,6	48,2	27,7	36,9	32,3	18,8	13,4	34,4
9	68,8	51,4	21,8	31,5	33,3	18,3	15,6	42,5
10	32,8	24,2	-	78,5	53,8	12,4	-	107,5
11	43,0	36,8	7,5	-	17,7	-	-	82,8
12	123,4	33,4	18,0	35,0	82,3	31,7	20,4	29,0
13	107,0	74,5	-	69,0	58,1	50,5	12,4	28,0
Media ± es	75,1±10,2	48,2±5,8	23,1±3,5	55,1±5,8	43,9±5,8	18,4±4,6	15,3±2,2	56,3±8,3

2.13. Detección de la profilina recombinante con anticuerpos IgE procedentes de pacientes atópicos

Se migró en SDS-PAGE la profilina HbPRO1 recombinante, y después de ser transferidas a membranas se incubaron con sueros de pacientes alérgicos a látex. La profilina recombinante de látex era reconocida por siete de los once sueros, como se puede observar en la fig. 7. Esto indicaría que HbPRO1 tiene capacidad de unir IgE procedentes del suero de pacientes que dieron positivo en la prueba de PRICK. El hecho de que no todos los pacientes con PRICK positivo, den reactividad en immunoblotting con la

profilina recombinante es habitual, ya que la sensibilidad “in vivo”, siempre es mayor que “in vitro”; además pueden existir algunos pacientes que sólo posean anticuerpos contra epítomos conformacionales, que quedan destruidos en el tratamiento con SDS y 2-mercaptoetanol que se realiza en la electroforesis desnaturalizante.

5

3. Métodos de 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 insensibilización implica la administración repetida por vías parenteral (subcutánea, intravenosa o intramuscular), oral, nasal o rectal del alérgeno en cuestión. Estos (poli)péptidos pueden administrarse tanto solos como en combinación con otros diluyentes, de acuerdo con la legislación vigente y los procedimientos galénicos al uso. Un rango desde 1 picogramo a 10 miligramos por aplicación puede ser usado.

15 Referencias

A continuación se hace relación detallada de las referencias bibliográficas citadas en los apartados anteriores:

- 20 1. Aderen, A. (1992). Signal transduction and the actin cytoskeleton. *Trends in Biochemical Science*, 17, 438-443.
2. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 23, 3389-3402.
- 25 3. Asturias, J.A., Arilla, M.C., Gómez Bayón, N., Martínez, J., Martínez, A., & Palacios, R. (1997a). Cloning and high level expression of *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) pollen profilin (Cyn d 12) in *Escherichia coli*: purification and characterization of the allergen. *Clin Experiment Allergy*, 27, 1307-1313.
- 30 4. Asturias, J.A., Arilla, M.C., Gómez Bayón, N., Martínez, J., Martínez, A., & Palacios, R. (1997b). Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen. *J Allergy Clin Immunol*, 100, 365-372.
- 35 5. Babich, M., Foti, L.R.P., Sykaluk, L.L., & Clark, C.R. (1996). Profilin forms tetramers that bind to G-actin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218, 125-131.
6. Ebner, C., Hirschwehr, R., Bauer, L., Breiteneder, H., Valenta, R., Ebner, H., Kraft, D., & Scheiner, O. (1995). Allergens, IgE, mediators, inflammatory mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*, 95, 962-969.
- 40 7. Haarer, B.K., & Brown, S.S. (1990). Structure and function of profilin. *Cell Motil Cytoskeleton*, 17, 71-74. 8. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166, 557-580.
- 45 9. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
10. Lindberg, U., Schutt, C., Hellsten, E., Tjäder, A., & Hult, T. (1988). The use of poly(L-proline)-Sephadex in the isolation of profilin and profilactin complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 967, 391-400.
- 50 11. Machesky, L., & Pollard, T. (1993). Profilin as a potential mediator of membrane-cytoskeleton communication. *Trends in Biochemical Science*, 3, 381-385.
12. Mittermann, I., Swoboda, I., Pierson, E., Eller, N., Kraft, D., Valenta, R., & 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.
13. Miyamoto, T. (1991). P. Godard, J. Bousquet, & F.B. Michel (Eds.), *Advances in Allergology and Clinical Immunology*. (pp. 343-347). New Jersey, USA: The Parthenon Publishing Group-Carnforth.
- 60 14. Rihs, H.P., Rozynek, P., May Taube, K., Weltecke, B., & Baur, X. (1994). Polymerase chain reaction

based cDNA cloning of wheat profilin: a potential plant allergen. *International Archives of Allergy and Immunology*, 105, 190-194.

15. Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). Anonymous, *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory.
16. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA*, 74, 5463-5467.
- 10 17. Scheiner, O., & Kraft, D. (1995). Basic and practical aspects of recombinant allergens. *Allergy*, 50, 384-391.
18. Shen, H.D., Choo, K.B., Lee, H.H., Hsieh, J.C., Lin, W.L., Lee, W.R., & Han, S.H. (1991). The 40-kilodalton allergen of *Candida albicans* is an alcohol dehydrogenase: molecular cloning and immuno-
15 logical analysis using mono-clonal antibodies. *Clin Experiment Allergy*, 21, 675-681.
19. Staiger, C.J., Goodbody, K.C., Hussey, P.J., Valenta, R., Drobak, B.K., & Lloyd, C.W. (1993). The profilin multigene family of maize: differential expression of three isoforms. *Plant J*, 4, 31-641.
- 20 20. Stewart, G.A. (1995). The molecular biology of allergens. In W.W. Busse & S.T. Holgate (Eds.), *Asthma and Rhinitis*. (pp. 898-932). Boston: Blackwell Scientific Publications.
21. Studier, F.M., & Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189, 113-130.
- 25 22. Susani, M., Jertschin, P., Dolecek, C., Sperr, W.R., Valent, P., Ebner, C., Kraft, D., Valenta, R., & Scheiner, O. (1995). High level expression of birch pollen profilin (Bet v 2) in *Escherichia coli*: purification and characterization of the recombinant allergen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 215, 250-263.
- 30 23. Theriot, J.A., & Mitchison, T.J. (1993). The three faces of profilin. *Cell*, 75, 835-838.
24. Valenta, R., Duchane, M., Pettenburger, K., Sillaber, C., Valent, P., Bettelheim, P., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D., & Scheiner, O. (1991). Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE
35 autoreactivity in sensitized individuals. *Science*, 253, 557-560.
25. Valenta, R., Duchêne, M., Ebner, C., Valent, P., Sillaber, C., Deviller, P., Perreira, F., Tejkl, M., Edelmann, H., Kraft, D., & Scheiner, O. (1992). Profilins constitute a novel family of functional plant panallergens. *The Journal of Experimental Medicine*, 175, 377-385.
- 40 26. Valenta, R., Ball, T., Vrtala, S., Duchêne, M., Kraft, D., & Scheiner, O. (1994). cDNA cloning and expression of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen profilin in *Escherichia coli*: comparison with birch pollen profilin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 199, 106-118.
- 45 27. Vallier, P., Balland, S., Harf, R., Valenta, R., & Deviller, P. (1995). Identification of profilin as an IgE-binding component in latex from *Hevea brasiliensis*: Clinical implications. *Clin Experiment Allergy*, 25, 332-339.
28. Vallverdú, A., Asturias, J.A., Arilla, M.C., Gómez Bayón, N., Martínez, A., Martínez, J., & Palacios, R. (1997). Characterization of recombinant *Mercurialis annua* major allergen Mer a 1 (profilin). *J Allergy Clin Immunol*,
50
29. van Ree, R., Fernández Rivas, M., Cuevas, M., van Wijngaarden, M., & Aalberse, R.C. (1995). Pollen-related allergy to peach and apple: An important role for profilin. *J Allergy Clin Immunol*, 95,
55 726-734.
30. Vidali, L., Pérez, H.E., Valdés, V., Noguez, R., Zamudio, F., & Sánchez, F. (1995). Purification, characterization, and cDNA cloning of profilin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol*, 108, 115-123.
- 60 31. Vieths, S., Jankiewicz, A., Wütrich, B., & Baltes, W. (1995). Immunoblot study of IgE binding allergens in celery roots. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 75, 48-55.

32. Way, M., Pope, B., Gooch, J., Hawkins, M., & Weeds, A.G. (1990). Identification of a region in segment 1 of gelsolin critical for actin binding. *EMBO JOURNAL*, 9, 4103-4109.

Lista de secuencias

5 <110> D. RICARDO PALACIOS PELAEZ, D. JORGE MARTINEZ QUESADA., D. ALBERTO MARTINEZ GARATE Y D. JUAN ANDRES ASTURIAS ORTEGA

 <120> ADN RECOMBINANTE QUE CODIFICA PARA EPITOPOS DEL ALERGENO PROFILINA DE *HEVEA BRASILIENSIS* UTIL PARA EL DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE ALERGIA A LATEX

10 <140> P-9800536/7

15 <141> 12-3-98/2

 <160> SEQ ID NO:1

 <210> 1

20 <211> 396 NUCLEOTIDOS

 <212> DNA

 <213> *Hevea brasiliensis*

25 <400>

30 atg tcg tgg cag acg tac gtg gat gag cgt ctt atg tgc gaa atc 45
Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu Arg Leu Met Cys Glu Ile

35 1 5 10 15

 gag ggc aat cat ctc act gct gca gcc atc atc ggc caa gac ggc 90
Glu Gly Asn His Leu Thr Ala Ala Ala Ile Ile Gly Gln Asp Gly

40 20 25 30

45 agc gtc tgg gcc cag agc tcc aac ttc cct cag ttc aag tct gaa 135
Ser Val Trp Ala Gln Ser Ser Asn Phe Pro Gln Phe Lys Ser Glu

50 35 40 45

55

60

ES 2 151 382 B1

```

    gaa atc act gcc att atg agt gac ttt gac gaa cct gga aca cta   180
5   Glu Ile Thr Ala Ile Met Ser Asp Phe Asp Glu Pro Gly Thr Leu
      50                      55                      60

10  gct cca act ggt ttg cac ctg ggt ggc aca aaa tac atg gtg atc   225
    Ala Pro Thr Gly Leu His Leu Gly Gly Thr Lys Tyr Met Val Ile

15                      65                      70                      75

20  caa gga gag gca gga gct gtc att cgg ggg aag aag gga cct ggt   270
    Gln Gly Glu Ala Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly Pro Gly

25                      80                      85                      90

    ggt gtt act gtt agg aag aca aat cag gcc cta ata att ggt atc   315
30  Gly Val Thr Val Arg Lys Thr Asn Gln Ala Leu Ile Ile Gly Ile
      95                      100                      105

35  tat gat gag cca atg act cca ggg cag tgc aac atg att gtt gaa   350
    Tyr Asp Glu Pro Met Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Ile Val Glu

40                      110                      115                      120

    agg ctc ggt gac tac ctc cta gaa caa ggc atg taa   396
45  Arg Leu Gly Asp Tyr Leu Leu Glu Gln Gly Met   *
      125                      130

50  <110> D. RICARDO PALACIOS PELAEZ, D. JORGE MARTINEZ QUESADA, D. AL-
      <120> ADN RECOMBINANTE QUE CODIFICA PARA EPITOPOS DEL ALERGENO PRO-
55  FILINA DE HEVEA BRASILIENSIS UTIL PARA EL DIAGNOSTICO Y TRATA-
      MIENTO DE ALERGIA A LATEX
      <140> P-9800536/7
      <141> 12-3-98/2
      <160> SEQ ID NO:2
60  <210> 2

```

ES 2 151 382 B1

<211> 131 AMINOACIDOS
 <212> PRT
 <213> *Hevea brasiliensis*
 <400>

5

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

Glu Gly Asn His Leu Thr Ala Ala Ala Ile Ile Gly Gln Asp Gly
 15 20 25 30

Ser Val Trp Ala Gln Ser Ser Asn Phe Pro Gln Phe Lys Ser Glu
 20 35 40 45

Glu Ile Thr Ala Ile Met Ser Asp Phe Asp Glu Pro Gly Thr Leu
 25 50 55 60

Ala Pro Thr Gly Leu His Leu Gly Gly Thr Lys Tyr Met Val Ile
 30 65 70 75

35

Gln Gly Glu Ala Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly Pro Gly
 40 80 85 90

Gly Val Thr Val Arg Lys Thr Asn Gln Ala Leu Ile Ile Gly Ile
 45 95 100 105

Tyr Asp Glu Pro Met Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Ile Val Glu
 50 110 115 120

Arg Leu Gly Asp Tyr Leu Leu Glu Gln Gly Met
 55 125 130

60

REIVINDICACIONES

1. Molécula de ADN recombinante **caracterizada** porque codifica para un polipéptido que tiene al menos un epítipo del alérgeno profilina, de la planta del látex (*Hevea brasiliensis*).

2. Molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1, **caracterizada** por ser un fragmento de 396 nucleótidos de ADNc proveniente de ARNm de *Hevea brasiliensis* con la SEQ ID NO:1.

3. Molécula polipeptídica de alérgeno profilínico recombinante útil para el diagnóstico y tratamiento convencional de alergias al látex, **caracterizada** porque contiene al menos un epítipo del alérgeno profilina de la planta del látex (*Hevea brasiliensis*).

4. Molécula polipeptídica recombinante, según la reivindicación 3, **caracterizada** por ser un fragmento de 131 aminoácidos proveniente de la SEQ ID NO:1.

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

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

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

8. Un método para producir un polipéptido que contenga al menos un epítipo del alérgeno profilínico, 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 y 2.

9. Un preparado que contenga un polipéptido, con al menos un epítipo del alérgeno profilínico mencionado y producido por el método según la reivindicación 8.

10. Un preparado que contenga un polipéptido, con al menos un epítipo del alérgeno profilínico mencionado y producido por síntesis química según la secuencia SEQ ID NO: 2.

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

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

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

14. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1 a 4 para la producción de isoformas recombinantes mutantes que no den lugar a fijación de IgE para el tratamiento de alergias con reducida capacidad de producción de efectos adversos.

ATG	TCG	TGG	CAG	ACG	TAC	GTG	GAT	GAG	CGT	CTT	ATG	TGC	GAA	ATC	GAG	GGC	AAT	CAT	CTC	60
M	S	W	Q	T	Y	V	D	E	R	L	M	C	E	I	E	G	N	H	L	20
ACT	GCT	GCA	GCC	ATC	ATC	GGC	CAA	GAC	GGC	AGC	GTC	TGG	GCC	CAG	AGC	TCC	AAC	TTC	CCT	120
T	A	A	A	I	I	G	Q	D	G	S	V	W	A	Q	S	S	N	F	P	40
CAG	TTC	AAG	TCT	GAA	GAA	ATC	ACT	GCC	ATT	ATG	AGT	GAC	TTT	GAC	GAA	CCT	GGA	ACA	CTA	180
Q	F	K	S	E	E	I	T	A	I	M	S	D	F	D	E	P	G	T	L	60
GCT	CCA	ACT	GGT	TTG	CAC	CTG	GGT	GGC	ACA	AAA	TAC	ATG	GTG	ATC	CAA	GGA	GAG	GCA	GGA	240
A	P	T	G	L	H	L	G	G	T	K	Y	M	V	I	Q	G	E	A	G	80
GCT	GTC	ATT	CGG	GGG	AAG	AAG	GGA	CCT	GGT	GGT	GTT	ACT	GTT	AGG	AAG	ACA	AAT	CAG	GCC	300
A	V	I	R	G	K	K	G	P	G	G	V	T	V	R	K	T	N	Q	A	100
CTA	ATA	ATT	GGT	ATC	TAT	GAT	GAG	CCA	ATG	ACT	CCA	GGG	CAG	TGC	AAC	ATG	ATT	GTT	GAA	360
L	I	I	G	I	Y	D	E	P	M	T	P	G	Q	C	N	M	I	V	E	120
AGG	CTC	GGT	GAC	TAC	CTC	CTA	GAA	CAA	GGC	ATG	TAA	396								
R	L	G	D	Y	L	L	E	Q	G	M	*	132								

FIG. 1

	1				50
Latex	MSWQTYVDER	LMCEIEGN..	H.LTAAAIIG	QDGSVWAQSS	NFPQFKSEEI
<i>P. judaica</i>	MSWQAYVDDH	LMCDVGD..G	NTLASAAIIG	HDGSVWAQSA	NFPQLKPEEV
<i>H. annuus</i>	MSWQAYVDEH	LMCDIEG.TG	QHLTSAAILG	LDGTVWAQSA	KFPQFKPEEM
<i>O. europaea</i>	MSWQAYVDDH	LMCDIEGHEG	HRLTAAAIIVG	HDGSVWAQSA	TFPQFKPEEM
<i>B. verrucosa</i>	MSWQTYVDEH	LMCDIDGQAS	N.SLASAIVG	HDGSVWAQSS	SFPQFKPQEI
<i>M. annua</i>	MSWQTYVDDH	LMCDIDGQGQ	H.LAAASIVG	HDGSIWAQSA	SFPQLKPEEI
<i>N. tabacum</i>	MSWQTYVDDH	LMADIEGQQG	HHLAAAAILG	HDGSVWAQSS	TFPKFKPEEI
<i>T. aestivum</i>	MSWQTYVDDH	LCCEIDG...	QHLTSAAILG	HDGSVWTESP	NFPKFKPEEI
<i>H. vulgaris</i>	MSWQTYVDDH	LCCEIDG...	QHLTSAAILG	HDGRVWVQSP	NFPQFKPEEI
<i>P. pratense</i>	MSWQTYVDEH	LMCEIEG...	HHLASAAILG	HDGTVWAQSA	DFPQFKPEEI
<i>Z. mays</i>	MSWQTYVDEH	LMCEIEG...	HHLTSAAIVG	HDGATWAQST	AFPEFKPEEM
<i>C. dactylon</i>	MSWQAYVDDH	LMCEIEG...	HHLTSAAIIG	HDGTVWAQSA	AFPAFKPEEM
<i>P. vulgaris</i>	MSWQTYVDDH	LLCEIEG...	NHLTHAAILG	QDGSVWAKSA	SFPQFKPEEI
	51				100
Latex	TAIMSDFDEP	GTLAPTGLHL	GGTKYMPIQG	EAGAVIRGKK	GPGGVTVRKT
<i>P. judaica</i>	TGIMNDFNEG	GFLAPTGLFL	GGTKYMPIQG	ESGAVI.GKK	GSGGATLKKT
<i>H. annuus</i>	KGIIEKFDEA	GTLAPTGMFI	AGAKYMLVQG	EPGAVIRGKK	GAGGICIKKT
<i>O. europaea</i>	NGIMTDFNEP	GHLAPTGLHL	GGTKYMPIQG	EAGAVIRGKK	GSGGITIKKT
<i>B. verrucosa</i>	TGIMKDFEEP	GHLAPTGLHL	GGIKYMPIQG	EAGAVIRGKK	GSGGITIKKT
<i>M. annua</i>	TGIMKDFDEP	GHLAPTGLYI	AGTKYMPIQG	ESGAVIRGKK	GSGGITIKKT
<i>N. tabacum</i>	TNIMKDFDEP	GHLAPTGLFL	GGAKYMPIQG	EPGAVIRGKK	GSGGITIKKT
<i>T. aestivum</i>	AGIVKDFEEP	GHLAPTGLFL	GGTKYMPIQG	EPGVVIRGKK	GTGGITIKKT
<i>H. vulgaris</i>	AGIINKDFEP	GHLAPTGLFL	GGTKYMPIQG	EPGVVIRGKK	GTGGITIKKT
<i>P. pratense</i>	TGIMKDFDEP	GHLAPTGMFV	AGAKYMPIQG	EPGRVIRGKK	GAGGITIKKT
<i>Z. mays</i>	AAIMKDFDEP	GHLAPTGLIL	GGTKYMPIQG	EPGAVIRGKK	GSGGITVKKT
<i>C. dactylon</i>	ANIMKDFDEP	GFLAPTGLFL	GPTKYMPIQG	EPGAVIRGKK	GSGGVTVKKT
<i>P. vulgaris</i>	TGIMNDFNEP	GTLAPTGLYI	GGTKYMPIQG	EPGSVIRGKK	GPGGVTVKKT
	101				144
Latex	NQALIIGIYD	EPMTPGQCNM	IVERLGDYLL	EQGM*	
<i>P. judaica</i>	GQAIVIGIYD	EPMTPGQCNI	VVERLGDYLL	EQGM*.....	
<i>H. annuus</i>	GQAMIMGIYD	EPVAPGQCNM	VVERLGDYLL	EQGM*.....	
<i>O. europaea</i>	GQALVFGIYE	EPVTPGQCNM	VAERLGDYLL	EQGL*.....	
<i>B. verrucosa</i>	GQALVFGIYE	EPVTPGQCNM	VVERLGDYLI	DQGL.....	
<i>M. annua</i>	GQALVFGIYE	EPVTPGQCNM	VVERLGDYLI	EQGM*.....	
<i>N. tabacum</i>	NQALIFGIYE	EPVTPGQCNM	VVEKIRDYLV	DQGY.....	
<i>T. aestivum</i>	GMALILGIYD	EPMTPGQCNI	VVERLGDYLI	DQGYWVPSSN	
<i>H. vulgaris</i>	GMPLILGIYD	EPMTPGQCNI	VVERLGDYLV	EQGF*.....	
<i>P. pratense</i>	GQALVVGIYD	EPMTPGQCNM	VVERLGDYLV	EQGM.....	
<i>Z. mays</i>	GQSLIIGIYD	EPMTPGQCNI	VVERLGDYLL	EQGM.....	
<i>C. dactylon</i>	GQALVIGIYD	EPMTPGQCNM	VIEKLGDYLI	EQGM*.....	
<i>P. vulgaris</i>	NLALVIGIYD	EPMTPGQCNM	IVERLGDYLI	EQGL.....	

Figura 2

HumanI	MACWNAV1D.	NLMADGTCQ.	DAAIV	GYKDSPSVWA	AVPG.....	KTFVN	ITPAEVGVLV	GKDRSSFVN	GLTLGG	QKCSVIRDSL
HumanII	MAWQSYVD.	NLMCDGCCQ.	EAAIV	GYCDKAYVWA	ATAG.....	GVFQS	ITPIEIDMIV	GKDRSGFTN	GLTLGA	KKCSVIRDSL
HbPRO1	.MSWQTYVDE	RLMCEIEG.	..H.LTAAI	QO.DGS.VWA	QSSNEPQF..		.KSEIITAM	SDFDEPGTIA	PT..GLHLGG	TKYMWI....
PjPRO1	.MSWQAYVDD	RLMCDVGD..	GNTPASAAI	GH.DGS.VWA	QSANEPQL..		.KPEEVTGIM	NDFNEAGFLA	PT..GLFLGG	TKYMWI....
OePRO1	.MSWQAYVDD	RLMCDIEGHE	DHRLTAAIIV	GH.DGS.VWA	QSATPPQF..		.KPEEMNGIM	TDFNEPGHIA	PT..GLHLGG	TKYMWI....
Betula	.MSWQTYVDE	RLMCDIDGQA	SNSL.ASAIV	GH.DGS.VWA	QSSSPQF..		.KPEEITGIM	KDFEPPGHIA	PT..GLHLGG	TKYMWI....
TriticumI	.MSWQTYVDD	RLMCEIDGQ.	..HLTSAAIL	GH.DGS.VWT	ESNPPKF..		.KPEEITGIM	KDFEPPGHIA	PT..GLFLGG	TKYMWI....
Hordeum	.MSWQTYVDD	RLMCEIDGQ.	..HLTSAAIL	GH.DGR.VWV	QSNPPQF..		.KPEEITGIM	KDFEPPGHIA	PT..GLFLGG	TKYMWI....
PpPRO2	.MSWQTYVDE	RLMCEIEGH.	..HLTSAAIL	GH.DGT.TWA	QSADEPQF..		.KPEEMAAM	KDFEPPGHIA	PT..GLILGG	TKYMWI....
Zeal	.MSWQTYVDE	RLMCEIEGH.	..HLTSAAIL	GH.DGT.TWA	QSAAPAF..		.KPEEMANIM	KDFEPPGHIA	PT..GLFLGP	TKYMTI....
CdPRO1	.MSWQAYVDD	RLMCEIEGH.	..HLTSAAIL	GH.DGT.TWA	QSAAPAF..		.SPANGAALA	NKFDATAIR	SN..GFELAG	TRYVTI....
AcantII	.MSWQTYVDT	NLVGT.....	.GAVTOAAII	GH.DGN.VWA	SKNLS.L..		.KAGEGAKIV	NGFKDSASVL	SG..GIFVDG	QKYLTI....
Physarum	.MSWQAYVDD	QLVGT.....	.GHVIGRAII	GH.DGN.VWA	SKNLS.L..		.QPNEIGEIV	QGFDPNAGLQ	SN..GLHIQG	QKFMLL....
Saccharum	.MSWQAYTD.	NLIGT.....	.GKVDKAVIY	SR.AGDVWA	TSGGLS.L..		NYQIDVEGQK	ANVNETANLL	AAMNNGVPT	DPLCGIRIMN
Tetrahyme	MSGWDQYVQ.	YLTAN.....	.QQVEYGLIL	GK.TDGTIWA	SNVGLTLYN					QKYITV....
	***	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	101									
HumanI	LQDEFFSMDL	RTKSTGGAPT	ENVTVTKTDK	TLVLLMGKEG	V.....H	151	GGLINKKCYE	MASHLRRSQY		180
HumanII	YVDGECTMDI	RTKSQGGAPT	YNVAVGRAGR	ALVIVMGKEG	V.....H	GGTLNKKAYE	LALYLRRSDV			
HbPRO1	..QGEAGAVI	R.GKKGPG..	.GVTVRKTNQ	ALIIGIYDEP	M.....T	PGQCNMIVER	LG DYILLEQGM			
PjPRO1	..QGESGAVI	R.GKKGSG..	.GATLKKTGQ	ALVIGIYDEP	M.....T	PGQCNLWVER	LG DYILLEQGL			
OePRO1	..QGEAGAVI	R.GKKGSG..	.GITIKKTGQ	ALVFGIYEPE	V.....T	PGQCNMVER	LG DYILLEQGM			
Betula	..QGEAGAVI	R.GKKGSG..	.GITIKKTGQ	ALVFGIYEPE	V.....T	PGQCNMVER	LG DYILLEQGL			
TriticumI	..QGEAGAVI	R.GKKGSG..	.GITIKKTGQ	ALVFGIYEPE	V.....T	PGQCNLWVER	LG DYILLEQGL			
Hordeum	..QGEAGAVI	R.GKKGSG..	.GITIKKTGQ	ALVFGIYEPE	V.....T	PGQCNLWVER	LG DYILLEQGL			
PpPRO1	..QGEAGAVI	R.GKKGSG..	.GITIKKTGQ	ALVFGIYEPE	V.....T	PGQCNLWVER	LG DYILLEQGL			
Zeal	..QGEAGAVI	R.GKKGSG..	.GITIKKTGQ	ALVFGIYEPE	V.....T	PGQCNLWVER	LG DYILLEQGL			
CdPRO1	..QGEAGAVI	R.GKKGSG..	.GITIKKTGQ	ALVFGIYEPE	V.....T	PGQCNLWVER	LG DYILLEQGL			
AcantII	..RADRSVY	..GKKGSA..	.GVTVKTSK	AILIGHVNEK	I.....Q	PGQCNLWVER	LG DYILLEQGL			
Physarum	..KADDSIY	..GKKGSA..	.GVTVKTSK	AILIGHVNEK	I.....Q	PGQCNLWVER	LG DYILLEQGL			
Saccharum	..RADRSIY	..GRHDAE..	.GVTVKTSK	AILIGHVNEK	I.....Q	PGQCNLWVER	LG DYILLEQGL			
Tetrahyme	..KYDADSQV	WYLLKDHG..	.GACIAITNQ	ALVIGTFEDIT	KKQONGVAQN	PGQCNLWVER	LG DYILLEQGL			
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Figura 3

ES 2 151 382 B1

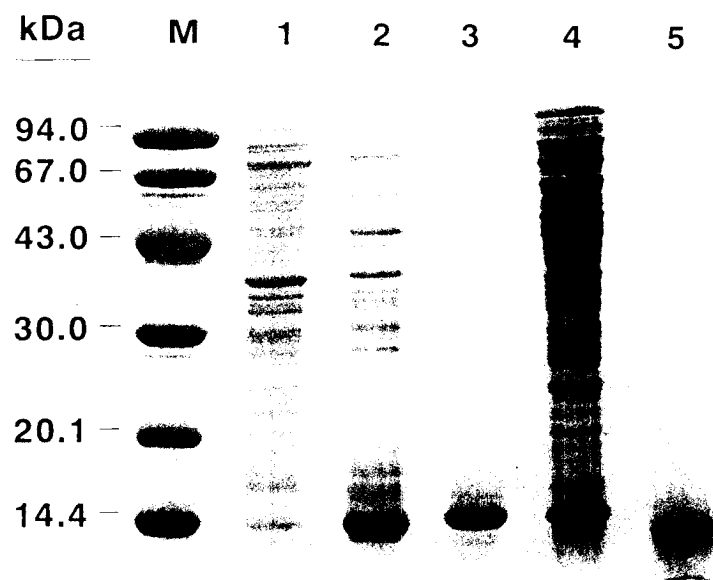


Figura 4

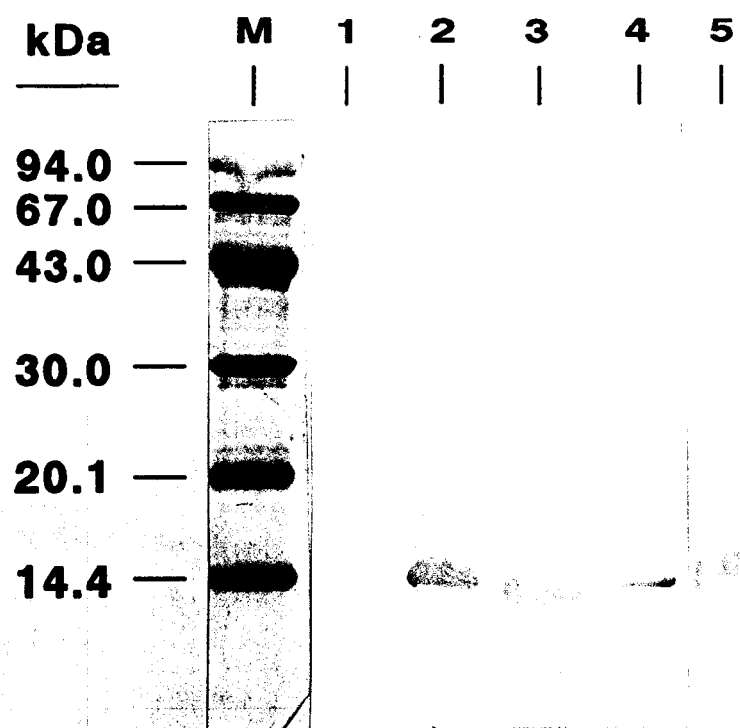


Figura 5

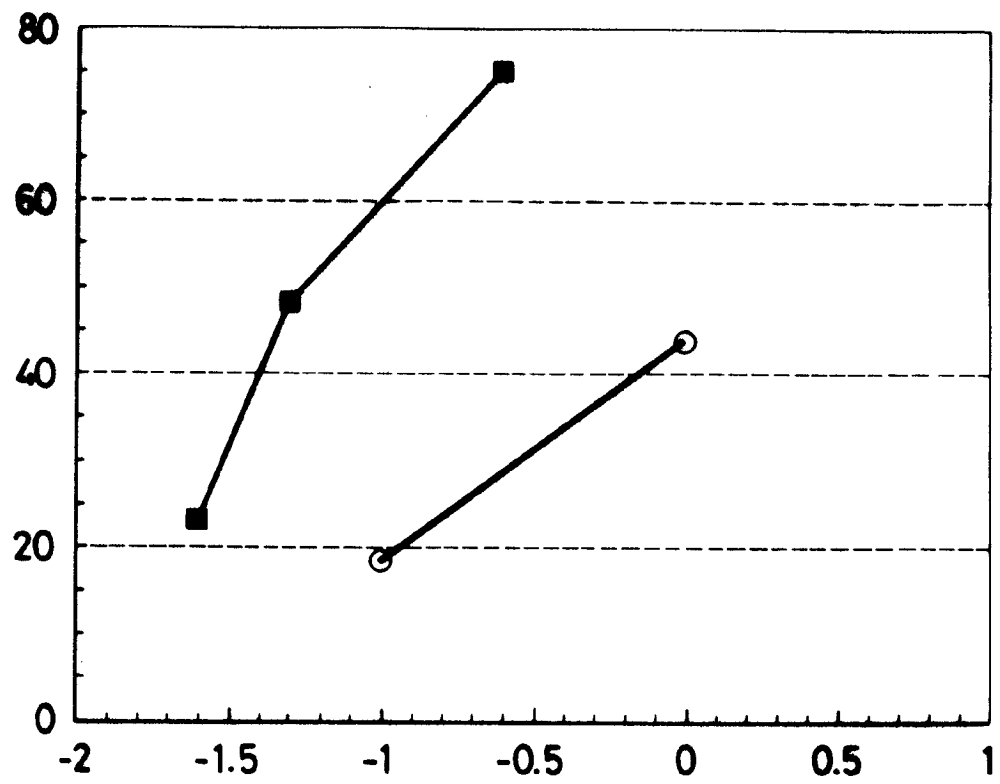


Figura 6

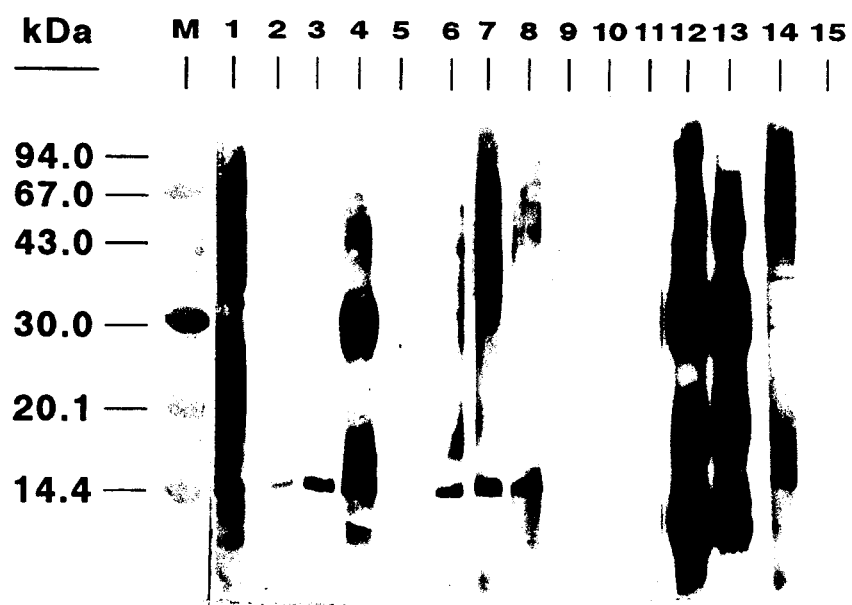


Figura 7



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 151 382
⑫ N.º solicitud: 009800536
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 12.03.1998
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: C12N 15/29, C07K 14/415, A61K 39/35, G01N 33/53

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	VALLIER, P. et al. "Identification of profilin as an IgE-binding component in latex from Hevea Brasiliensis: clinical implications", CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, 1995, Vol. 25, páginas 332-339. Todo el documento.	3,4,10-14
Y	Todo el documento.	1,2,5-9
Y	ASTURIAS, J.A. et al. "Recombinant DNA technology in Allergology: cloning and expression of plant profilins", ALLERGOL. ET IMMUNOPATHOL., 1997, Vol. 25, N° 3, páginas 127-134.	
A	EP 704457 A (THE BOARD OF THE RUBBER RESEARCH INSTITUTE OF MALAYSIA) 03.04.1996, todo el documento.	1-14
A	ARILLA, M.C. et al. "Production and characterization of profilin monoclonal antibodies", ALLERGOL. ET IMMUNOPATHOL., 1997, Vol. 25, N° 3, páginas 145-151. Todo el documento.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe 13.11.2000	Examinador J.L. Vizán Arroyo	Página 1/1
--	---------------------------------	---------------