

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/ES2006/000008

International filing date: 12 January 2006 (12.01.2006)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: ES  
Number: P200500047  
Filing date: 12 January 2005 (12.01.2005)

Date of receipt at the International Bureau: 13 March 2006 (13.03.2006)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)





MINISTERIO  
DE INDUSTRIA, TURISMO  
Y COMERCIO



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

ES 06/00008

8.

REC'D 13 MAR 2006

WIPO

PCT

## CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE DE INVENCION número P 200500047, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 2005-01-12.

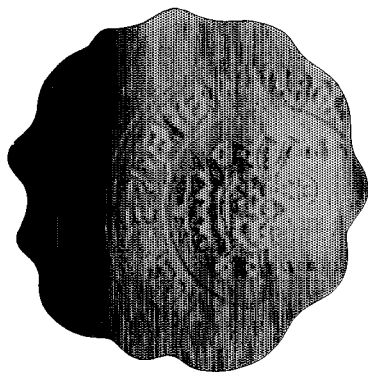
INDICACIÓN DE PRIORIDAD: El código del país con el número de su solicitud de prioridad, que ha de utilizarse para la presentación de solicitudes en otros países en virtud del Convenio de París, es: ES 200500047.

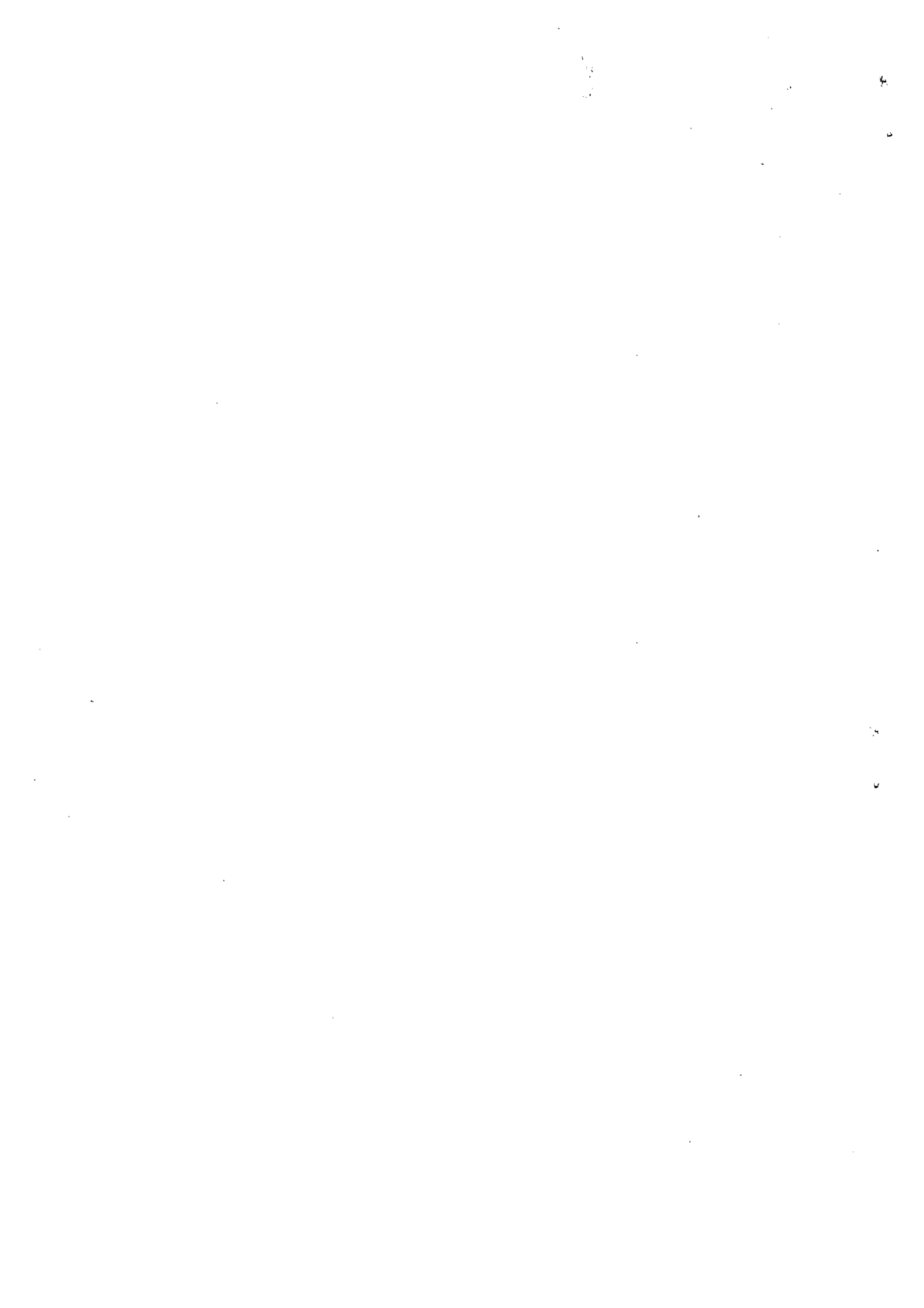
Madrid, 14 de Febrero de 2006

El Director del Departamento de Patentes  
e Información Tecnológica

P.D.

ANA Mª REDONDO MINGUEZ







MINISTERIO DE INDUSTRIA, TURISMO Y COMERCIO



Oficina Española de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

P200500047

5 ENE 12 12:37

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN:

Madrid

CÓDIGO

28

(1) MODALIDAD:

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD:

ADICIÓN A LA PATENTE

SOLICITUD DIVISIONAL

CAMBIO DE MODALIDAD

TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA

PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:

MODALIDAD

N° SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

NOMBRE

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA

CÓDIGO PAÍS

ES

DNI/CIF

Q2818002D

CNAE

PYME

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO Serrano, 117

LOCALIDAD Madrid

PROVINCIA Madrid

PAÍS RESIDENCIA España

NACIONALIDAD Española

TELÉFONO 91 585 50 00

FAX 91 585 52 87

CORREO ELECTRÓNICO

CÓDIGO POSTAL 28006

CÓDIGO PAÍS ES

CÓDIGO PAÍS ES

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Dpto. SECRETARÍA GENERAL  
REPROGRAFÍA  
Panamá, 1 - Madrid 28071

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO PAÍS

ALCHÉ RAMIREZ

ABDEL MOUNIM

CASTRO LÓPEZ

Juan de Dios

Hamman-Khalifa

Antonio

Española

Marroquí

Española

ES

MA

ES

(8)

EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

INVENC. LABORAL

CONTRATO

SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:

ÁCIDOS NUCLEICOS Y ALÉRGENOS DEL POLEN DE OLIVO DE VARIEDADES DEFINIDAS DE OLIVO Y APLICACIONES

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

SI

NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

CÓDIGO PAÍS

NÚMERO

FECHA

PAÍS DE ORIGEN

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

(15) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) ( RELLENÉSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

Juan ARIAS SANZ (0958/X); ABG Patentes, S.L.; Orense, 16; 8ºA; 28020 Madrid

(16) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

DESCRIPCIÓN N° DE PÁGINAS: 64

N° DE REIVINDICACIONES: 55

DIBUJOS. N° DE PÁGINAS: 6

LISTA DE SECUENCIAS N° DE PÁGINAS: 24

RESUMEN

DOCUMENTO DE PRIORIDAD

TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD

HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

OTROS: Disquete (Lutz Secuencas)

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retrada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.

MOD. 31011 - 1 - EJEMPLAR PARA EL EXPEDIENTE

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO

ILMA. SRA. DIRECTORA DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

informacion@oepm.es

www.oepm.es

C/ PANAMÁ, 1 • 28071 MADRID



MINISTERIO  
DE INDUSTRIA, TURISMO  
Y COMERCIO



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

HOJA DE INFORMACION COMPLEMENTARIA

NÚMERO DE SOLICITUD

**P200500047**

FECHA DE PRESENTACIÓN

**PATENTE DE INVENCION**

**MODELO DE UTILIDAD**

(5) SOLICITANTES:

APELLIDOS O  
DENOMINACIÓN SOCIAL

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO  
PAÍS

DNI/CIF

CNAE

PYME

(7) INVENTORES:

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

**RODRÍGUEZ GARCÍA**

**María Isabel**

**ESPAÑOLA**

(12) EXPOSICIONES OFICIALES:

LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

CÓDIGO  
PAÍS

NÚMERO

FECHA

PAÍS DE ORIGEN



MINISTERIO  
DE INDUSTRIA, TURISMO  
Y COMERCIO



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

**P200500047**

FECHA DE PRESENTACIÓN

## RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

### ÁCIDOS NUCLEICOS Y ALÉRGENOS DEL POLEN DE OLIVO DE VARIEDADES DEFINIDAS DE OLIVO Y APLICACIONES

Se han aislado, caracterizado e identificado ácidos nucleicos que codifican péptidos, o fragmentos de los mismos, que comprenden, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de variedades definidas de olivo (*Olea europea* L.). Dichos péptidos, que poseen uno o más epítipos alérgenicos del alérgeno mayoritario del polen de olivo (Ole e 1) tienen actividad alérgica y pueden ser utilizados, entre otras aplicaciones, en el diagnóstico y tratamiento de la alergia al polen de olivo. Dicha actividad alérgica de dichos péptidos o fragmentos de los mismos puede ser modulada mediante la introducción de modificaciones apropiadas con el fin de obtener variantes hipoalérgicas o hiperalérgicas. El empleo de alérgenos recombinantes específicos de variedades definidas de olivo permite, además, determinar perfiles individualizados de reactividad para cada paciente y el diseño de inmunoterapias personalizadas

GRÁFICO



EJEMPLAR ORIGINAL

12

**SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION**

21 NÚMERO DE SOLICITUD  
**P 200500047**

31 NÚMERO	DATOS DE PRIORIDAD 32 FECHA	33 PAÍS	22 FECHA DE PRESENTACIÓN <b>12 ENE. 2005</b>
71 SOLICITANTE (S)			62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISORIA

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

DOMICILIO **Serrano, 117; 28006 - Madrid** NACIONALIDAD **Española**

72 INVENTOR (ES) **Alché Ramirez, Juan de Dios; Abdel Mounim, Hamman-Khalifa; Castro López, Antonio Jesús; Rodríguez García, María Isabel**

51 Int. Cl.	GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)
-------------	---

54 TÍTULO DE LA INVENCION  
**ÁCIDOS NUCLEICOS Y ALÉRGENOS DEL POLEN DE OLIVO DE VARIETADES DEFINIDAS DE OLIVO Y APLICACIONES**

57 RESUMEN

**ÁCIDOS NUCLEICOS Y ALÉRGENOS DEL POLEN DE OLIVO DE VARIETADES DEFINIDAS DE OLIVO Y APLICACIONES**

Se han aislado, caracterizado e identificado ácidos nucleicos que codifican péptidos, o fragmentos de los mismos, que comprenden, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de variedades definidas de olivo (*Olea europaea* L.). Dichos péptidos, que poseen uno o más epítipos alergénicos del alérgeno mayoritario del polen de olivo (Ole e 1) tienen actividad alergénica y pueden ser utilizados, entre otras aplicaciones, en el diagnóstico y tratamiento de la alergia al polen de olivo. Dicha actividad alergénica de dichos péptidos o fragmentos de los mismos puede ser modulada mediante la introducción de modificaciones apropiadas con el fin de obtener variantes hipoalergénicas o hiperalergénicas. El empleo de alérgenos recombinantes específicos de variedades definidas de olivo permite, además, determinar perfiles individualizados de reactividad para cada paciente y el diseño de inmunoterapias personalizadas.

## ÁCIDOS NUCLEICOS Y ALÉRGENOS DEL POLEN DE OLIVO DE VARIEDADES DEFINIDAS DE OLIVO Y APLICACIONES

### CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La invención se relaciona con ácidos nucleicos que codifican péptidos que comprenden, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo (*Olea europaea L.*). La invención también se relaciona con los péptidos resultantes de la expresión de dichos ácidos nucleicos y con las aplicaciones de dichos ácidos nucleicos y péptidos con fines de diagnóstico y tratamiento de la alergia al polen de olivo,  
10 entre otras aplicaciones.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El olivo (*Olea europaea L.*) es uno de los cultivos de mayor importancia en el área Mediterránea, donde ha sido cultivado durante milenios. El cultivo extensivo de esta planta  
15 ha conducido a la aparición de un germoplasma extremadamente amplio y variado, con al menos 262 cultivares identificados solamente en España. Hasta muy recientemente, la caracterización de los cultivares de olivo se ha realizado primariamente de acuerdo a parámetros morfológicos y agronómicos. Sin embargo, está emergiendo la utilización de técnicas moleculares con la finalidad de hacer esta caracterización varietal mucho más  
20 fiable, rápida y sencilla.

El polen del olivo es uno de los más importantes agentes causales de fenómenos de alergia estacional en humanos, más concretamente de las alergias de tipo I, en aquellos países en los que esta planta está ampliamente distribuida. El alérgeno mayoritario de este polen (denominado Ole e 1) es una proteína de 20 kDa que ha sido aislada, secuenciada,  
25 clonada y expresada en *Escherichia coli* [Lauzurica et al. Olive (*Olea europaea*) pollen allergens I. Immunochemical characterization by immunoblotting, CRIE and immunodetection by a monoclonal antibody. Mol. Immunol. 1988; 25: 329-335; Lauzurica et al. Olive (*Olea europaea*) pollen allergens II. Isolation and characterization of two major antigens. Mol Immunol. 1988; 25: 337-344; Villalba et al. Isolation of three allergenic  
30 fractions of the major allergen from *Olea europaea* pollen and N-terminal amino acid sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990; 172:523-528; Villalba et al. The amino acid sequence of *Ole e 1*, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. Eur J Biochem 1993; 216: 863-869; Villalba et al. Cloning and expression of *Ole e 1*, the major



allergen from olive tree pollen. J Biol Chem 1994; 269:15217-15222; Martín-Orozco et al. Ole e 1: epitope mapping, cross-reactivity with other Oleaceae pollens and ultrastructural localization. Int. Arch. Allergy Immunol. 1994; 104: 160-170; Lombardero et al. cDNA sequence analysis of the main olive allergen, *Ole e 1*. Clin Exp Allergy 1994; 24:765-770; Batanero et al. Glycosylation site of the major allergen from olive tree. Allergenic implications of the carbohydrate moiety. Mol. Immunol. 1994; 31: 31-37; Batanero et al. IgE binding and histamine-release capabilities of the main carbohydrate component isolated from the major allergen of olive tree pollen. J. Allergy Clin. Immunol. 1999; 103:147-153].

Ole e 1 consiste en una sola cadena polipeptídica de 145 aminoácidos que presenta diversas formas de glicosilación que incluyen fundamentalmente una forma no-glicosilada de 18,4 kDa, una forma glicosilada de 20 kDa, una forma hiperglicosilada de 22 kDa y otra variante de 40 kDa compuesta de dímeros de la forma glicosilada [Villalba et al. The amino acid sequence of *Ole e 1*, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. Eur J Biochem 1993; 216: 863-869; Villalba et al. Cloning and expression of *Ole e 1*, the major allergen from olive tree pollen. J Biol Chem 1994; 269:15217-15222]. La secuencia de Ole e 1 presenta una homología relevante (24-34%) con otras proteínas del polen de maíz, tomate, centeno, abedul, arroz, *Arabidopsis* etc. Esta identidad aumenta a un 85% cuando se compara con proteínas análogas a Ole e 1 de otros miembros de la familia *Oleaceae* (*Fraxinus excelsior*, *Ligustrum vulgare*, *Syringa vulgare*, *Forsythia suspensa*). El propio Ole e 1 muestra también microheterogeneidades en diversas posiciones de su secuencia aminoacídica. Además de la proteína alergénica Ole e 1, están siendo caracterizadas muchas otras proteínas del polen del olivo (Ole e 2, Ole e 3, ... y sucesivamente hasta Ole e 10) capaces de unirse a anticuerpos IgE humanos, y, por tanto, catalogadas como alérgenos:

**Ole e 2:** Asturias et al. Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen. J Allergy Clin Immunol. 1997 Sep; 100(3):365-72; Martínez et al. The allergenic relevance of profilin (Ole e 2) from *Olea europaea* pollen. Allergy. 2002;57 Suppl 71:17-23;

**Ole e 3:** Batanero et al. Isolation, cDNA cloning and expression of Lig v 1, the major allergen from privet pollen. Clin Exp Allergy. 1996; 26(12):1401-10; Ledesma et al. Molecular cloning and expression of active Ole e 3, a major allergen from olive-tree pollen and member of a novel family of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins (polcalcins) involved in allergy. Eur J Biochem. 1998; 258(2):454-459;

**Ole e 4 y Ole e 5:** Boluda et al. Purification, characterization, and partial sequencing of two new allergens of *Olea europaea*. *J Allergy Clin Immunol.* 1998 Feb; 101(2 Pt 1):210-6; Carnes & Fernandez-Caldas. Ole e 4 and Ole e 5, important allergens of *Olea europaea*. *Allergy.* 2002; 57 Suppl 71:24-28;

5 **Ole e 5:** Alché et al. Superoxide dismutase isoenzymes of olive pollen. *Physiol. Plantarum* 104, 772-776. 1998;

**Ole e 6:** Batanero et al. Purification, amino acid sequence and immunological characterization of Ole e 6, a cysteine-enriched allergen from olive tree pollen. *FEBS Lett.* 1997 Jun 30;410 (2-3):293-6;

10 **Ole e 7:** Florido Lopez et al. An allergen from *Olea europaea* pollen (Ole e 7) is associated with plant-derived food anaphylaxis. *Allergy.* 2002; 57 Suppl 71:53-9; Tejera et al. Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 104:797-802;

15 **Ole e 8:** Ledesma A, Villalba M, Vivanco F, Rodriguez R. Olive pollen allergen Ole e 8: identification in mature pollen and presence of Ole e 8-like proteins in different pollens. *Allergy.* 2002 Jan; 57(1):40-3;

20 **Ole e 9:** Palomares et al. The C-terminal segment of the 1,3-beta-glucanase Ole e 9 from olive (*Olea europaea*) pollen is an independent domain with allergenic activity: expression in *Pichia pastoris* and characterization. *Biochem J.* 2003; 369:593-601; Huecas et al. Ole e 9, a major olive pollen allergen is a 1,3-beta-glucanase. Isolation, characterization, amino acid sequence, and tissue specificity. *J Biol Chem.* 2001; 276(30):27959-66. Epub 2001 May 23; y

25 **Ole e 10:** Barral et al. A major allergen from pollen defines a novel family of plant proteins and shows intra- and interspecie cross-reactivity. *J Immunol.* 2004; 172(6):3644-3651.

30 Tanto la diagnosis como el tratamiento de la alergia al polen del olivo se basan actualmente en la utilización de extractos proteicos obtenidos a partir de dicho polen, mediante diversos procedimientos. Los extractos obtenidos tienen que ser estandarizados según recomendaciones de la OMS a través de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología, Subcomité de Estandarización de Alérgenos (WHO Expert Committee on Biological Standardisation. Guidelines for the preparation and establishment of reference materials and reference reagents for biological substances. WHO Technical Report Series

No. 626, 1978). Dicha organización mantiene diversos patrones, aunque los fabricantes de extractos poseen patrones internos para su propia referencia.

5 Diversos trabajos científicos están caracterizando la presencia de elevada variabilidad en el contenido alergénico del polen del olivo (y en consecuencia en los extractos producidos a partir de dicho polen) proveniente de diversas distribuciones geográficas, y concretamente de distintas variedades de esta planta. Debido a que la alergenicidad depende del material usado en inmunoterapia, el cual varía según la variedad de la que proceda el polen, se ha prestado gran atención a la tecnología del ADN recombinante como una alternativa viable a la producción de alérgenos recombinantes, facilitando así su caracterización a nivel  
10 molecular, y su uso en diagnóstico y terapia.

Los alérgenos recombinantes serían capaces de eliminar en parte la variabilidad natural propia de las fuentes alergénicas, dando lugar a preparaciones homogéneas, controladas y reproducibles, con gran uso diagnóstico, terapéutico y preventivo. Igualmente permitirían el diseño de derivados hipoadérgicos para su empleo en vacunas de  
15 desensibilización, así como el diseño de nuevos métodos de vehiculización y administración de estos compuestos, obtenidos a través de diferentes metodologías que están siendo desarrolladas actualmente y nuevas herramientas terapéuticas [Vrtala et al. Strategies for converting allergens into hypoallergenic vaccine candidates. *Methods*. 2004 Mar; 32(3):313-20; Bohle & Vieths. Improving diagnostic tests for food allergy with recombinant allergens. *Methods*. 2004; 32(3):292-9; Cromwell et al. Transition of recombinant allergens from  
20 bench to clinical application. *Methods*. 2004; 32(3):300-12; van Hage-Hamsten & Pauli. Provocation testing with recombinant allergens. *Methods*. 2004; 32(3):281-91; Herz et al. Animal models of type I allergy using recombinant allergens. *Methods*. 2004; 32(3):271-80; Valent et al. Assays for measuring in vitro basophil activation induced by recombinant  
25 allergens. *Methods*. 2004; 32(3):265-70; Thomas et al. Recombinant allergens for analysing T-cell responses. *Methods*. 2004; 32(3):255-64; Deinhofer et al. Microarrayed allergens for IgE profiling. *Methods*. 2004; 32(3):249-54; Obermeyer et al. Over-expression and production of plant allergens by molecular farming strategies. *Methods*. 2004; 32(3):235-40; Wallner et al. Lab scale and medium scale production of recombinant allergens in  
30 *Escherichia coli*. *Methods*. 2004; 32(3):219-26; Slater JE. Recombinant allergens in the US. *Methods*. 2004; 32(3):209-11; Valenta & Kraft. Recombinant allergens: from production and characterization to diagnosis, treatment, and prevention of allergy. *Methods*. 2004; 32(3):207-208; Rhyner et al. Cloning allergens via phage display. *Methods*. 2004;

32(3):212-218; Verdino & Keller. Circular dichroism analysis of allergens. *Methods*. 2004; 32(3):241-248; Wagner et al. Plant virus expression systems for transient production of recombinant allergens in *Nicotiana benthamiana*, *Methods*. 2004; 32(3):227-234; Riemer et al. Allergen mimotopes. *Methods*. 2004; 32(3):321-327; Hartl et al. DNA vaccines for allergy treatment. *Methods*. 2004; 32(3):328-339; Bhalla & Singh. Knocking out expression of plant allergen genes. *Methods*. 2004; 32(3):340-345].

Algunos alérgenos del polen del olivo y otras oleáceas han sido ya expresados de forma recombinante [Villalba et al. Cloning and expression of *Ole e 1*, the major allergen from olive tree pollen. *J Biol Chem* 1994; 269:15217-15222; Batanero et al. Isolation, cDNA cloning and expression of Lig v 1, the major allergen from privet pollen. *Clin Exp Allergy*. 1996; 26(12):1401-10; Asturias et al. Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (*Ole e 1*) from olive tree pollen. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Sep; 100(3):365-72; Ledesma et al. Molecular cloning and expression of active *Ole e 3*, a major allergen from olive-tree pollen and member of a novel family of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins (polcalcins) involved in allergy. *Eur J Biochem*. 1998; 258(2):454-459; Ledesma et al. Cloning, expression and characterization of a novel four EF-hand Ca(2+)-binding protein from olive pollen with allergenic activity. *FEBS Lett*. 2000; 466(1):192-6; Huecas et al. Production and detailed characterization of biologically active olive pollen allergen *Ole e 1* secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Eur. J. Biochem*. 1999; 261: 539-545; Gonzalez et al. Immunological and molecular characterization of the major allergens from lilac and privet pollens overproduced in *Pichia pastoris*. *Clin Exp Allergy*. 2001; 31(2):313-21; Palomares et al. The C-terminal segment of the 1,3-beta-glucanase *Ole e 9* from olive (*Olea europaea*) pollen is an independent domain with allergenic activity: expression in *Pichia pastoris* and characterization. *Biochem J*. 2003; 369:593-601].

En el caso particular del alérgeno *Ole e 1*, la producción de varias isoformas recombinantes ha sido utilizada para determinar el papel del plegamiento de la proteína, del componente glicosídico y de varios cambios puntuales en la secuencia aminoacídica en la capacidad de unión de anticuerpos monoclonales y de inmunoglobulinas IgE humanas al alérgeno [Gonzalez et al. Influence of the 3D-conformation, glycan component and microheterogeneity on the epitope structure of *Ole e 1*, the major olive allergen. Use of recombinant isoforms and specific monoclonal antibodies as immunological tools. *Mol Immunol*. 2002; 39(1-2):93-101]. Sin embargo, en ninguno de los casos citados se menciona

la composición varietal del polen de partida o el origen varietal de la secuencia de alérgeno usada en la forma recombinante.

5 La alergia al polen del olivo sigue representando actualmente un tópico de salud pública. Los reactivos actualmente existentes para diagnóstico e inmunoterapia de la atopia al polen del olivo no especifican la composición varietal de partida del polen utilizado para la preparación de dichos reactivos. Por ello, no es posible, entre otras cosas, identificar la variedad concreta de olivo frente a la cual el paciente de alergia está sensibilizado ni diseñar una inmunoterapia personalizada administrando el alérgeno apropiado en la pauta terapéutica adecuada.

10 Existe, por tanto, la necesidad de identificar los alérgenos de polen de olivo específicos de variedades definidas de olivo con el fin de optimizar el diagnóstico y tratamiento de la alergia al polen de olivo.

### COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

15 La invención proporciona una solución a la necesidad existente. Para ello, se han aislado, caracterizado e identificado los ácidos nucleicos que codifican péptidos, o fragmentos de los mismos, que comprenden, al menos, un epítopo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de variedades definidas de olivo (*Olea europea L.*). Dichos péptidos, que poseen uno o más epítomos alergénicos del alérgeno mayoritario del polen de olivo (Ole e 1) 20 tienen actividad alergénica y pueden ser utilizados, entre otras aplicaciones, en el diagnóstico y tratamiento de la alergia al polen de olivo. Dicha actividad alergénica de dichos péptidos o fragmentos de los mismos puede ser modulada mediante la introducción de modificaciones apropiadas con el fin de obtener variantes hiipoalergénicas o hiperalergénicas.

25 La invención, por tanto, proporciona una mejora del diagnóstico y tratamiento de la alergia al polen del olivo basada en el empleo de alérgenos recombinantes específicos de variedades definidas de olivo. El uso de dichos alérgenos permite, entre otras aplicaciones, determinar perfiles individualizados de reactividad para cada paciente y el diseño de inmunoterapias igualmente personalizadas.

30 Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un ácido nucleico que codifica un péptido que comprende, al menos, un epítopo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo (*Olea europea L.*). Las construcciones génicas, vectores recombinantes y sistemas de expresión que comprenden dicho ácido nucleico constituyen un aspecto adicional de esta invención.

Otro aspecto de esta invención lo constituye un péptido que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo (*Olea europea*). El procedimiento para la obtención de dicho péptido y sus aplicaciones constituyen aspectos adicionales de esta invención. En una realización particular, dicho péptido es una variante hipoalérgica o hiperalérgica del mismo.

Otro aspecto de esta invención lo constituye un anticuerpo capaz de unirse a un péptido que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo. El procedimiento para la obtención de dicho anticuerpo y sus aplicaciones constituyen aspectos adicionales de esta invención.

Otro aspecto de esta invención lo constituye un soporte sólido que comprende bien una pluralidad de ácidos nucleicos, en donde cada uno de dichos ácidos nucleicos está separado del resto de ácidos nucleicos y su secuencia nucleotídica codifica, al menos, un epítipo de un alérgeno de polen de olivo específico de una variedad definida de olivo; o bien una pluralidad de péptidos, en donde cada uno de dichos péptidos está separado del resto de péptidos y comprende, al menos, un epítipo de un alérgeno de polen de olivo específico de una variedad definida de olivo, o bien una pluralidad de anticuerpos, en donde cada uno de dichos anticuerpos está separado del resto de anticuerpos y es capaz de unirse a un péptido que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo.

Otro aspecto de esta invención lo constituye una composición farmacéutica que comprende, como sustancia activa, al menos, uno de dichos péptidos o anticuerpos. El empleo de dichos péptidos y anticuerpos en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de la alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo constituye un aspecto adicional de la invención.

Otro aspecto de esta invención lo constituye un método *in vivo* para el diagnóstico de alergia a polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto.

Otro aspecto de esta invención lo constituye un método *in vitro* para (i) el diagnóstico de alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto, o para (ii) determinar la evolución del curso de la alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto, o para (iii) evaluar la eficacia de un tratamiento contra alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto.

Los kits para la puesta en práctica de dichos métodos constituyen un aspecto adicional de esta invención.

Otro aspecto de esta invención lo constituye el empleo de dichos ácidos nucleicos y péptidos para obtener productos derivados de dichos ácidos nucleicos o péptidos, potencialmente útiles en investigación, diagnóstico, terapia y/o prevención de alergia al polen de olivo y/o en la caracterización de cultivares de olivo. Los productos derivados de dichos ácidos nucleicos y péptidos constituyen un aspecto adicional de esta invención.

Otro aspecto de esta invención lo constituye un método *in vitro* para identificar el alérgeno del polen de la variedad de olivo causante de alergia en un sujeto o para identificar la variedad de olivo causante de alergia en un sujeto.

Otro aspecto de esta invención lo constituye un método para diseñar una terapia personalizada para un sujeto que padece alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra los alineamientos aminoacídicos de los péptidos (SEQ ID NO: 27-50) entre sí y con respecto a las secuencias depositadas en GenBank con número de acceso X76395 y X76396, e incluye las posiciones de los epítomos inmunodominantes de Ole e 1 responsables de la unión a células T.

La Figura 2 es una representación esquemática y genérica de una aproximación para la obtención de las secuencias de los alérgenos de polen de olivo individuales específicos de variedades definidas de olivo.

La Figura 3 es una gráfica que muestra las relaciones correspondientes entre las variedades de olivo consideradas.

La Figura 4 es una representación esquemática de un procedimiento para la construcción de variantes hipoalérgicas recombinantes (Ejemplo 2).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### A. Acido nucleico, construcciones génicas y vectores recombinantes

En un aspecto, la invención se relaciona con un ácido nucleico que codifica un péptido que comprende, al menos, un epítomo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo (*Olea europea L.*), en adelante ácido nucleico de la invención, en donde dicho ácido nucleico se selecciona entre:

- 5 a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las secuencias de nucleótidos identificadas como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24; o un fragmento de dichas secuencias de nucleótidos;
- 10 b) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido cuya secuencia de aminoácidos se selecciona entre las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50, o un fragmento del mismo;
- 15 c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a) o b);
- d) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida con las secuencias de nucleótidos definidas en a), b) o c);
- 20 e) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos derivable por degeneración de las secuencias de nucleótidos definidas en a), b), c), o d); o
- f) un ácido nucleico que comprende una secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias definidas en a)-e).

25 El péptido codificado por el ácido nucleico de la invención (denominado más adelante, péptido de la invención) tiene, en general, actividad alergénica y comprende, al menos, un epítipo alergénico del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo. Adicionalmente, dicho péptido puede contener una región responsable de la unión a células T o una región responsable de la unión a IgE o una región responsable de la modulación de la unión a la IgE. Se han definido algunos epítipos inmunodominantes de 30 Ole e 1 responsables de la unión a células T [Cárdaba et al. "Olive pollen allergy: searching



for immunodominant T-cell epitopes on the Ole e 1 molecule” Clin. Exper. Allergy 28:413-422. 1998]. Estas regiones corresponden a las posiciones 91-102, 109-120 y 119-130 de la secuencia aminoacídica de Ole e 1 definida por Villalba et al. [Villalba M, Batanero E, López-Otín et al. “The amino acid sequence of Ole e 1, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. Eur. J. Biochem. 216:863-869. 1993]. Dichos epítomos no son reconocidos por anticuerpos IgE. El componente glucídico de Ole e 1 muestra una moderada capacidad de unir anticuerpos (IgGs) monoclonales murinos. En la Figura 1 se muestran los alineamientos aminoacídicos de los péptidos de la invención (SEQ ID NO: 27-50) entre sí y con respecto a las secuencias depositadas en GenBank con número de acceso X76395 y X76396, así como las posiciones de los epítomos inmunodominantes de Ole e 1 responsables de la unión a células T (epítomos a, b y c).

En una realización particular, el ácido nucleico de la invención comprende, o está constituido por, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las secuencias de nucleótidos identificadas como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24. Dichas secuencias nucleotídicas son secuencias de cDNA que codifican para el alérgeno Ole e 1 de las variedades Picholine (SEQ ID NO: 1-3), Menara (SEQ ID NO: 4-6), Lucio (SEQ ID NO: 7-9), Picual (SEQ ID NO: 10-12), Loaime (SEQ ID NO: 13-15), Hojiblanca (SEQ ID NO: 16-18), Arbequina (SEQ ID NO: 19-21) y Bella de España (SEQ ID NO: 22-24), clones 1, 2 y 3 en todos los casos.

Las diferencias observadas en la longitud de las secuencias nucleotídicas (SEQ ID NO: 1-24) se deben al empleo, para su generación, de un método de amplificación mediante RT-PCR a partir de mRNA total de polen de olivo. En dicho método se utilizan un adaptador oligo-dT (SEQ ID NO: 51) y el oligonucleótido Ole e 1 (SEQ ID NO: 52), de forma que las secuencias obtenidas presentan las dos características diferenciales siguientes:

- debido al diseño del oligonucleótido Ole e 1 (SEQ ID NO: 52), las secuencias obtenidas no incluyen el codón de iniciación ATG ni los nucleótidos 1-38 de las secuencias descritas para Ole e 1 por Villalba et al. [Villalba M, Batanero E, Monsalve RI, Gonzalez de la Peña MA, Lahoz C and Rodriguez R. “Cloning and

expression of Ole e 1, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity" J. Biol. Chem. 269 (21), 15217-15222 (1994); Número de acceso GenBank: X76395]; y

- 5 - al utilizarse un adaptador oligo-dT son amplificadas tanto la región codificante como la región no codificante 3' de los mensajeros correspondientes; las diferencias existentes en longitud entre los distintos clones se deben fundamentalmente a la diferente longitud de esas regiones no codificantes 3'. Merece la pena mencionar la ausencia de un fragmento de 39 nucleótidos de dicha región que no aparece en ninguno de los tres clones secuenciados de la
- 10 variedad Bella de España (SEQ ID NO: 22-24).

En otra realización particular, el ácido nucleico de la invención comprende, o está constituido por, un fragmento de dichas secuencias SEQ ID NO: 1-24 que codifica un péptido que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo. El péptido codificado por dicho fragmento nucleotídico tiene

15 actividad alérgica y comprende, al menos, un epítipo alérgico del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo. Adicionalmente, dicho péptido puede contener una región responsable de la unión a células T o una región responsable de la unión a IgE o una región responsable de la modulación de la unión a la IgE, tal como se ha mencionado previamente.

20 En otra realización particular, el ácido nucleico de la invención comprende, o está constituido por, una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido cuya secuencia de aminoácidos se selecciona entre las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38,

25 SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50, o un fragmento del mismo. Dichas secuencias aminoacídicas corresponden a las secuencias de aminoácidos del alérgeno Ole e 1 de las variedades Picholine (SEQ ID NO: 27-29), Menara (SEQ ID NO: 30-32), Lucio (SEQ ID NO: 33-35),

30 Picual (SEQ ID NO: 36-38), Loaime (SEQ ID NO: 39-41), Hojiblanca (SEQ ID NO: 42-44), Arbequina (SEQ ID NO: 45-47) y Bella de España (SEQ ID NO: 48-50), clones 1, 2 y 3 en todos los casos.

Las diferencias observadas en la longitud de las secuencias aminoacídicas (SEQ ID NO: 27-50) se explican de la misma manera que las diferencias observadas en la longitud de las secuencias nucleotídicas mencionadas más arriba ya que se ha utilizado una estrategia de RT-PCR que genera clones parciales de Ole e 1, puesto que el oligonucleótido Ole e 1 (SEQ ID NO: 52) hibrida desde el nucleótido 38 a partir de la secuencia descrita para Ole e 1 por Villalba et al. [Villalba M, Batanero E, Monsalve RI, Gonzalez de la Peña MA, Lahoz C and Rodriguez R: "Cloning and expression of Ole e 1, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity" J. Biol. Chem. 269 (21), 15217-15222 (1994); Número de acceso GenBank: X76395].

En otra realización particular, el ácido nucleico de la invención comprende, o está constituido por, una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a) o b). En el sentido utilizado en esta descripción, el término "análoga" pretende incluir a cualquier secuencia de nucleótidos que codifica un péptido con actividad alergénica que comprende, al menos, un epítipo alergénico del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo. Dicha secuencia análoga (i) es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos definida en a); y/o (ii) codifica un péptido que es sustancialmente homólogo al péptido codificado por la secuencia de nucleótidos definida en a) o en b).

Típicamente, una secuencia análoga de nucleótidos:

- se puede aislar de cualquier organismo que produce un péptido con actividad alergénica que comprende, al menos, un epítipo alergénico del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1-24; o

- se construye en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1-24, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o bien mediante la inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la secuencia, o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia.

En general, una secuencia de nucleótidos análoga a una segunda secuencia de nucleótidos es una secuencia sustancialmente homóloga a dicha segunda secuencia nucleotídica, es decir, presenta una homología a nivel de nucleótidos de, al menos, un 60%, típicamente, al menos, un 70%, ventajosamente, al menos, un 80%, preferentemente, al menos un 90%, o más preferentemente, al menos, un 95% respecto a dicha segunda secuencia de nucleótidos.

En otra realización particular, el ácido nucleico de la invención comprende, o está constituido por, una secuencia de nucleótidos que hibrida con las secuencias de nucleótidos definidas en a), b) o c). Las condiciones bajo las cuales hibridan cadenas de ácidos nucleicos totalmente complementarias se denominan “condiciones muy severas de hibridación” o “condiciones de hibridación específicas de secuencia”. No obstante, se pueden obtener cadenas dobles estables de ácidos nucleicos sustancialmente complementarias bajo condiciones de hibridación menos severas, denominadas genéricamente “condiciones severas de hibridación”, en cuyo caso, el grado de desapareamiento tolerado puede ajustarse mediante ajuste apropiado de las condiciones de hibridación. El experto en la materia puede determinar empíricamente la estabilidad de un dúplex teniendo en cuenta diversas variables, tales como, la longitud y concentración de pares de bases de las sondas, la fuerza iónica y la incidencia de los pares de bases desapareados, siguiendo las directrices del estado de la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); y Wetmur, *Critical Reviews in Biochem. and Mol. Biol.* 26 (3/4):227-259 (1991)). A modo ilustrativo, en una realización particular, las condiciones severas de hibridación comprenden, por ejemplo, una concentración comprendida entre 0,15 M y 0,9 M de NaCl y una temperatura comprendida entre 20°C y 65°C. En otra realización particular, las condiciones muy severas de hibridación comprenden, por ejemplo, una concentración comprendida entre 0,02 M y 0,15 M de NaCl y una temperatura comprendida entre 50°C y 70°C.

En otra realización particular, el ácido nucleico de la invención comprende, o está constituido por, una secuencia de nucleótidos derivable por degeneración de las secuencias de nucleótidos definidas en a), b), c), o d). Un ejemplo ilustrativo de este tipo incluye ácidos nucleicos cuyas secuencias contienen modificaciones conservativas, es decir, cambios de nucleótidos que no afectan a la secuencia de aminoácidos.

En otra realización particular, el ácido nucleico de la invención comprende, o está constituido por, una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de las secuencias definidas en a)-d).

El ácido nucleico de la invención puede obtenerse por métodos convencionales. Con el fin de identificar correctamente el alérgeno de cada variedad de olivo es imprescindible controlar el material a tratar, en particular, es imprescindible identificar, recolectar y almacenar apropiadamente el material a tratar dado que una de las características

determinantes de esta invención consiste en el empleo de polen de olivo procedente de variedades o cultivares definidos, de forma individual para cada variedad. Para ello se utilizan árboles perfectamente caracterizados agronómicamente, en base a los criterios disponibles bien establecidos en la bibliografía (pomológicos, isoenzimáticos, moleculares, etc.). El polen es recolectado de forma individualizada en cada cultivar, con la utilización de procedimientos convencionales, tales como embolsado de las inflorescencias en el momento previo a la antesis, aspiración etc. Una vez recolectado, el polen es (i) purificado mediante procedimientos de tamizado, filtración, etc., para eliminar componentes contaminantes, (ii) caracterizado mediante diversos tipos de procedimientos analíticos (e.g., mediante diversos tipos de microscopías) y (iii) convenientemente almacenado.

La obtención de las secuencias de alérgenos individualmente para el polen de cada variedad puede realizarse a partir de muy diversas aproximaciones moleculares (e.g., por amplificación de la región codificante mediante PCR a partir de cDNA, exploración de bibliotecas de expresión con sueros de pacientes, etc.). A continuación, se describe brevemente una de las aproximaciones más simples, mostrada esquemáticamente en la Figura 2, realizada mediante amplificación de la región codificante a partir de cDNAs, mediante PCR. Para ello, se procede a la extracción de RNA total y/o RNA mensajero (mRNA) a partir de las muestras de polen de olivo, de forma individual para cada variedad. La extracción del RNA (total o mensajero) puede realizarse mediante el empleo de técnicas convencionales, tales como las estandarizadas en diferentes publicaciones especializadas o a través de kits comerciales de extracción. Una vez aislado dicho RNA, se determina su calidad y concentración mediante métodos convencionales, tales como espectrofotometría o electroforesis, y se procede a su conversión en cDNA mediante transcripción inversa según procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia o bien utilizando kits comerciales específicos, mediante el empleo de una transcriptasa inversa y un oligonucleótido adecuado. A partir de los cDNAs correspondientes pueden amplificarse las secuencias de los alérgenos mediante reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias descritas para los alérgenos ya conocidos del polen del olivo (e.g., Ole e 1). Los productos de PCR obtenidos son clonados en vectores adecuados para el análisis de su secuencia, su expresión, transformación, etc. Como paso previo, se procede a la determinación de las secuencias clonadas.

A continuación, con el fin de obtener los alérgenos recombinantes de las distintas variedades de olivo se procede por métodos convencionales. Brevemente, las secuencias de

los alérgenos obtenidos tal como se ha mencionado previamente o mediante métodos análogos o similares al descrito previamente, en cada una de las variedades de olivo elegidas, pueden ser expresadas *in vitro* en un sistema de expresión de proteínas recombinantes apropiado, por ejemplo, en sistemas bacterianos, levaduras, virus (e.g., baculovirus, etc.),  
5 células de animales, células vegetales, etc., siendo especialmente importante este diseño experimental en el caso de alérgenos glicosilados. La expresión *in vitro* puede realizarse en la forma de una proteína de fusión del alérgeno de interés, conjugado a una cola de fusión para facilitar la purificación (poli-His, tioredoxina, glutatión S-transferasa, proteína de unión a maltosa, biotina, etc.), o bien directamente sin la expresión de dicha cola de fusión. Otra  
10 alternativa consiste en la aplicación de procedimientos de traducción *in vitro*. En general, para cada alérgeno, debe ser optimizado tanto el tipo de vector de expresión utilizado como las condiciones de la inducción del cultivo, la producción a gran escala y las condiciones de purificación. Una vez purificado, el alérgeno recombinante es investigado ampliamente en sus propiedades bioquímicas, biofísicas, biológicas e inmunológicas tanto *in vivo* como *in*  
15 *vitro*. En el caso de proteínas de fusión debe valorarse la escisión previa de la cola de fusión, generalmente mediante digestiones con endoproteinasas, y, en el caso de productos insolubles, debe valorarse la renaturalización de la proteína de forma previa a su caracterización.

El Ejemplo 1 ilustra un procedimiento para la obtención de secuencias de alérgenos Ole e 1 recombinantes de distintas variedades definidas de olivo.  
20

Para obtener los alérgenos Ole e 1 recombinantes específicos de variedades definidas de olivo proporcionados por esta invención mediante la clonación de los ácidos nucleicos de la invención en un sistema de expresión de proteínas recombinantes es preciso disponer previamente de construcciones génicas y vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos  
25 de la invención. Por ello, la invención también se relaciona con una construcción génica que comprende un ácido nucleico de la invención, así como con un vector recombinante que comprende dicha construcción génica o dicho ácido nucleico de la invención, y con un sistema de expresión que comprende un ácido nucleico de la invención, una construcción génica o un vector recombinante proporcionados por esta invención.

30 En otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica, en adelante construcción génica de la invención, que comprende un ácido nucleico de la invención operativamente unido a una secuencia de control de la expresión que controla la expresión de dicho ácido nucleico. Las secuencias de control de expresión son secuencias nucleotídicas

que controlan y regulan la transcripción, y en su caso, la traducción del producto de interés. Prácticamente cualquier secuencia de control de expresión puede estar presente en la construcción génica de la invención. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas secuencias de control incluyen secuencias promotoras (e.g., *pT7*, *plac*, *pBAD*, *ptet*, etc.),  
5 secuencias codificantes para reguladores transcripcionales (e.g., *lacI*, *tetR*, *araC*, etc.),  
secuencias de unión a ribosomas (RBS), y/o secuencias terminadoras de transcripción (*tlf2*, etc.). La construcción génica de la invención puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia descritos, por ejemplo, por Sambrook et al. [Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, 1989].

10 El ácido nucleico de la invención, o la construcción génica que lo contiene, puede ser insertado en un vector apropiado. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector recombinante, en adelante vector recombinante de la invención, que comprende un ácido nucleico de la invención o una construcción génica de la invención que comprende dicho ácido nucleico de la invención.

15 En una realización particular, el vector recombinante de la invención es un vector de expresión. En este caso, el ácido nucleico de la invención se encuentra conectado operativamente a una secuencia reguladora de la expresión que, en general, comprende un promotor y una secuencia terminadora de la transcripción y/o de la traducción. Tal como se ha mencionado más arriba, prácticamente cualquier secuencia reguladora de la expresión del  
20 ácido nucleico de la invención (incluyendo promotores y secuencias terminadoras apropiadas) puede ser utilizada para la puesta en práctica de esta invención.

El vector recombinante de la invención puede ser un vector viral o un vector no viral. La elección del vector dependerá del sistema de expresión en el que se va a introducir posteriormente.

25 Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de vectores virales que pueden incluir el ácido nucleico de la invención incluyen, por ejemplo, todos los que permiten hacer “phage display” [Rhyner et al. “Cloning allergens via phage display”. *Methods*. 2004, 32(3):212-218.]. Otros ejemplos de vectores virales incluyen vectores basados en el virus del mosaico del tabaco (TMV) y en el virus X de patata (PVX) [Wagner et al. “Plant virus expression  
30 systems for transient production of recombinant allergens in *Nicotiana benthamiana*”, *Methods*. 2004, 32(3):227-234]. Asimismo, quedan incluidos entre los vectores virales los vectores apropiados para la expresión en sistemas eucariotas, por ejemplo, los vectores adenovirales, etc., y los vectores de expresión basados en baculovirus.

Entre los vectores no virales se pueden citar los vectores bacterianos, de los que existen numerosos ejemplos, incluyendo cualquier plásmido (de expresión o no) descrito para bacterias (*E. coli*, *Bacillus sp.*, etc.) o sus modificaciones, etc. Ejemplos adicionales de vectores no virales incluyen plásmidos para levaduras (*Pichia sp.*, *Saccharomyces sp.*, etc.),  
5 vectores para expresión en plantas, vectores para expresión en animales, por ejemplo, en mamíferos, tales como ratones, ratas, vacas, ovejas, cabras, etc.

En una realización particular, dichos vectores pueden derivar de vectores de expresión comerciales comercializados por Promega (e.g., plásmidos PinPoint Xa, etc.), Invitrogen (e.g., plásmidos del sistema Gateway, etc.), Amersham (e.g., plásmidos pGEX, etc.),  
10 Ingenius (e.g., pINK vector, etc.), Sigma (e.g., BICEP vectors, etc.), etc.

El vector recombinante proporcionado por esta invención puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia descritos, por ejemplo, por Sambrook et al. [Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, 1989].

En otro aspecto, la invención se relaciona con un sistema de expresión, en adelante sistema de expresión de la invención, que comprende un ácido nucleico de la invención, o una construcción génica de la invención, o bien un vector recombinante de la invención. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de sistemas de expresión de la invención incluyen tanto sistemas procarióticos como eucarióticos, tales como bacterias, levaduras, cultivos de células de animales (e.g., mamíferos, insectos, etc.), cultivos de células vegetales, animales  
15 transgénicos, plantas transgénicas, etc. tanto comerciales como no comerciales [Fernandez & Hoeffler JP: "Gene expression systems" Academic Press. ISBN:0-12-253840-4-1999; 480 pp].

En una realización particular, el sistema de expresión de la invención es un sistema recombinante de expresión. Existen sistemas completos de expresión de productos recombinantes que comprende un vector o un juego de vectores con distintas pautas de  
25 lectura junto con un sistema cromatográfico de purificación del producto recombinante, un sistema de eliminación del "tag", un sistema de detección y unos accesorios, tales como células para transformar, oligos específicos para secuenciar, etc., que pueden ser comerciales o no comerciales. Entre los sistemas comerciales se pueden citar los comercializados por  
30 Promega (e.g., sistema PinPoint, etc.), Invitrogen (e.g., sistema Gateway, etc.), QIAGEN (e.g., sistema QIAexpress, etc.), Amersham (e.g., plásmidos pGEX, etc.), Ingenius (e.g., pINK system, etc.), Sigma (e.g., FLAG, etc.), etc. Información sobre sistemas no comerciales puede encontrarse en la revista "Protein Expression and Purification".



En otra realización particular, el sistema de expresión de la invención es un sistema de expresión *in vitro* de mRNAs, es decir, sistemas de traducción *in vitro* tanto en sistemas procariotas como eucariotas. Aunque, en general, se tiende a usar sistemas eucariotas para traducir proteínas eucariotas, no se descarta el uso de sistemas procariotas. Existen sistemas de expresión *in vitro* de mRNAs comerciales y no comerciales. Entre los sistemas comerciales se pueden citar los sistemas comercializados por Promega (e.g., sistemas basados en extractos de germen de trigo con o sin sistemas acoplados de transcripción o lisados de reticulocitos de conejo, igualmente acoplados o no a sistemas de transcripción – TNT systems en el caso de Promega-). A esos sistemas habría que unirle la posibilidad de realizar modificaciones post-traduccionales, tales como glicosidación (Ole e 1 es una proteína glicosilada), mediante el empleo de sistemas convencionales, por ejemplo, mediante la utilización de sistemas de membranas microsomales pancreáticas caninas, etc.

En una realización concreta, el sistema de expresión de la invención es una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico de la invención o una construcción génica de la invención o un vector recombinante de la invención. La introducción en dicha célula hospedadora de dicho ácido nucleico, construcción génica o vector recombinante de la invención puede llevarse a cabo por cualquier medio apropiado, conocido por los expertos en la materia, de transferencia de material genético.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas células hospedadoras incluyen tanto células procariotas como eucariotas, tales como bacterias y levaduras, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus sp.*, por ejemplo, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. megaterium*, etc.), *Caulobacter sp.*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pombe*, etc., líneas celulares de animales, tales como líneas celulares de mamíferos, por ejemplo, líneas celulares epiteliales (porcinas, etc.), líneas celulares de osteosarcoma (humanas, etc.), líneas celulares de neuroblastoma (humanas, etc.), carcinomas epiteliales (humanos, etc.), células gliales (murinas, etc.), líneas celulares hepáticas (de mono, etc.), líneas celulares de insectos, por ejemplo, las líneas celulares S2 y S3 de *Drosophila melanogaster*, *D. immigrans*, *D. hydei*, *D. virilis*, etc., células de animales transgénicos (e.g., ratón, cabra, cerdo, oveja, vaca, etc.), células vegetales, células de plantas transgénicas (e.g., tabaco, *A. thaliana*, algodón, *Brassica*, patata, arroz, etc.), etc.

El sistema de expresión de la invención puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia descritos, por ejemplo, por Sambrook et al. [Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, 1989].

## **B. Péptidos, variantes y procedimientos para su obtención**

En otro aspecto, la invención se relaciona con un péptido, en adelante péptido de la invención, que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo (*Olea europea*), en donde dicho péptido tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a la expresión de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de la invención. Dicho término “péptido de la invención” también incluye variantes de los mismos, es decir, péptidos con actividad alérgica que comprenden, al menos, un epítipo alérgico del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo pero que presentan una afinidad de unión a IgE igual, superior, inferior o nula respecto al alérgeno Ole e 1 natural específico de la variedad definida de olivo en cuestión. Dichas variantes se definirán más adelante.

El péptido de la invención es un péptido con actividad alérgica que comprende, al menos, un epítipo alérgico del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo. Adicionalmente, el péptido de la invención puede contener una región responsable de la unión a células T o una región responsable de la unión a IgE o una región responsable de la modulación de la unión a la IgE, tal como se ha mencionado previamente.

En una realización particular, dicha variedad definida de olivo se selecciona entre las variedades denominadas Picholine, Menara, Lucio, Picual, Loaime, Hojiblanca, Arbequina y Bella de España.

En otra realización particular, el péptido de la invención comprende, o está constituido por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 y un fragmento de las mismas. Dichas secuencias aminoacídicas corresponden a las secuencias de aminoácidos del alérgeno Ole e 1 de las variedades Picholine (SEQ ID NO: 27-29), Menara (SEQ ID NO: 30-32), Lucio (SEQ ID NO: 33-35), Picual (SEQ ID NO: 36-38), Loaime (SEQ ID NO: 39-41), Hojiblanca (SEQ ID NO: 42-44), Arbequina (SEQ ID NO: 45-47) y Bella de España (SEQ ID NO: 48-50), clones 1, 2 y 3 en todos los casos.

El fragmento peptídico al que se ha hecho referencia previamente tiene actividad alérgica y comprende, al menos, un epítipo alérgico del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo. Adicionalmente, dicho fragmento peptídico puede contener una región responsable de la unión a células T o una región responsable de la unión a IgE o una región responsable de la modulación de la unión a la IgE, tal como se ha mencionado previamente.

Los péptidos de la invención pueden obtenerse por métodos convencionales, preferentemente, por métodos recombinantes, salvo en el caso de fragmentos peptídicos de corta longitud, en cuyo caso, dichos fragmentos pueden obtenerse por síntesis química.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de un péptido de la invención que comprende la expresión de la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico de la invención, contenido en un sistema de expresión de la invención, bajo condiciones que permiten la expresión de dicha secuencia de nucleótidos y la producción de dicho péptido de la invención, y, si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar dicho péptido de la invención.

En una realización particular, dicho péptido de la invención comprende, o está constituido por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 y un fragmento de las mismas. Dichos péptidos constituyen el producto de expresión de SEQ ID NO: 1-24, respectivamente, o de un fragmento de las mismas.

En otra realización particular, el péptido de la invención es una variante de un péptido de la invención. Dicha variante tiene actividad alérgica y comprende, al menos, un epítipo alérgico del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo, al igual que los péptidos de la invención, pero presentan una afinidad de unión a IgE igual, superior, inferior o nula respecto al alérgeno Ole e 1 natural específico de la variedad definida de olivo en cuestión.

En una realización concreta, dicha variante comprende, respecto a la secuencia aminoacídica del péptido natural, una modificación que afecta a:

- (i) al menos, una de las regiones de inmunogenicidad elevada del alérgeno Ole e 1; dichas regiones de inmunogenicidad elevada pueden ser establecidas en base a predicciones realizadas por los programas del tipo de Epiplot [Menéndez-Arias & Rodríguez R. 1990. "A BASIC microcomputer program for prediction of B and T cell epitopes in proteins". *Comput. Appl. Biosci.* 6(2):101-5] o PeptideSelect Design Tool [Invitrogen: <https://peptideselect.invitrogen.com/peptide/>] las cuales han puesto de manifiesto la existencia cuatro regiones de inmunogenicidad elevada en el alérgeno Ole e 1; en los péptidos de la invención que comprenden, o están constituidos por, cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, se ha observado la existencia de 4 picos de antigenicidad teórica (identificados como picos A1, A2, A3 y A4 en la Tabla 1); o a
- (ii) al menos, una de las regiones definidas como epítosos inmunodominantes de Ole e 1 responsables de la unión a células T [Cárdaba et al. "Olive pollen allergy: searching for immunodominant T-cell epitopes on the Ole e 1 molecule". *Clin. Exper. Allergy* 28:413-422. 1998]; estas regiones corresponden a las posiciones 91-102, 109-120 y 119-130 de la secuencia aminoacídica de Ole e 1 definida por Villalba et al. [Villalba M, Batanero E, López-Otín et al. "The amino acid sequence of Ole e 1, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen". *Eur. J. Biochem.* 216:863-869 (1993)] (véase la Figura 1); en los péptidos de la invención que comprenden, o están constituidos por, cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, se ha observado la existencia de 3 epítosos inmunodominantes de unión a células T (identificados como epítosos a, b y c en la Tabla 2); o a
- (iii) al menos, una secuencia que afecta a la integridad de los puentes disulfuro presentes en el péptido de la invención, es decir, una modificación que afecta a, al menos, una región codificante de una cisteína implicada en la formación de un puente disulfuro presente en los péptidos de la invención, ya que, como es conocido, la capacidad de unión de IgEs humanos a Ole e 1 es fuertemente dependiente de la integridad de dichos puentes disulfuro [González et al. "Influence of the 3D-conformation, glycan component and microheterogeneity on the epitope structure of Ole e 1, the major olive allergen. Use of recombinant isoforms and specific monoclonal antibodies as immunological tools". *Mol Immunol.* 2002; 39(1-2):93-101]; las regiones codificantes de cisteína implicadas

en la formación de puentes disulfuro presentes en los péptidos de la invención que comprenden, o están constituidos por, cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, se recogen en la Tabla 3; o a

- (iv) la adición o eliminación de lugares o secuencias de glicosilación potencial, ya que se ha demostrado que el componente glicosídico de Ole e 1 es reconocido por diversos anticuerpos monoclonales, así como por IgGs e IgEs humanos, modulando, por tanto, su carácter alergénico [Batanero et al. "Glycosylation site of the major allergen from olive tree. Allergenic implications of the carbohydrate moiety". *Mol. Immunol.* 1994; 31: 31-37; Batanero et al. "IgE binding and histamine-release capabilities of the main carbohydrate component isolated from the major allergen of olive tree pollen". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999; 103:147-153; González et al. "Influence of the 3D-conformation, glycan component and microheterogeneity on the epitope structure of Ole e 1, the major olive allergen. Use of recombinant isoforms and specific monoclonal antibodies as immunological tools". *Mol Immunol.* 2002; 39(1-2):93-101]; las regiones implicadas en la N-glicosilación potencial presentes en los péptidos de la invención que comprenden, o están constituidos por, cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, se recogen en la Tabla 4; asimismo, entre dichos péptidos, los correspondientes a la variedad Bella de España (SEQ ID NO: 48-50) poseen en su posición 37/38 una secuencia extra de glicosilación. Los extractos crudos de polen de esta variedad presentan una banda adicional, de aproximadamente 19,2 kDa correspondiente a una forma de Ole e 1, que es reconocida por Concanavalina A.

A modo ilustrativo, no limitativo, en una realización particular:

- 25 - las regiones de inmunogenicidad elevada se seleccionan entre VRLQCK, LVERDH, LIERDH, WAKPSL, WVKPSL y KKEALP;
- las regiones definidas como epítomos inmunodominantes de Ole e 1 responsables de la unión a células T se seleccionan entre NEIPTEGWAKPS, DEIPTEGWAKPS, DEIPTEGWVKPS, TVNGTTRTVNPL, TVNGTTRTINPL y PLGFFKKEALPK;
- 30 - la modificación que afecta a dicha secuencia que afecta a la integridad de los puentes disulfuro es una modificación que afecta a una región codificante de

una cisteína implicada en la formación de un puente disulfuro presente en dicho péptido; y

- las secuencias de N-glicosilación potencial se seleccionan entre NGT y NVT.

Las variantes de los péptidos de la invención pueden obtenerse mediante métodos  
5 convencionales, por ejemplo, mediante mutagénesis, e.g., mutación puntual, inserción o  
delección de secuencias o truncamiento de un péptido de la invención. Por tanto, la invención  
también se relaciona con un método para producir una variante de un péptido de la invención  
que comprende alterar la secuencia de dicho péptido de la invención, por ejemplo, mediante  
adición, sustitución o delección de uno o más residuos de cualquiera de las regiones  
10 previamente mencionadas [e.g., regiones de inmunogenicidad elevada del alérgeno Ole e 1,  
regiones definidas como epítomos inmunodominantes de Ole e 1 responsables de la unión a  
células T, regiones que afectan a la integridad de los puentes disulfuro presentes en el  
péptido de la invención, modificación de los lugares o secuencias de glicosilación potencial,  
etc.] y ensayar el péptido alterado (variante) para analizar su actividad.

15 Aunque resulta difícil conocer de antemano si una modificación determinada en un  
péptido de la invención va a dar lugar a una variante del mismo con una afinidad de unión a  
IgE mayor o menor que la del péptido de la invención natural, o si dicha modificación  
anularía la unión a IgE (debido a que se desconocen los lugares exactos de unión a IgGs e  
IgEs), se puede realizar una aproximación teórica consistente en determinar los perfiles de  
20 antigenicidad de los péptidos de la invención. Esta aproximación ha sido realizada por los  
inventores en relación con los péptidos de la invención que comprenden, o están constituidos  
por, cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50 observándose que, en todos ellos, aparecen 4 picos  
de antigenicidad teórica (Tabla 1) que supondrían sitios probables de unión a anticuerpos  
(aunque no es determinable si serían IgGs o IgEs). Asimismo, se ha observado que dichos  
25 péptidos (SEQ ID NO: 27-50) presentan polimorfismos en dos de esas regiones de  
antigenicidad (picos A2 y A3). Se ha descrito el mapeo epitópico de la proteína Ole e 1 de  
polen de olivo con anticuerpos monoclonales [Martín-Orozco et al. "Ole e I: epitope  
mapping, cross-reactivity with other Oleaceae pollens and ultrastructural localization". *Int.*  
*Arch. Allergy Immunol.* 1994; 104:160-170; y González et al. "Influence of the 3D-  
30 conformation, glycan component and microheterogeneity on the epitope structure of Ole e 1,  
the major olive allergen. Use of recombinant isoforms and specific monoclonal antibodies as  
immunological tools". *Mol Immunol.* 2002; 39(1-2):93-101]. Dichos trabajos muestran que

hay entre 4 y 7 epítomos IgG, dos de ellos continuos y demuestran que podría haber una coincidencia parcial entre algunos de esos epítomos IgG con epítomos IgE, pero, sin embargo, todavía no se han determinado exactamente las secuencias de esos epítomos.

Estudios realizados por los inventores han permitido establecer las regiones que representan picos de alergenicidad predictiva elevada, las regiones que definen epítomos inmunodominantes de unión a células T, regiones codificantes de cisteínas implicadas en la formación de puentes disulfuro, y regiones implicadas en la N-glicosilación potencial. Los resultados se muestran en las Tablas 1-4, respectivamente.

10

Tabla 1

**Regiones que representan picos de alergenicidad predictiva elevada**

SEQ ID NO:	Pico A1	Pico A2*	Pico A3*	Pico A4
27	VRLQCK (26-31)	LVERDH (55-60)	WAKPSL (85-90)	KKEALP (111-116)
28	VRLQCK (26-31)	LVERDH (55-60)	WAKPSL (85-90)	KKEALP (111-116)
29	VRLQCK (26-31)	LVERDH (55-60)	WAKPSL (85-90)	KKEALP (111-116)
30	VRLQCK (26-31)	LVERDH (55-60)	WAKPSL (85-90)	KKEALP (111-116)
31	VRLQCK (26-31)	LVERDH (55-60)	WAKPSL (85-90)	KKEALP (111-116)
32	VRLQCK (26-31)	LVERDH (55-60)	WAKPSL (85-90)	KKEALP (111-116)
33	VRLQCK (26-31)	LVERDH (55-60)	WAKPSL (85-90)	KKEALP (111-116)
34	VRLQCK (26-31)	LVERDH (55-60)	WAKPSL (85-90)	KKEALP (111-116)
35	VRLQCK (26-31)	LVERDH (55-60)	WAKPSL (85-90)	KKEALP (111-116)
36	VRLQCK (25-30)	LVERDH (54-59)	WAKPSL (84-89)	KKEALP (110-115)
37	VRLQCK (26-31)	LVERDH (55-60)	WAKPSL (85-90)	KKEALP (111-116)
38	VRLQCK (26-31)	LVERDH (55-60)	WAKPSL (85-90)	KKEALP (111-116)
39	VRLQCK (26-31)	LVERDH (54-59)	WAKPSL (84-89)	KKEALP (111-116)
40	VRLQCK (26-31)	LVERDH (55-60)	WAKPSL (85-90)	KKEALP (111-116)
41	VRLQCK (26-31)	LVERDH (55-60)	WAKPSL (85-90)	KKEALP (111-116)
42	VRLQCK (23-28)	LVERDH (52-57)	WVKPSL (82-87)	KKEALP (108-113)
43	VRLQCK (23-28)	LVERDH (52-57)	WVKPSL (82-87)	KKEALP (108-113)
44	VRLQCK (23-28)	LVERDH (52-57)	WVKPSL (82-87)	KKEALP (108-113)
45	VRLQCK (25-30)	LVERDH (54-59)	WVKPSL (84-89)	KKEALP (110-115)
46	VRLQCK (25-30)	LVERDH (54-59)	WVKPSL (84-89)	KKEALP (110-115)
47	VRLQCK (25-30)	LVERDH (54-59)	WVKPSL (84-89)	KKEALP (110-115)
48	VRLQCK (26-31)	LIERDH (55-60)	WVKPSL (85-90)	KKEALP (111-116)
49	VRLQCK (26-31)	LIERDH (55-60)	WVKPSL (85-90)	KKEALP (111-116)
50	VRLQCK (25-30)	LIERDH (54-59)	WVKPSL (84-89)	KKEALP (110-115)

\* Las modificaciones observadas en estas secuencias afectan solamente a los picos A2 y A3.

**Tabla 2**  
**Regiones que definen epítomos inmunodominantes de unión a células T**

SEQ ID NO:	Epítomo a	Epítomo b	Epítomo c
27	NEIPTEGWAKPS (78-89)	TVNGTTRTVNPL (96-107)	PLGFFKKEALPK (106-117)
28	NEIPTEGWAKPS (78-89)	TVNGTTRTVNPL (96-107)	PLGFFKKEALPK (106-117)
29	NEIPTEGWAKPS (78-89)	TVNGTTRTVNPL (96-107)	PLGFFKKEALPK (106-117)
30	NEIPTEGWAKPS (78-89)	TVNGTTRTVNPL (96-107)	PLGFFKKEALPK (106-117)
31	NEIPTEGWAKPS (78-89)	TVNGTTRTVNPL (96-107)	PLGFFKKEALPK (106-117)
32	NEIPTEGWAKPS (78-89)	TVNGTTRTVNPL (96-107)	PLGFFKKEALPK (106-117)
33	NEIPTEGWAKPS (78-89)	TVNGTTRTVNPL (96-107)	PLGFFKKEALPK (106-117)
34	NEIPTEGWAKPS (78-89)	TVNGTTRTVNPL (96-107)	PLGFFKKEALPK (106-117)
35	NEIPTEGWAKPS (78-89)	TVNGTTRTVNPL (96-107)	PLGFFKKEALPK (106-117)
36	NEIPTEGWAKPS (78-89)	TVNGTTRTVNPL (96-107)	PLGFFKKEALPK (106-117)
37	DEIPTEGWAKPS (77-88)	TVNGTTRTVNPL (95-106)	PLGFFKKEALPK (105-116)
38	DEIPTEGWAKPS (78-89)	TVNGTTRTVNPL (96-107)	PLGFFKKEALPK (106-117)
39	DEIPTEGWAKPS (78-89)	TVNGTTRTVNPL (96-107)	PLGFFKKEALPK (106-117)
40	DEIPTEGWAKPS (78-89)	TVNGTTRTVNPL (96-107)	PLGFFKKEALPK (106-117)
41	DEIPTEGWAKPS (78-89)	TVNGTTRTVNPL (96-107)	PLGFFKKEALPK (106-117)
42	DEIPTEGWAKPS (78-89)	TVNGTTRTVNPL (96-107)	PLGFFKKEALPK (106-117)
43	DEIPTEGWVKPS (75-86)	TVNGTTRTINPL (93-104)	PLGFFKKEALPK (103-114)
44	DEIPTEGWVKPS (75-86)	TVNGTTRTINPL (93-104)	PLGFFKKEALPK (103-114)
45	DEIPTEGWVKPS (75-86)	TVNGTTRTINPL (93-104)	PLGFFKKEALPK (103-114)
46	DEIPTEGWVKPS (77-88)	TVNGTTRTVNPL (95-106)	PLGFFKKEALPK (105-116)
47	DEIPTEGWVKPS (77-88)	TVNGTTRTVNPL (95-106)	PLGFFKKEALPK (105-116)
48	DEIPTEGWVKPS (77-88)	TVNGTTRTVNPL (95-106)	PLGFFKKEALPK (105-116)
49	DEIPVEGWVKPS (78-89)	TVNGTTRTINPL (96-107)	PLGFFKKEALPK (106-117)
50	DEIPVEGWVKPS (78-89)	TVNGTTRTINPL (96-107)	PLGFFKKEALPK (106-117)
	DEIPVEGWVKPS (77-88)	TVNGTTRTINPL (95-106)	PLGFFKKEALPK (105-116)

5

NOTA: Dos de las regiones de reconocimiento por la célula T (a, c) coinciden en posición con dos de los cuatro picos relevantes en el perfil de antigenicidad (A3, A4).



Tabla 3

## Regiones codificantes de Cys implicadas en puentes disulfuro

SEQ ID NO:	Cisteínas
27	6, 9, 30, 65, 77, 118
28	6, 9, 30, 65, 77, 118
29	6, 9, 30, 65, 77, 118
30	6, 9, 30, 65, 77, 118
31	6, 9, 30, 65, 77, 118
32	6, 9, 30, 65, 77, 118
33	6, 9, 30, 65, 77, 118
34	6, 9, 30, 65, 77, 118
35	6, 9, 30, 65, 77, 118
36	5, 8, 29, 64, 76, 117
37	6, 9, 30, 65, 77, 118
38	6, 9, 30, 65, 77, 118
39	6, 9, 30, 65, 77, 118
40	6, 9, 30, 65, 77, 118
41	6, 9, 30, 65, 77, 118
42	3, 6, 27, 62, 74, 115
43	3, 6, 27, 62, 74, 115
44	3, 6, 27, 62, 74, 115
45	8, 29, 64, 76, 117
46	5, 8, 29, 64, 76, 117
47	8, 29, 64, 76, 117
48	9, 30, 65, 77, 118
49	9, 30, 65, 77, 118
50	8, 29, 64, 76, 117

5

Tabla 4

## Regiones implicadas en N-glicosilación potencial

SEQ ID NO:	N-glicosilación
27	NGT (98-100)
28	NGT (98-100)
29	NGT (98-100)
30	NGT (98-100)
31	NGT (98-100)
32	NGT (98-100)
33	NGT (98-100)
34	NGT (98-100)
35	NGT (98-100)
36	NGT (97-99)
37	NGT (98-100)
38	NGT (98-100)
39	NGT (98-100)
40	NGT (98-100)
41	NGT (98-100)
42	NGT (95-97)
43	NGT (95-97)
44	NGT (95-97)
45	NGT (97-99)
46	NGT (97-99)
47	NGT (97-99)
48	NVT (37-39); NGT (98-100)*
49	NVT (37-39); NGT (98-100)*
50	NVT (36-38); NGT (97-99)*

\*: Existen dos motivos de glicosilación en las isoformas correspondientes al cultivar Bella de España en lugar de uno.

Entre las variantes de los péptidos de la invención se encuentran variantes hipoalérgicas o hiperalérgicas. Las variantes hipoalérgicas tienen disminuida (o anulada) su unión a IgE (es decir, son unos alérgenos mutantes con capacidad reducida de producir efectos adversos) y, por ello, son particularmente útiles en el tratamiento de la alergia al polen de olivo. De hecho, la aplicación fundamental de dichas variantes hipoalérgicas consiste en el aumento de la seguridad clínica tanto en el diagnóstico de la alergia como en los tratamientos de desensibilización (vacunación), disminuyendo o eliminando totalmente la aparición de fenómenos de anafilaxia. Con la utilización de dichas variantes hipoalérgicas se pueden utilizar dosis mucho mayores del alérgeno en los tratamientos de desensibilización, con lo que se aumenta la eficacia de dichos tratamientos, y se puede reducir también el tiempo de administración de dichos tratamientos, que son usualmente muy largos (varios años). Otras ventajas añadidas son las siguientes: a) contribuyen a la personalización de las vacunas, adecuándose al perfil de sensibilidad individualizado de cada paciente, b) evitan la posible sensibilización *de novo* a alérgenos originalmente no reconocidos causada en algunos casos por la propia terapia desensibilizante, y c), son moléculas candidatas a su utilización en vacunación profiláctica frente a alergia [Valenta R: "Recombinant allergen-based concepts for diagnosis and therapy of Type I allergy" *Allergy* 2002; 57: Suppl. 71: 66-67; Vrtala et al. Strategies for converting allergens into hypoallergenic vaccine candidates. *Methods*. 2004 Mar; 32(3):313-20]. Las formas hiperalérgicas se utilizarían casi exclusivamente en investigación básica de la alergia y sus mecanismos, no en terapia.

### C. Anticuerpos

En otro aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo, en adelante anticuerpo de la invención, capaz de unirse a un péptido de la invención, es decir, a un péptido que comprende, al menos, un epítopo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo (*Olea europea*). En una realización particular, dicho anticuerpo de la invención es un anticuerpo capaz de unirse a un péptido cuya secuencia aminoacídica comprende, o está constituida por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítopo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

El término "anticuerpo" tal como aquí se utiliza se refiere a una inmunoglobulina (Ig) o a un fragmento inmunológicamente activo de la misma, es decir, a un fragmento que comprende la región de unión al antígeno. Ejemplos ilustrativos de fragmentos inmunológicamente activos de Ig incluyen fragmentos scFv y dcFv, fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> que pueden ser obtenidos tratando el anticuerpo con una enzima tal como papaína o pepsina, respectivamente.

El anticuerpo puede ser monoclonal, policlonal, recombinante, e.g., quimérico o humanizado, totalmente humano, no humano, por ejemplo, murino, o un fragmento Fv de anticuerpo de cadena única (scFv). El anticuerpo puede acoplarse a un marcador.

Un péptido de la invención, o un fragmento antigénico del mismo, puede ser utilizado como antígeno para generar anticuerpos. En general, dicho péptido antigénico debe incluir, al menos, 8 restos de aminoácidos e incluir un epítipo de dicho péptido de la invención. Preferentemente, dicho péptido antigénico incluye contiene debe incluir, al menos, 10 restos de aminoácidos, más preferentemente, al menos, 15 restos de aminoácidos, aún más preferentemente, al menos, 20 restos de aminoácidos, y todavía más preferentemente, al menos, 30 restos de aminoácidos.

El anticuerpo de la invención reacciona con, o es específico o selectivo para, cualquiera de las regiones o dominios de los péptidos de la invención. En una realización particular, dicho anticuerpo se une a un epítipo presente en un dominio o en una región de un péptido de la invención.

Adicionalmente, los anticuerpos quiméricos, humanizados y completamente humanos caen dentro del ámbito de la presente invención. Los anticuerpos quiméricos, humanizados y, más preferentemente, completamente humanos, son particularmente deseables con fines terapéuticos y de diagnóstico, en humanos.

Los anticuerpos quiméricos y humanizados monoclonales, incluyendo fragmentos humanos y no humanos, pueden obtenerse por métodos convencionales basados en técnicas de ADN recombinante, por ejemplo, utilizando los métodos descritos en EP 184187, EP 171496, EP 173494, WO 86/01533, US 4.816.567, EP 125023, Better et al. (1988) Science 240:1041-1043; Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al. (1987) Canc. Res. 47:999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314:446-449; Shaw et al. (1988) J. Natl.Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison (1985) Science 229: 1202-1207; Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214; US 5.225.539; Jones et al. (1986) Nature

321:552-525; Verhoeyan et al. (1988) *Science* 239:1534; y Beidler et al. (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente útiles para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos así como para aplicaciones de diagnóstico.

5 Dichos anticuerpos puede obtenerse fácilmente utilizando ratones transgénicos incapaces de expresar los genes de las cadenas ligera y pesada de Igs endógenas pero capaces de expresar los genes de las cadenas ligera y pesada de Igs humanas (véase, por ejemplo, Lonberg & Huszar (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.569.825; US 5.661.016; y US 5.545.806.

10 El anticuerpo de la invención puede ser un fragmento de anticuerpo de cadena única (scFv) tal como describen, por ejemplo, Colcher et al. (1999) *Ann. NY Acad. Sci.* 880:263-80; y Reiter (1996) *Clin. Cancer Res.* 2:245-52. Dicho scFv puede ser oligomerizado (di- o multimerizado) para generar anticuerpos multivalentes con distintas especificidades para distintos epítomos del mismo péptido de la invención diana.

15 Los anticuerpos de la invención (e.g., anticuerpos monoclonales) pueden ser utilizados con fines terapéuticos o para realizar métodos inversos de análisis, por ejemplo, inmovilizando los anticuerpos sobre un soporte sólido y ensayando su unión a péptidos. La detección de los complejos formados puede facilitarse mediante el acoplamiento al anticuerpo de una sustancia detectable o marcador, por ejemplo, enzimas, grupos prostéticos,  
20 materiales fluorescentes, luminiscentes, bioluminiscentes, radiactivos, etc. (WO 03/003977).

#### **D. Soporte**

En otro aspecto, la invención se relaciona con un soporte sólido, en adelante soporte sólido de la invención, que comprende:

- 25 a) una pluralidad de ácidos nucleicos, en donde cada uno de dichos ácidos nucleicos está separado del resto de ácidos nucleicos y su secuencia nucleotídica codifica, al menos, un epítomo de un alérgeno de polen de olivo específico de una variedad definida de olivo; o bien
- 30 b) una pluralidad de péptidos, en donde cada uno de dichos péptidos está separado del resto de péptidos y comprende, al menos, un epítomo de un alérgeno de polen de olivo específico de una variedad definida de olivo; o bien
- c) una pluralidad de anticuerpos, en donde cada uno de dichos anticuerpos está separado del resto de anticuerpos y es capaz de unirse a un péptido que

comprende, al menos, un epítopo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo (*Olea europea*).

El término “pluralidad” tal como aquí se utiliza se refiere a, al menos, 2 ácidos nucleicos, péptidos o anticuerpos. El número de ácidos nucleicos, péptidos o anticuerpos que pueden estar presentes en el soporte sólido de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo. A modo ilustrativo, el soporte sólido de la invención puede contener, al menos, 10 ácidos nucleicos, péptidos o anticuerpos, generalmente, al menos, 100 ácidos nucleicos, péptidos o anticuerpos, típicamente, al menos, 1.000 ácidos nucleicos, péptidos o anticuerpos, ventajosamente, al menos, 10.000 ácidos nucleicos, péptidos o anticuerpos.

En una realización particular, dicha pluralidad de ácidos nucleicos contenida en el soporte sólido de la invención comprende, al menos, un ácido nucleico de la invención, por ejemplo, al menos, un ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos comprende, o está constituida por, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-24, o un fragmento de las mismas que codifica un péptido que comprende, al menos, un epítopo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

En otra realización particular, dicha pluralidad de péptidos contenida en el soporte sólido de la invención comprende, al menos, un péptido de la invención, por ejemplo, al menos, un péptido cuya secuencia aminoacídica comprende, o está constituida por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítopo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

En otra realización particular, dicha pluralidad de anticuerpos contenida en el soporte sólido de la invención comprende, al menos, un anticuerpo de la invención, por ejemplo, al menos, un anticuerpo capaz de unirse a un péptido cuya secuencia aminoacídica comprende, o está constituida por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítopo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo. En una realización particular, dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un fragmento inmunológicamente activo del mismo, por ejemplo, un fragmento scFv o un dímero o multímero del mismo. Mediante el empleo de anticuerpos es posible el desarrollo de métodos inversos de análisis en soportes sólidos, es decir, de inmovilización de los anticuerpos (e.g., anticuerpos monoclonales) a los soportes sólidos, que luego son testados utilizando los péptidos [Ko IK, Kato K, Iwata H. Antibody

microarray for correlating cell phenotype with surface marker. *Biomaterials*. 2005 Feb;26(6):687-96].

Los ácidos nucleicos, los péptidos y los anticuerpos pueden estar dispuestos sobre el soporte sólido en una disposición orientada (conocida) o no orientada. Tal como aquí se utiliza, el término “disposición orientada” significa que el ácido nucleico, el péptido o el anticuerpo está inmovilizado sobre el soporte sólido en una localización definida (posición conocida). Por tanto, en una realización particular, el soporte sólido de la invención comprende dos o más ácidos nucleicos o, alternativamente, dos o más péptidos, o bien dos o más anticuerpos, inmovilizados sobre dicho soporte sólido en una disposición no orientada. Alternativamente, en otra realización particular, el soporte sólido de la invención comprende dos o más ácidos nucleicos o bien dos o más péptidos o bien dos o más anticuerpos inmovilizados sobre dicho soporte sólido en una disposición orientada. Ventajosamente, los ácidos nucleicos, péptidos o anticuerpos están inmovilizados sobre el soporte sólido en una disposición orientada, constituyendo un “array”. Dicho array puede realizarse sobre un chip o biochip [(bio)chip].

Los (bio)chips o arrays de ácidos nucleicos, péptidos o anticuerpos implican la disposición en zonas puntuales de un soporte sólido de una pluralidad de ácidos nucleicos, péptidos o anticuerpos. Puesto que la deposición de dichos ácidos nucleicos, péptidos o anticuerpos se realiza en puntos microscópicos, se puede aplicar en un solo (bio)chip una cantidad muy elevada de ácidos nucleicos, péptidos o anticuerpos. A modo ilustrativo, no limitativo, en un chip de alta densidad se pueden analizar hasta 10.000 genes distintos por chip (unas 150 micras de diámetro por gota y unas 200 micras de espaciado) [Park CH, Jeong HJ, Jung JJ, Lee GY, Kim SC, Kim TS, Yang SH, Chung HC, Rha SY. Fabrication of high quality cDNA microarray using a small amount of cDNA. *Int J Mol Med*. 2004 May;13(5):675-9], mientras que en el caso de péptidos y anticuerpos el número de sustancias a analizar es, aparentemente, algo menor (e.g., las gotas pueden ser de 180-250 micras) [Deinhofer, K., Sevcik, H., Balic, N., Harwanegg, Ch., Hiller, R., Rumpold, H., Mueller, M.W. and Spitzauer, S.: “Microarrayed allergens for IgE profiling”. *Methods* 32:249.254 (2004)]. Los valores indicados previamente corresponden a unos valores medios, aceptables en general. No obstante, según la compañía Affymetrix se pueden hacer chips de más de 61.000 secuencias por array, con gotas de 11 micras, que solo se pueden leer con sus equipos más sofisticados (<http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/cexpress.affx>).

En general, para analizar un chip de proteínas es suficiente con unos 20 microlitros de suero [Deinhofer, K., Sevcik, H., Balic, N., Harwanegg, Ch., Hiller, R., Rumpold, H., Mueller, M.W. and Spitzauer, S.: "Microarrayed allergens for IgE profiling". *Methods* 32:249.254 (2004)]. Para testar cada chip de genes con RNA humano, se puede usar tan poco  
5 como 5 microgramos de RNA humano de un tejido concreto ya que se pueden utilizar procedimientos de amplificación [Dumur CI, Garrett CT, Archer KJ, Nasim S, Wilkinson DS, Ferreira-Gonzalez A. Evaluation of a linear amplification method for small samples used on high-density oligonucleotide microarray analysis. *Anal Biochem.* 2004 Aug 15;331(2):314-21).

10 El empleo de dicho soporte sólido de la invención permite, por tanto, detectar simultáneamente el alérgeno o alérgenos de polen de olivo, específico(s) de variedad de olivo, frente a los cuales puede estar sensibilizado un sujeto, a partir de una única muestra biológica procedente de dicho sujeto, lo que garantizaría el diagnóstico y facilitaría el tratamiento del sujeto.

15 El soporte sólido de la invención puede ser obtenido por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Prácticamente cualquier método conocido por los expertos en la materia puede ser utilizado para inmovilizar ácidos nucleicos, péptidos y anticuerpos al soporte sólido. A modo ilustrativo, véase, por ejemplo, Deinhofer, K., Sevcik, H., Balic, N., Harwanegg, Ch., Hiller, R., Rumpold, H., Mueller, M.W. and Spitzauer, S.:  
20 "Microarrayed allergens for IgE profiling". *Methods* 32:249.254 (2004); Alcocer MJ, Murtagh GJ, Wilson PB, Progiás P, Lin J, Archer DB. The major human structural IgE epitope of the Brazil nut allergen Ber e 1: a chimaeric and protein microarray approach. *J Mol Biol.* 2004 Oct 22;343(3):759-69; Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R, Bohle B, Ebner C, Scheiner O, Mueller MW. Allergen microarray: comparison of microarray using  
25 recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy.* 2003 Oct;33(10):1443-9; Beyer K. Characterization of allergenic food proteins for improved diagnostic methods. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2003 Jun;3(3):189-97; Fall BI, Eberlein-Konig B, Behrendt H, Niessner R, Ring J, Weller MG. Microarrays for the screening of allergen-specific IgE in  
30 human serum. *Anal Chem.* 2003 Feb 1;75(3):556-62; y Kim TE, Park SW, Cho NY, Choi SY, Yong TS, Nahm BH, Lee S, Noh G. Quantitative measurement of serum allergen-specific IgE on protein chip. *Exp Mol Med.* 2002 May 31;34(2):152-8.

Un método habitualmente utilizado para inmovilizar ácidos nucleicos sobre un soporte sólido consiste en el recubrimiento no covalente del soporte sólido con un miembro de un par de unión específica, por ejemplo, avidina o estreptavidina, y la inmovilización de ácidos nucleicos biotiniladas. Alternativamente, los ácidos nucleicos se pueden unir directamente al soporte sólido mediante reacciones de acoplamiento de tipo epóxido/amina.

El soporte sólido puede ser de naturaleza y composición diversa, por ejemplo, vidrio (portaobjetos), sílice (chips), plástico (diversos tipos) (placas microtiter), nitrocelulosa, PVDF (polivinilideno difluoruro), partículas magnéticas, metálicas, de vidrio, etc. [Kim TE, Park SW, Cho NY, Choi SY, Yong TS, Nahm BH, Lee S, Noh G. Quantitative measurement of serum allergen-specific IgE on protein chip. *Exp Mol Med.* 2002 May 31;34(2):152-8 (membranas de nitrocelulosa); The Major Human Structural IgE Epitope of the Brazil Nut Allergen Ber e 1: A Chimaeric and Protein Microarray Approach Marcos J. C. Alcocer, Gareth J. Murtagh, Philip B. Wilson, Pavlos Progiaris, Jing Lin and David B. Archer. *J. Mol. Biol.* (2004) 343, 759–769 (PVDF y placas microtiter).

En una realización particular, el soporte sólido es una membrana que posee una superficie de carga negativa, tal como una membrana de nylon. En este caso, antes de la unión de las sondas, la membrana se trata con un activador de los grupos carboxilo presentes en la superficie de la membrana, tal como, por ejemplo, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC). En este caso, los ácidos nucleicos se diseñarían de manera que contuvieran, por ejemplo, un grupo amino en el extremo 5' con el fin de orientar espacialmente el ácido nucleico sobre la membrana.

En otra realización particular, el soporte sólido es un portaobjetos de cristal (vidrio), o espejo tal como un portaobjetos, opcionalmente sometido a un tratamiento con poli-L-lisina con el fin de disponer sobre la superficie de cristal grupos amino que se van a unir por interacciones electrostáticas a los grupos fosfato de los ácidos nucleicos, que no quedan orientados espacialmente sobre la superficie del soporte sólido. Además de los grupos amino, existen una serie de tratamientos opcionales que producen un recubrimiento sobre la superficie del cristal con otra serie de grupos químicos reactivos tales como grupos aldehído, epóxido, O<sub>2</sub>, CF<sub>4</sub>, metales, dieléctricos, avidina, estreptavidina, sustratos hidrofóbicos, etc.

Los péptidos y anticuerpos se pueden unir a los soportes sólidos utilizando prácticamente los mismos sistemas de los ácidos nucleicos: en ambos casos se basan fundamentalmente en una reacción de Schiff aldehído/amina (residuos de lisina en las proteínas, aminas primarias de las bases de DNA, o generación sintética de derivados



amínicos de las bases del DNA). Un ejemplo de cómo se unen péptidos alergénicos recombinantes se describe en Deinhofer, K., Sevcik, H., Balic, N., Harwanegg, Ch., Hiller, R., Rumpold, H., Mueller, M.W. and Spitzauer, S.: “Microarrayed allergens for IgE profiling”. *Methods* 32:249.254 (2004). En dicho trabajo se usan portaobjetos de vidrio cuya superficie se hace reactiva a los grupos aminos mediante tratamiento con silano y un polímero reactivo. En el caso de péptidos es muy frecuente la utilización de soportes de vidrio (portaobjetos) recubiertos con silano-epóxido, que constituyen una superficie reactiva frente a los grupos amino de las proteínas. Se están desarrollando nuevos sustratos, ej Cretich M, Pirri G, Damin F, Solinas I, Chiari M. A new polymeric coating for protein microarrays. *Anal Biochem.* 2004 Sep 1;332(1):67-74. Otro ejemplo más: Cha T, Guo A, Jun Y, Pei D, Zhu XY. Immobilization of oriented protein molecules on poly(ethylene glycol)-coated Si(111). *Proteomics.* 2004 Jul;4(7):1965-76. En general los métodos de unión son de 4 tipos: los que se basan en reacciones de tipo covalente (recubrimientos de tipo silano, amina, etc.), los que se basan en fenómenos de difusión (gel de poliacrilamida – hidrogel-, agarosa, etc.), los que se basan en fenómenos de adsorción a superficies (PVDF, nitrocelulosa, poli-L-lisina, etc.) y los que se basan en fenómenos de afinidad: biotina/estreptavidina, His/Ni-NTA, etc.).

La concentración de los ácidos nucleicos, péptidos y anticuerpos en el soporte sólido de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo dependiendo de numerosos factores, entre los que se encuentran la naturaleza y tipo de soporte sólido, la naturaleza del ácido nucleico, el péptido, o el anticuerpo, etc. A modo ilustrativo, no limitativo, se pueden usar concentraciones de proteína (péptido o anticuerpo) de 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, ó 1 mg/ml, o bien de entre 0,01 y 2 ng de proteína por spot [Deinhofer, K., Sevcik, H., Balic, N., Harwanegg, Ch., Hiller, R., Rumpold, H., Mueller, M.W. and Spitzauer, S.: “Microarrayed allergens for IgE profiling”. *Methods* 32:249.254 (2004); The Major Human Structural IgE Epitope of the Brazil Nut Allergen Ber e 1: A Chimaeric and Protein Microarray Approach Marcos J. C. Alcocer, Gareth J. Murtagh, Philip B. Wilson, Pavlos Progiias, Jing Lin and David B. Archer. *J. Mol. Biol.* (2004) 343, 759–769].

### 30 **E. Composición farmacéutica**

Los péptidos y anticuerpos de la invención pueden ser utilizados en la elaboración de una composición farmacéutica útil para prevenir y/o tratar la alergia al polen de olivo. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que

comprende, como sustancia activa, al menos, un péptido de la invención o un anticuerpo de la invención. En general, dicha composición farmacéutica comprende, además, un vehículo, un excipiente, un diluyente, un adyuvante, un retardante y/o un estabilizante, farmacéuticamente aceptables.

5 El término “composición farmacéutica” incluye composiciones para su uso en sanidad humana o animal (composiciones veterinarias).

En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende, al menos, un péptido de la invención. En una realización concreta, la secuencia aminoacídica de dicho péptido de la invención comprende, o está constituida por, una  
10 secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

En otra realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende, al menos, un anticuerpo de la invención. Dicho anticuerpo tendrá que ser  
15 compatible con la especie (humana o animal) a la que se le va a administrar para evitar reacciones indeseables. Por tanto, en una realización concreta, cuando la composición farmacéutica va destinada al tratamiento de un ser humano, dicho anticuerpo de la invención será un anticuerpo quimérico, humanizado o, preferentemente, completamente humano, monoclonal, o un fragmento del mismo, tal como, por ejemplo, un scFv, opcionalmente,  
20 oligomerizado (di- o multimerizado). En una realización específica, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo capaz de unirse a un péptido cuya secuencia aminoacídica comprende, o está constituida por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

25 En otra realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende, además, una sustancia activa adicional. Prácticamente cualquier sustancia potencialmente útil para el tratamiento sintomático de la alergia puede ser incorporada como sustancia activa adicional. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dicha sustancia activa adicional incluyen agentes antihistamínicos, hormonas esteroideas, cromoglicato disódico,  
30 fluticasona, rupatadina, ebastina, loratadina, desloratadina y otros antagonistas de receptores de histamina, leucotrienos, etc., alergoides (alérgenos modificados con glutaraldehído), y sus mezclas.

En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención es una vacuna destinada a inmunoterapia frente a la alergia del polen de olivo. Ventajosamente, el antígeno (alérgeno o inmunógeno) presente en dicha vacuna será una variante hipoalérgica de un péptido de la invención. En otra realización particular, el antígeno (alérgeno o inmunógeno) presente en dicha vacuna será un anticuerpo de la invención, tal como un anticuerpo quimérico, humanizado o, preferentemente, completamente humano, monoclonal, o un fragmento del mismo, tal como, por ejemplo, un scFv, opcionalmente, oligomerizado, cuando la vacuna va destinada a su administración a seres humanos.

La composición farmacéutica de la invención puede administrarse por cualquier vía apropiada (e.g., oral, parenteral, tópica, etc.), para lo cual se utilizarán los excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación de la forma farmacéutica de administración elegida. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones. A modo ilustrativo, no limitativo, la composición farmacéutica de la invención puede encontrarse formando parte de una formulación en macropartículas, nanopartículas o liposomas, y puede administrarse en una forma farmacéutica de administración sólida, en una forma farmacéutica de administración líquida, o en una forma farmacéutica de administración que comprende un sistema disperso. Más concretamente, la composición farmacéutica de la invención puede encontrarse en forma de soluciones inyectables, formas farmacéuticas adecuadas para su administración sublingual, polvos, gránulos, perlas, comprimidos, cápsulas, jarabes, emulsiones, supositorios, colirios, nebulizaciones, aerosoles, cremas, geles, etc.

Consecuentemente, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un péptido o de un anticuerpo de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de la alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo. En una realización particular, dicha composición farmacéutica es una vacuna destinada a inmunoterapia. En otra realización particular, dicho péptido de la invención comprende un péptido cuya secuencia aminoacídica comprende, o está constituida por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo. En otra realización particular, dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o, preferentemente, completamente humano, monoclonal, o un fragmento del

mismo, tal como, por ejemplo, un scFv, opcionalmente, oligomerizado, capaz de unirse a un péptido cuya secuencia aminoacídica comprende, o está constituida por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

5

#### **F. Diagnóstico (reactivos, métodos y kits)**

Los péptidos y anticuerpos de la invención pueden ser utilizados en el diagnóstico de la alergia al polen del olivo, por lo que pueden actuar como reactivos en métodos para el diagnóstico de alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo.

10 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un reactivo para su empleo en un método *in vitro* o *in vivo* para el diagnóstico de alergia a polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto, en donde dicho reactivo comprende un péptido de la invención o un anticuerpo de la invención. En una realización particular, dicho péptido de la invención comprende un péptido cuya secuencia aminoacídica comprende, o está constituida  
15 por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo. En otra realización particular, dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o, preferentemente, completamente humano, monoclonal, o un fragmento del mismo, tal como, por ejemplo, un scFv, opcionalmente, oligomerizado, capaz de unirse a un  
20 péptido cuya secuencia aminoacídica comprende, o está constituida por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

25 Los métodos *in vitro* o *in vivo* para el diagnóstico de alergia a polen de olivo de una variedad definida de olivo se basan en técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia que serán mencionadas más adelante.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vivo* para el diagnóstico de alergia a polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto que comprende administrar a un sujeto un péptido de la invención o un anticuerpo de la invención y evaluar la reacción en el sujeto.

30 Tal como aquí se utiliza, el término “sujeto” incluye a cualquier animal susceptible de inducir una respuesta inmune en respuesta a un antígeno, por ejemplo, un mamífero, incluido el ser humano.

Para la puesta en práctica de este método de diagnóstico *in vivo* puede realizarse cualquiera de las pruebas *in vivo* convencionales tales como, por ejemplo, Skin Prick Test (SPT), pruebas intradérmicas, pruebas de provocación nasal, bronquial y/o conjuntival (humanos), etc. [van Hage-Hamsten M, Pauli G. Provocation testing with recombinant allergens. *Methods*. 2004; 32(3):281-91].

En una realización particular, dicho péptido de la invención es un péptido cuya secuencia aminoacídica comprende, o está constituida por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

Cuando se utilizan anticuerpos, estos tendrán que ser, ventajosamente, compatibles con la especie (humana o animal) a la que se le va a administrar para evitar reacciones indeseables. Por tanto, en una realización particular, cuando el sujeto es un ser humano, el anticuerpo de la invención será un anticuerpo quimérico, humanizado o, preferentemente, completamente humano, monoclonal, o un fragmento del mismo, tal como, por ejemplo, un scFv, opcionalmente, oligomerizado (di- o multimerizado). En una realización específica, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo capaz de unirse a un péptido cuya secuencia aminoacídica comprende, o está constituida por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

Consecuentemente, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un péptido de la invención o de un anticuerpo de la invención en la elaboración de una composición para el diagnóstico *in vivo* de la alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto. En una realización particular, dicho péptido de la invención comprende un péptido cuya secuencia aminoacídica comprende, o está constituida por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo. Cuando se utilizan anticuerpos, estos tendrán que ser, ventajosamente, compatibles con la especie (humana o animal) a la que se le va a administrar. Por tanto, en una realización particular, cuando el sujeto es un ser humano, el anticuerpo de la invención será un anticuerpo quimérico, humanizado o, preferentemente, completamente humano, monoclonal, o un fragmento del mismo, tal como, por ejemplo, un scFv, opcionalmente, oligomerizado (di- o multimerizado). En una realización específica, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo capaz de unirse a un péptido cuya secuencia aminoacídica

comprende, o está constituida por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

5 El diagnóstico *in vivo* de alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto comprende la realización de pruebas *in vivo* convencionales tales como las mencionadas previamente.

10 La invención también se relaciona, en otro aspecto, con un método *in vitro* para (i) el diagnóstico de alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto, o para (ii) determinar la evolución del curso de la alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto, o para (iii) evaluar la eficacia de un tratamiento contra alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto, que comprende determinar el título de IgE y, opcionalmente, IgG, frente a un péptido de la invención en una muestra biológica de dicho sujeto.

15 Tal como aquí se utiliza, el término “muestra biológica de un sujeto” incluye a cualquier muestra del sujeto susceptible de contener inmunoglobulinas, por ejemplo, sangre completa, suero o plasma, secreciones nasales y bronquiales, lágrimas, leche materna, cordón umbilical, etc.

20 En una realización particular, dicho péptido de la invención comprende un péptido cuya secuencia aminoacídica comprende, o está constituida por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

25 En una realización particular, la puesta en práctica de este método comprende la realización de pruebas *in vitro* basadas en el empleo de técnicas de RIST [radioinmunsorbent test (ensayo de radioinmunoabsorción)], PRIST [paper radioinmunsorbent test (ensayo de radioinmunoabsorción en papel)], RAST [radioalergosorbent test (ensayo de radioalergoabsorción)], ELISA (ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada), RIA (radioinmunoensayo), etc., incluyendo el empleo de sistemas de diagnóstico comerciales disponibles (e.g., Phadebas RAST, CAP, ImmunoCAP, UniCAP, CAP FEIA, AlaSTAT, FAST, IgEquick, CMG Immunodot, etc., producidos o suministrados por diversas  
30 compañías comerciales, tales como Pharmacia Diagnostics, CMG Laboratorios etc., o bien, el empleo de (bio)chips, arrays o microarrays de alérgenos y/o la determinación de la activación de células T, la activación de basófilos, la liberación de histamina, etc.

En una realización particular, dicho método comprende poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto, por ejemplo, una muestra de suero, con un péptido de la invención y determinar el título de anticuerpos IgE y, si se desea, de IgG, frente a dicho péptido. La determinación de la IgG puede ser interesante para el seguimiento de las terapias aplicadas al sujeto en tratamiento. De este modo, este método puede ser utilizado con fines de diagnóstico o, alternativamente, para determinar la evolución del curso de la alergia en el sujeto (opcionalmente sometido a un tratamiento), así como para evaluar la eficacia de un tratamiento anti-alérgico administrado a un sujeto que padece alergia al polen de olivo.

La determinación del título de inmunoglobulinas (IgE y, en su caso, IgG) frente a los péptidos de la invención puede realizarse por métodos convencionales conocidos por el experto en la materia. En una realización particular, la determinación del título de IgE y, en su caso, de IgG, comprende analizar la reacción péptido de la invención-inmunoglobulina (IgE y, en su caso, IgG) presente en la muestra biológica del sujeto, visualizar la formación de dicho complejo y determinar la variedad de olivo responsable de la alergia en el sujeto.

La visualización del complejo puede llevarse a cabo por métodos convencionales, por ejemplo, mediante métodos colorimétricos, fluorimétricos, quimioluminiscentes, radioisotópicos, de medidas de densidad óptica (absorbancia), otras técnicas asociadas: planimetría, recuento celular, citometría de flujo, etc. Una referencia general sobre estas técnicas puede encontrarse en “Enfermedades Respiratorias. Utilidad del Laboratorio”.

Segunda Edición. Editores: P. Ancic Cortez, T. Clark, R. Rodriguez-Roisin, R. Paredes Martinez. Facultad de Medicina, Universidad de Chile y The British Council ([http://www.med.uchile.cl/otros/dra\\_ancic/libro.html](http://www.med.uchile.cl/otros/dra_ancic/libro.html)).

Para establecer si un sujeto padece alergia al polen de olivo de una variedad definida se aplicarán, en general, los límites normales ya establecidos. Como es conocido, la IgE sérica está presente normalmente en cantidades del orden de ng/ml, encontrándose aumentada en diferentes condiciones alérgicas, en enfermedades virales y parasitarias, y en ciertas inmunodeficiencias. El valor de IgE sérica se expresa normalmente en unidades internacionales (UI) por ml (1 UI = 2,4 ng de proteína). El nivel de IgE varía con la edad; en la sangre de cordón de recién nacidos normales es inferior a 0,5 UI/ml, y en el adulto normal es alrededor de 20 UI/ml (normalmente inferior a 80 UI/ml). A partir de los 14 años se considera anormalmente elevada una IgE mayor de 333 UI/ml (800 ng/ml). En personas atópicas el nivel de IgE es usualmente 3 a 5 veces más elevado.

El empleo de un péptido de la invención en un método *in vitro* para (i) el diagnóstico de la alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto, o para (ii) determinar la evolución del curso de la alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto, o para (iii) evaluar la eficacia de un tratamiento contra alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto, constituye un aspecto adicional de esta invención. En una realización particular, dicho péptido de la invención comprende un péptido cuya secuencia aminoacídica comprende, o está constituida por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, en adelante kit de la invención, para la puesta en práctica de los métodos *in vivo* e *in vitro* previamente definidos que comprende un péptido de la invención, o un anticuerpo de la invención o un soporte sólido de la invención.

El kit de la invención comprende, además, si se desea, controles positivos (i.e. histamina hidroc্লórica), negativos (el mismo tampón en que se realizan las diluciones de los extractos, proteínas alérgicas recombinantes de variedades con baja/nula reactividad, etc.).

En una realización particular, el kit de la invención es un kit para el diagnóstico *in vivo* de alergia a polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto que comprende un péptido de la invención. En otra realización particular, el kit de la invención es un kit para la puesta en práctica de un método *in vitro* para (i) el diagnóstico de alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto, o para (ii) determinar la evolución del curso de la alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto, o para (iii) evaluar la eficacia de un tratamiento contra alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto que comprende un péptido de la invención o un soporte sólido de la invención. En ambos casos, en una realización particular, dicho péptido de la invención es un péptido cuya secuencia aminoacídica comprende, o está constituida por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

En otra realización particular, el kit de la invención es un kit para el diagnóstico *in vivo* de alergia a polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto que comprende un anticuerpo de la invención. En una realización concreta, cuando el kit está destinado para su empleo en seres humanos, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo



quimérico, humanizado o, preferentemente, completamente humano, monoclonal, o un fragmento del mismo, tal como, por ejemplo, un scFv, opcionalmente, oligomerizado (di- o multimerizado). En una realización específica, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo capaz de unirse a un péptido cuya secuencia aminoacídica comprende, o está constituida por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

### **G. Aplicaciones adicionales**

Los péptidos de la invención también pueden ser utilizados para identificar *in vitro* la reacción celular al alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un péptido de la invención en la identificación *in vitro* de la reacción celular al alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo, mediante la estimulación o inhibición de dicha reacción celular. En una realización particular, dicho péptido de la invención comprende un péptido cuya secuencia aminoacídica comprende, o está constituida por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo. Los métodos empleados para medir dicha reacción celular son conocidos por los expertos en la materia e incluyen, entre otros, a título ilustrativo, métodos para medir la activación de células T [Thomas et al. "Recombinant allergens for analysing T-cell responses". *Methods*. 2004; 32(3):255-64], métodos para medir la activación de basófilos [Valent et al. "Assays for measuring *in vitro* basophil activation induced by recombinant allergens". *Methods*. 2004; 32(3):265-70], métodos para medir la liberación de histamina [Valent et al. (2004) citado *supra*].

Por otra parte, a partir del análisis de las secuencias nucleotídicas y/o aminoacídicas de los alérgenos determinados para cada cultivar de olivo y de los datos de reactividad de las correspondientes proteínas recombinantes frente a los diferentes ensayos propuestos, la conservación en las diferentes secuencias de epítopos de células T y B, etc., es posible definir estrategias para diseñar moléculas recombinantes que cubran el espectro de epítopos (es decir, mantengan la inmunogenicidad), pero que presenten alergenicidad reducida. Estas moléculas pueden ser construidas a partir de las secuencias precursoras obtenidas de variedades, mediante ingeniería genética, mutagénesis dirigida, modificación química de los

alérgenos, síntesis de péptidos etc. Una vez obtenidas, estas moléculas hipoalérgicas pueden ser ensayadas en pruebas de reactividad, y en inmunoterapia de pacientes alérgicos.

Por tanto, los ácidos nucleicos de la invención y los péptidos de la invención pueden ser utilizados, además, para obtener y/o producir productos derivados de dichos ácidos nucleicos y péptidos de la invención, por ejemplo, sondas, construcciones antisentido, anticuerpos, etc. Dichos productos derivados de dichos ácidos nucleicos y péptidos de la invención pueden ser útiles en investigación, diagnóstico, terapia y/o prevención de alergia al polen de olivo y/o en la caracterización de cultivares de olivo, por ejemplo, en la caracterización de variedades definidas de olivo.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un ácido nucleico de la invención para obtener productos derivados de dichos ácidos nucleicos, potencialmente útiles en investigación, diagnóstico, terapia y/o prevención de alergia al polen de olivo y/o en la caracterización de cultivares de olivo. En una realización particular, dicho ácido nucleico de la invención comprende un ácido nucleico cuya secuencia nucleotídica comprende, o está constituida por, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-24, o un fragmento de las mismas que codifica un péptido que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos productos derivados de dichos ácidos nucleicos de la invención comprenden sondas DNA, sondas RNA, vacunas DNA, construcciones antisentido, construcciones hipoalérgicas o hiperalérgicas modificadas, construcciones para la sobreexpresión del alérgeno recombinante, construcciones de “knocking out” de genes de alérgenos, etc. Dichas sondas (DNA o RNA) pueden estar, opcionalmente, marcadas, por ejemplo, con haptenos o moléculas indicadoras o genes testigo (“reporter genes”), moléculas fluorescentes, moléculas radiactivas, partículas de oro, enzimas, etc., y se basan en las secuencias nucleotídicas de los ácidos nucleicos de la invención, correspondiéndose con las secuencias totales o parciales, fusionadas o generadas mediante transcripción *in vitro*, PCR, nick-translation o cualquier otro método, incluida la síntesis química. Las vacunas DNA para inmunización genética pueden incluir, opcionalmente, otras secuencias inmunomodulantes o co-estimulantes, secuencias para péptidos señal, adaptaciones al código genético humano, etc. [Hartl et al. “DNA vaccines for allergy treatment. Methods. 2004; 32(3):328-339].

En una realización particular, dicha construcción antisentido, construcción hipolérgica o hiperalérgica modificada, construcción para la sobreexpresión del alérgeno recombinante, o construcción para “knocking out” de genes de alérgenos puede ser

utilizada para obtener plantas de olivo u otras Oleáceas transformadas genéticamente capaces de expresar características deseables. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de plantas con características deseables incluyen plantas que muestren depleción de los niveles de proteínas alergénicas, es decir, con un polen incapaz de desencadenar fenómenos alérgicos; estas plantas son plantas cuyo uso preferencial es de tipo ornamental en áreas urbanas o de gran densidad de población, jardines, interior de edificios, fijadores de suelo en obras públicas (autopistas e incluso repoblación). En el caso del alérgeno Ole e 1, y debido a su importante papel en la hidratación y germinación del polen, las plantas en las que consiguiera “knocking out” del alérgeno serían probablemente androestériles, e incapaces de producir polen fisiológicamente funcional, por lo que poseerían un gran uso potencial en programas de mejora genética, actuando exclusivamente como receptoras de polen. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de otras Oleáceas susceptibles de ser transformadas incluyen *Fraxinus ornus*, *Fraxinus excelsior*, *Fraxinus angustifolia*, *Fraxinus oxycarpa*, *Ligustrum vulgare*, *Syringa vulgaris*, *Forsythia suspensa*, *Olea africana*, *Phillyrea angustifolia*, *Phillyrea latifolia*, *Jasminum officinalis*, etc.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un péptido de la invención para obtener productos derivados de dichos péptidos, potencialmente útiles en investigación, diagnóstico, terapia y/o prevención de alergia al polen de olivo y/o en la caracterización de cultivares de olivo. En una realización particular, dicho péptido de la invención comprende un péptido cuya secuencia aminoacídica comprende, o está constituida por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos productos derivados de dichos péptidos de la invención comprenden oligómeros de péptidos de la invención, anticuerpos y fragmentos de los mismos que reconocen epítipos de dichos péptidos de la invención o mimotopos (péptidos que mimetizan el lugar de reconocimiento de un anticuerpo pero que no corresponden a la secuencia lineal del antígeno conocido). Dichos productos derivados de los péptidos de la invención pueden obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. A modo ilustrativo, pueden obtenerse oligómeros de los péptidos de la invención fusionando la secuencia nucleotídica codificante de un péptido de la invención a un dominio de oligomerización, por ejemplo, un dominio de dimerización, trimerización, tetramerización, etc., de manera que cuando se expresa se producen los oligómeros. Los

anticuerpos pueden obtenerse por métodos convencionales tal como se ha mencionado previamente, por ejemplo, inoculando péptidos de la invención a un animal de experimentación. Los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse por técnicas convencionales, por ejemplo, sometiendo los anticuerpos a la acción de las enzimas apropiadas o bien mediante métodos recombinantes para obtener scFv, etc.

Los productos derivados de los ácidos nucleicos de la invención y los productos derivados de los péptidos de la invención, potencialmente útiles en investigación, diagnóstico, terapia y/o prevención de alergia al polen de olivo y/o en la caracterización de cultivares de olivo, también forman parte de la presente invención.

Por tanto, en otro aspecto, la invención lo constituye un producto derivado de un ácido nucleico de la invención, potencialmente útil en investigación, diagnóstico, terapia y/o prevención de alergia al polen de olivo y/o en la caracterización de cultivares de olivo. En una realización particular, dicho producto derivado de un ácido nucleico de la invención comprende una sonda DNA, una sonda RNA, una vacuna DNA, una construcción antisentido, una construcción hipoalérgica o hiperalérgica modificada, una construcción para la sobreexpresión del alérgeno recombinante, una construcción de “knocking out” de genes de alérgenos, etc. Dichas sondas (DNA o RNA) pueden estar, opcionalmente, marcadas, por ejemplo, con haptenos o con moléculas indicadoras o genes testigo (“reporter genes”), moléculas fluorescentes, moléculas radiactivas, partículas de oro, enzimas, etc. En una realización particular, el ácido nucleico de la invención del que deriva dicho producto derivado de ácido nucleico de la invención comprende un ácido nucleico cuya secuencia nucleotídica comprende, o está constituida por, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-24, o un fragmento de las mismas que codifica un péptido que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

En otro aspecto, la invención lo constituye un producto derivado de un péptido de la invención, potencialmente útil en investigación, diagnóstico, terapia y/o prevención de alergia al polen de olivo y/o en la caracterización de cultivares de olivo. En una realización particular, dicho producto derivado de un péptido de la invención comprende un oligómero de un péptido de la invención, un anticuerpo de la invención, un mimotopo, etc. En una realización particular, el péptido de la invención del que deriva dicho producto derivado de péptido de la invención comprende un péptido cuya secuencia nucleotídica comprende, o está constituida por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ

ID NO: 27-50, o un fragmento del mismo que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

**H. Método *in vitro* para identificar el alérgeno de la variedad de olivo causante de alergia en un sujeto**

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para identificar el alérgeno del polen de la variedad de olivo (*Olea europea*) causante de alergia en un sujeto o para identificar la variedad de olivo (*Olea europea*) causante de alergia en un sujeto que comprende:

- 10 a) poner en contacto, por separado, una muestra biológica procedente de un sujeto con cada uno de los péptidos que constituyen una pluralidad de péptidos, en donde cada uno de dichos péptidos presente en dicha pluralidad de péptidos está separado del resto de péptidos y comprende, al menos, un epítipo de un alérgeno de polen de olivo específico de una variedad definida de olivo; y
- 15 b) determinar el título de IgE y, opcionalmente, de IgG, frente a dichos péptidos en dicha muestra biológica.

El título de IgE y, en su caso, de IgG frente a los péptidos en cuestión, se puede determinar por cualquier método convencional conocido por los expertos en la materia, por ejemplo, los métodos citados previamente en esta descripción (véase, por ejemplo, el apartado E).

En una realización particular, cada uno de los péptidos presentes en dicha pluralidad de péptidos comprende, al menos, un epítipo de un alérgeno de polen de olivo específico de una variedad definida de olivo, en donde dicho alérgeno de polen de olivo se selecciona entre los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 3, Ole e 4, Ole e 5, Ole e 6, Ole e 7, Ole e 8, Ole e 9, Ole e 10 y sus mezclas.

En otra realización particular, dicha pluralidad de péptidos contiene, al menos, un péptido que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo específico de una variedad definida de olivo. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dicha variedad definida de olivo incluye las variedades de olivo denominadas Picholine, Menara, Lucio, Picual, Loaime, Hojiblanca, Arbequina y Bella de España.

En otra realización particular de dicho método, dicha pluralidad de péptidos comprende, al menos, un péptido de la invención, tal como un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias identificadas como SEQ ID NO:

27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 y un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

En otra realización particular, dicho método comprende, antes de la etapa a), la etapa de poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con una mezcla de alérgenos de polen de olivo. En una realización concreta, dicha mezcla de alérgenos de polen de olivo comprende un extracto proteico de polen de olivo de cualquier variedad de olivo. En otra realización concreta, dicha mezcla de alérgenos de polen de olivo contiene dos o más péptidos comprendiendo cada uno de dichos péptidos, al menos, un epítipo de un alérgeno de polen de olivo específico de una variedad definida de olivo. En una realización particular, dicho alérgeno de polen de olivo se selecciona entre los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 3, Ole e 4, Ole e 5, Ole e 6, Ole e 7, Ole e 8, Ole e 9, Ole e 10 y sus mezclas.

### **I. Diagnóstico e inmunoterapia personalizada**

Una característica de la presente invención es que permite el diseño de métodos de diagnóstico personalizados y el diseño de inmunoterapias desensibilizantes personalizadas.

#### *Diseño de métodos de diagnóstico personalizados*

Una vez obtenido un panel representativo de alérgenos recombinantes, que comprenden, al menos un péptido de la invención, para las variedades de olivo a determinar, y tras su estandarización, se procede a su empleo en diagnóstico personalizado de pacientes potencialmente atópicos. Para ello se diseñan pruebas de diagnóstico que incluyan dichos alérgenos recombinantes específicos de las distintas variedades, especialmente aquellas pruebas *in vitro* que permitan el ensayo simultáneo de muestras biológicas de los pacientes frente a un gran número de alérgenos, tales como las pruebas de tipo RAST, RIA, ELISA, chips o microarrays de alérgenos, etc. Con los alérgenos recombinantes es posible, además, realizar otras pruebas *in vitro* tales como la respuesta de activación de células T, la determinación de la activación de basófilos, la medida de la liberación de histamina, etc. Además de las pruebas *in vitro* es posible diseñar pruebas *in vivo*, por ejemplo, del tipo SPT, intradérmicas, de provocación nasal, bronquial, conjuntival, etc., sujetas a la aprobación del

uso de dichos productos recombinantes y la adaptación de dichas pruebas a la normativa aplicable.

En este tipo de diagnósticos y, fundamentalmente, para el caso de pruebas *in vivo*, se podría seguir una aproximación en dos, e incluso en más etapas, como las descritas en la solicitud de patente española ES 2196952, que incluiría el ensayo primario de un panel de alérgenos recombinantes procedentes del polen de las variedades de olivo consideradas variedades dominantes en la región geográfica correspondiente del paciente. Tras esta primera aproximación, y en el caso de que se obtengan resultados positivos, se procede a la determinación de la reactividad frente a los diversos alérgenos recombinantes específicos de variedad de olivo de forma individualizada, así como a variedades consideradas “secundarias” de la comarca olivarera de origen del paciente, con objeto de ajustar en el mayor grado posible la(s) variedad(es) y el(los) alérgeno(s) responsables de la hipersensibilidad. Obviamente, el kit de diagnóstico debe contener al igual que los kits comercializados actualmente, diversos controles positivos (i.e. histamina hidroclicórica), así como controles negativos (el mismo tampón en que se realizan las diluciones de los extractos, proteínas alérgicas recombinantes de variedades con baja/nula reactividad etc.).

#### *Diseño de inmunoterapias desensibilizantes personalizadas*

Una vez establecido el diagnóstico con la mayor precisión posible, se puede personalizar la composición de la vacuna correspondiente para aquellos pacientes en los que la inmunoterapia sea el tratamiento de elección de acuerdo a parámetros médicos bien definidos (e.g., imposibilidad de aislamiento físico frente al agente alérgico, mantenimiento de los síntomas incluso en pacientes tratados con medicamentos, prevención de la aparición o exacerbación de asma, etc.). Las vacunas o tratamientos desensibilizantes deberían contener un número adecuado de unidades comparativas totales de potencia inmunológica, repartidas proporcionalmente entre los distintos alérgenos recombinantes de las distintas variedades causantes de la alergia para cada paciente en base a la reactividad de éste a las distintas pruebas de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*. El protocolo de inmunoterapia podría seguir las recomendaciones ya establecidas para los extractos comerciales, de los que ya se posee amplia experiencia clínica.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para diseñar una terapia personalizada para un sujeto que padece alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo que comprende:

- (i) identificar el alérgeno del polen de la variedad de olivo (*Olea europea*) o la variedad de olivo (*Olea europea*) causante de alergia en dicho sujeto; y
- (ii) preparar una composición farmacéutica que comprende el alérgeno identificado en (i) o una variante hipoalérgica del mismo o un anticuerpo capaz de unirse a dicho alérgeno.

La identificación del alérgeno del polen de la variedad de olivo o de la variedad de olivo causante de alergia en dicho sujeto puede llevarse a cabo mediante el procedimiento descrito previamente (véase el apartado H de esta descripción).

La composición farmacéutica y su preparación pueden llevarse a cabo mediante la metodología descrita en el apartado D de esta descripción.

La variante hipoalérgica y su obtención pueden llevarse a cabo mediante la metodología descrita en el apartado B de esta descripción.

#### **J. Método de tratamiento**

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para prevenir y/o tratar una reacción alérgica causada por alergia al polen de olivo en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un péptido de la invención o una composición farmacéutica de la invención.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma.

#### **EJEMPLO 1**

#### **GENERACIÓN DE ALÉRGENOS RECOMBINANTES DE DISTINTAS VARIEDADES DE OLIVO Y SU UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICO E**

#### **INMUNOTERAPIA**

##### **1.1 Obtención de las secuencias alérgicas**

Las muestras de polen de *Olea europaea L.* fueron obtenidas durante los meses de Mayo y Junio de 2001 y 2003 de árboles perfectamente determinados varietalmente de los cultivares Loaime, Menara, Picholine marocaine, Lucio, Arbequina, Hojiblanca, Bella de España y Picual. Las muestras de polen fueron recolectadas individualmente en, al menos, dos árboles de cada variedad, a partir de numerosas ramas mediante agitación de las inflorescencias englobadas en el interior de bolsas de papel. De forma previa a su congelación en nitrógeno líquido y almacenaje, el polen fue purificado mediante tamizado a



través de mallas de 150  $\mu\text{m}$  para eliminar los restos de corolas, anteras y otros contaminantes. Tras análisis con técnicas microscópicas, se estimó que la presencia de pólenes anormales morfológicamente o pólenes de otras especies era inferior a 0,1% y que la presencia de partículas contaminantes de materiales vegetales era inferior a 0,5% en todas las variedades.

Se extrajo RNA total del polen de cada variedad utilizando un kit RNeasy Plant Total RNA (Quiagen, USA). Para ello, las muestras de polen fueron molidas en un mortero preenfriado con nitrógeno líquido y posteriormente procesadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tanto la calidad como la concentración del RNA total fueron determinadas mediante electroforesis en geles desnaturizantes y mediante determinación de la relación A260/A280. El RNA fue procesado inmediatamente mediante transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) o almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Se llevó a cabo la transcripción inversa de 5  $\mu\text{g}$  de RNA total por muestra, utilizando como transcriptasa inversa la enzima M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA) y un adaptador oligo-dT como cebador (SEQ ID NO: 51). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en muestras de 250 ng de cada una de las reacciones de transcripción inversa correspondientes a un volumen de 5  $\mu\text{l}$  tras la adición de 5  $\mu\text{l}$  de tampón de PCR 10x, 25 ng de cada cebador: Ole e 1 (SEQ ID NO: 52) y adaptador oligo-dT (SEQ ID NO: 51), dNTPs hasta una concentración final de 1 mM cada uno, 2,5 U DynaZyme DNA polymerase (Finnzymes Oy, Finland) y agua hasta un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ . Las muestras fueron desnaturizadas durante 2 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$  y sometidas a amplificación mediante PCR con 30 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$  durante 1 minuto,  $57^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos y  $72^{\circ}\text{C}$  durante 1 minuto. El oligonucleótido cebador Ole e 1 fue diseñado a partir de las secuencias del alérgeno mayoritario del polen del olivo Ole e 1 ya descritas en las bases de datos. Los productos de la reacción de amplificación (5  $\mu\text{l}$ ), fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE [Tris-acetato/EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)]. En dichos geles, aparecen bandas de aproximadamente 612 pares de bases (pb) que fueron escindidas y purificadas utilizando un kit específico (Prep-A-Gene de Bio-Rad). Los fragmentos amplificados fueron posteriormente clonados usando un sistema pGEM-T Easy (Promega). Un mínimo de tres clones por cada variedad fueron secuenciados.

A continuación se procedió al análisis de las secuencias utilizando el programa Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) (Altschul SF, Gish SF, Miller W, Myers EW and Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410) y a su

remisión a la base de datos GenBank<sup>TM</sup>/EMBL, aunque sin acceso público hasta la fecha de presentación de esta solicitud de patente. El 80% de las secuencias obtenidas muestra una similitud de 97% con la forma 1/3C del alérgeno mayoritario Ole e 1 que existe en la base de datos GenBank<sup>TM</sup>/EMBL (Número de acceso: X 76395) (Villalba M, Batanero E, Monsalve RI, González de la Peña MA, Lahoz C, Rodríguez R. Cloning and expression of *Ole e I*, the major allergen from olive tree pollen. J Biol Chem 1994; 269:15217-15222). Los tres clones correspondientes a la variedad Bella de España presentan una homología del 93% con la forma 1/5C de Ole e 1 (GenBank<sup>TM</sup>/EMBL Número de acceso: X 76396). En la Tabla 5 se ilustra el nombre así como el número de acceso de cada clon remitido a la base de datos.

Tabla 5

Remisión de secuencias Ole e 1 a GenBank™ / EMBL			
Variedad/clon	Bankit	Nº acceso	SEQ.ID.NO:
Picholine Cl	459020	AF500908	1
Picholine C2	470053	AF515277	2
Picholine C3	470173	AF515278	3
Menara C1	470195	AF515279	4
Menara C2	470203	AB515280	5
Menara C3	470205	AF515281	6
Lucio Cl	480492	AY137467	7
Lucio C2	484149	AY137468	8
Lucio C3	480494	AY137469	9
Picual Cl	479834	AF532760	10
Picual C2	483493	AF532753	11
Picual C3	479748	AF532754	12
Loaime Cl	479760	AF532755	13
Loaime C2	479802	AF532756	14
Loaime C3	483539	AF532757	15
Hojiblanca Cl	483543	AF532758	16
Hojiblanca C2	479840	AF532761	17
Hojiblanca C3	483571	AF532762	18
Arbequina Cl	479820	AF532759	19
Arbequina C2	480172	AF532763	20
Arbequina C3	480190	AF532764	21
B de España Cl	480196	AF532765	22
B de España C2	483917	AF532766	23
B de España C3	483923	AF532767	24

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante programas de análisis adecuado, obteniéndose los alineamientos correspondientes (Software Clustal\_X 1.81), y un análisis de clústers (Software TreeView 1.6.5), que ha permitido establecer las relaciones correspondientes entre las variedades (Figura 3). Los resultados indican que la variabilidad presente en la secuencia a nivel intravarietal es mucho menor que la variabilidad intervarieta, lo que permite definir secuencias consenso para cada variedad analizada. Dichas secuencias consenso representan la secuencia más probable por cada variedad y permiten simplificar aquellos procedimientos en los que el trabajo con la totalidad de las secuencias no sea practicable (por ejemplo, expresión recombinante y pruebas clínicas subsecuentes).

Las microheterogeneidades detectadas en las secuencias nucleotídicas llegan a afectar en algunos casos a las secuencias aminoacídicas (SEQ ID NO: 27-50).

## 15 1.2 Obtención de las proteínas recombinantes

Cada una de las secuencias correspondientes a Ole e 1 de cada variedad analizada son subclonadas desde pGEM-T easy (Promega) hasta la región polylinker de un vector comercial de expresión PinPoint Xa (Promega Corporation, Madison, WI, USA) adecuado para la inserción “en fase” de los fragmentos (plásmidos Xa-1, Xa-2 ó Xa-3) previamente linearizado, mediante procedimientos estándar. La construcción resultante es usada para transformar células competentes de *E. coli* de tipo DH5 $\alpha$  (GIBCO BRL Life Technologies, Paisley, UK). Los transformantes resistentes a ampicilina son aislados y sometidos a análisis de restricción y a secuenciación con la utilización de un cebador PinPoint Sequencing Primer (Promega Corporation, Madison, WI, USA) para asegurar el mantenimiento de la correcta pauta de lectura y confirmar la presencia de las secuencias de Ole e 1.

La expresión y purificación de las proteínas de fusión de Ole e 1 en las distintas variedades se lleva a cabo básicamente según los procedimientos descritos por Alché y col., en Prot. Express. Purif. 16, 251-260. 1999. Brevemente y para cada producto recombinante: una única colonia recombinante aislada es cultivada en medio LB (Luria Bertani)/ampicilina (20  $\mu$ g/ml); tras inducir la expresión con IPTG (isopropiltio- $\beta$ -D-galactósido) 1 mM y posterior incubación, las células bacterianas son separadas del medio, y la presencia de la proteína Ole e 1 de fusión analizada tanto en el medio de cultivo como en el sobrenadante de un lisado crudo de las células bacterianas. Para dicho análisis se recurre a experimentos de

Western-blotting utilizando tanto un anticuerpo monoclonal frente a Ole e 1 (Alché JD, Castro AJ, Olmedilla A, Fernández MC, Rodríguez R, Villalba M and Rodríguez-García MI: “The major olive pollen allergen (Ole e 1) shows both gametophytic and sporophytic expression during anther development, and its synthesis and storage takes place in the RER”.

5 J. Cell Sci. 112(15), 2501-2509. 1999) como un reactivo streptavidina-conjugado con fosfatasa alcalina (Alché JD, Paul E and Dickinson HG: “Heterogously expressed polypeptide from the yeast meiotic gene HOP1 binds preferentially to yeast DNA”. Prot. Express. Purif. 16, 251-260. 1999) capaces de detectar la proteína y el polipéptido biotinilado de fusión respectivamente.

10 En la mayor parte de las proteínas de fusión, se observa una cantidad significativa de proteína expresada de forma soluble, por lo que se procede a su purificación directamente mediante cromatografía en una columna de la resina SoftLink Soft Release Avidin Resin (Promega Corporation, Madison, WI, USA), capaz de eluir la proteína de fusión en condiciones no desnaturalizantes, tales como incubación con biotina 5 mM en un tampón  
15 Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, 5% glicerol.

Cada una de las proteínas de fusión obtenidas es sometida a una digestión con endoproteinasa (factor Xa) para liberar el polipéptido biotinilado. La digestión se realiza añadiendo 0,01 µl de factor Xa (Promega Corporation, Madison, WI, USA) por µg de proteína de fusión, en tampón de reacción 1X optimizado para dicho enzima (Promega Corporation, Madison, WI, USA ). La mezcla de reacción se incuba durante 3 horas a 37°C.  
20 La digestión se detiene mediante precipitación con ácido tricloroacético (TCA) (concentración final 10%) a 4°C, centrifugación, desecación del precipitado y posterior resuspensión en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8,0). Los resultados de las digestiones son de nuevo analizados mediante Western-blotting, y las proteínas recombinantes Ole e 1  
25 resultantes purificadas mediante elución diferencial en una columna de exclusión molecular “Superosa 12” (Farmacia LKB FPLC system, Pharmacia LKB Biotechnology, Milton Keynes, UK). En cada aislamiento se cargan 200 µl de solución de la proteína digerida sobre la columna y se realiza la elución con tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) según el siguiente esquema:

VOLUMEN ELUIDO*	FRACCIONAMIENTO
10 ml	2 fracciones x 5 ml
3 ml	6 fracciones x 0.5 ml
4 ml	20 fracciones x 0.2 ml
7 ml	7 fracciones x 1 ml
Volumen total= 24 ml	Nº total de fracciones= 35

\*La proteína Ole e 1 aparece como un pico en las mediciones de densidad óptica (280nm) presente en las fracciones 15 a 20. El análisis SDS-PAGE de dichas fracciones ofrece una banda única correspondiente a la proteína Ole e 1 recombinante.

### 1.3 Estandarización de los productos recombinantes

Los productos recombinantes obtenidos se someten a un análisis final mediante cuantificación proteica, SDS-PAGE y Western blotting con la utilización de un panel de anticuerpos monoclonales anti-Ole e 1 de forma similar a la caracterización de los extractos proteicos crudos de polen de olivo (Castro AJ, Alché JD, Cuevas J, Romero PJ, Alché V and Rodríguez-García MI: "Pollen from different olive tree cultivars contains varying amounts of the major allergen Ole e 1". Int. Arch. Allergy Clin Immunol 131, 164-173. 2003).

Finalmente, se determina la potencia biológica de cada una de las proteínas recombinantes utilizando técnicas de diagnóstico *in vitro* que incluyen el análisis de la reactividad de sueros de pacientes en experimentos de Western-blot (Castro AJ: "Aproximación a la función biológica del alérgeno mayoritario del polen del olivo (Ole e 1). Implicaciones clínicas y ambientales" Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2001) y mediante titulación por técnicas de ELISA (Quiralte J, Florido F, Arias de Saavedra JM, Gómez A, Sáenz de San Pedro B, González E and Rodríguez R: "Olive allergen-specific IgE responses in patients with Olea europea pollinosis" Allergy 57 (Suppl. 71):47-52. 2002). En

ambos casos se utiliza un panel de sueros de pacientes preanalizados según técnicas estándar y reconocidos como positivos y negativos, y en comparación con extractos comerciales de reconocida eficacia y potencia inmunológica.

## 5 1.4 Elaboración de un kit de diagnóstico y ejemplo de diagnóstico de un paciente

### Protocolo general

Las soluciones de alérgenos recombinantes obtenidas constituyen la base para un kit experimental para dicho diagnóstico. A modo ilustrativo, los pacientes sintomáticos de los que se sospecha poseen hipersensibilidad tipo I a aeroalérgenos pueden ser chequeados de forma primaria mediante SPT con un kit que contendría extractos alérgicos comunes, entre los que se encontrarían diversas mezclas de alérgenos recombinantes de polen de olivo correspondientes a las variedades dominantes en la comunidad autonómica correspondiente. Tras esta primera aproximación, y en el caso de positividad, se procedería a la determinación de reactividad frente a los diversos alérgenos recombinantes de forma individualizada, así como a alérgenos recombinantes de variedades consideradas “secundarias” de la comarca olivarera de origen del paciente, con objeto de ajustar en el mayor grado posible la(s) variedad(es) responsables de la hipersensibilidad. Obviamente, dicho kit contendría, al igual que los kits comercializados actualmente, diversos controles positivos (por ejemplo, histamina hidrocioruro), así como controles negativos (el mismo tampón en que se realizan las diluciones de los extractos, extractos de variedades con baja/nula reactividad o extractos de variedades irrelevantes o americanas).

### Caso hipotético (Ejemplo de aplicación de la invención)

Paciente varón, de 46 años de edad, nacido y residente en Granada con historial de rinitis y conjuntivitis estacional, diagnosticado de asma bronquial mediante espirometría y test de broncodilatador, y de alergia al polen del olivo tras SPTs con extractos comerciales. Tras supresión de tratamiento antihistamínico, el suero del paciente es sometido a pruebas de reactividad en un ensayo de tipo ELISA [Quiralte et al., Allergy 57 (Suppl. 71):47-52 (2002)] con un kit experimental que contiene diferentes alérgenos recombinantes correspondientes a Ole e 1 de las variedades dominantes en Andalucía (Picual, Hojiblanca, Lechín de Sevilla, Manzanilla de Sevilla, Verdial de Huevar, Gordal Sevillana, Verdial de Velez-Málaga, Aloreña, Lechín de Granada, Manzanilla Prieta), así como de las variedades secundarias de la comarca granadina “La Vega” (Lucio, Loaime y Cornezuelo), los cuales

pueden ser obtenidos según la metodología descrita en esta memoria. Al tratarse de un ejemplo hipotético está redactado según lo que se considera que debería hacerse en un caso de un paciente de la región de La Vega granadina, independientemente de que en el momento actual no se disponga de las secuencias de Ole e 1 de todas las variedades implicadas.

La estandarización de dichos alérgenos recombinantes, realizada según el método descritos en el apartado 1.3 han permitido cuantificar su contenido en alérgeno mayoritario Ole e 1 en 50 µg/ml, y su potencia inmunológica en 100 BU (unidades biológicas, del inglés “biological units”)/ml. Una vez cuantificado el ELISA, el paciente muestra la reactividad mostrada en la Tabla 6.

**Tabla 6**

<b>VARIEDAD</b>	<b>Ole e 1</b>
Picual	++++
Hojiblanca	+++
Lechín de Sevilla	+++
Manzanilla de Sevilla	+
Verdial de Huevar	-
Gordal Sevillana	+
Verdial de Velez-Málaga	-
Aloreña	++
Lechín de Granada	++++
Manzanilla Prieta	+
Lucio	++
Loaime	++++
Cornezuelo	++

donde

- 15 “-” significa que el paciente no es sensible al polen del olivo de la variedad en cuestión;  
 “+” significa que el paciente es muy poco sensible al polen del olivo de la variedad en cuestión;



“++” significa que el paciente es poco sensible al polen del olivo de la variedad en cuestión;

“+++” significa que el paciente es sensible al polen del olivo de la variedad en cuestión; y

5 “++++” significa que el paciente es muy sensible al polen del olivo de la variedad en cuestión

### **1.5 Preparación de vacunas personalizadas y ejemplo de la inmunoterapia de un paciente**

10 Una vez establecido el diagnóstico con la mayor precisión posible, se puede personalizar la composición de la vacuna correspondiente para aquellos pacientes en los que la inmunoterapia sea el tratamiento de elección de acuerdo a parámetros médicos bien definidos (p. e., imposibilidad de aislamiento físico frente al agente alergénico, mantenimiento de los síntomas incluso en pacientes tratados con medicamentos, prevención  
15 de la aparición o exacerbación de asma, etc.). Dichas vacunas deben contener el número adecuado de unidades comparativas totales de potencia inmunológica, aunque repartidas proporcionalmente para cada una de las formas recombinantes de alérgenos correspondientes a las variedades causantes de la alergia para cada paciente en base a la reactividad de éste a los SPTs. El protocolo de inmunoterapia seguirá las recomendaciones ya establecidas para  
20 extractos comerciales, de los que ya se posee amplia experiencia clínica.

Como continuación del caso hipotético de diagnóstico de un paciente [apartado 1.4], seguidamente se documenta un ejemplo de preparación de un tratamiento de inmunoterapia personalizada para dicho paciente. El paciente es considerado candidato a inmunoterapia en base a la imposibilidad de aislamiento físico de la fuente alergénica, la baja respuesta a  
25 tratamiento farmacológico y el aumento progresivo de los síntomas. El estudio de reactividad de su suero sugiere la siguiente composición de alérgenos recombinantes para el tratamiento, a partir de soluciones concentradas de cada una de las variedades:

Variedad de procedencia	Dilución inicial del stock de Ole e 1	Volumen de stock de Ole e 1
Picual	1:5	1 ml
Hojiblanca	1:7,5	0,75 ml
Lechín de Sevilla	1:7,5	0,75 ml
Alorefña	1:10	0,5 ml
Lechín de Granada	1:5	1 ml
Lucio	1:10	0,5 ml
Loaime	1:5	1 ml
Cornezuelo	1:10	0,5 ml
<b>Volumen final</b>		<b>6 ml</b>

La pauta de administración de la inmunoterapia se realiza según patrones establecidas por el Subcomité de Inmunoterapia de la EAACI, hasta llegar a dosis de mantenimiento según la tolerancia del paciente. Periódicamente se irían haciendo nuevas pruebas de diagnóstico con el fin de evaluar si se va produciendo una disminución generalizada de la reactividad en todas las variedades testadas, lo que sería indicativo de una mejora de la condición alérgica en el paciente.

## EJEMPLO 2

### CONSTRUCCIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE VARIANTES HIPOALERGÉNICAS RECOMBINANTES

La comparación de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del alérgeno Ole e 1 en las distintas variedades, junto con el análisis de la reactividad de extractos de polen de las distintas variedades frente a un pool de IgEs de pacientes alérgicos, permite diferenciar modificaciones en posiciones de la secuencia que afectan a epítotos inmunodominantes de Ole e 1 responsables de la unión a células T con una probable implicación en la reactividad de los pacientes. En este ejemplo se describe la producción de tres formas recombinantes de Ole e 1, de distintas variedades de olivo, que presuntamente poseen actividad hipoadérgica acrecentada con respecto a las formas nativas de Ole e 1. Dichas proteínas se producen mediante recombinación de las modificaciones presuntamente hipoadérgicas que han sido detectadas en las regiones 91-102 y 109-120 de la secuencia aminoacídica de Ole e 1 definida por Villaba et al., (Villaba M, Batanero E, López-Otín et al. "The amino acid

sequence of Ole e 1, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen". *Eur. J. Biochem.* 216:863-869. 1993), en tres de los clones descritos en esta memoria. Dichas regiones han sido caracterizadas como epítomos inmunodominantes de Ole e 1 responsables de la unión a células T (Cárdaba B, del Pozo V, Jurado A, Gallardo S, Cortegano I, Arrieta I, del Amo A, Tramón P, Florido F, Sastre J, Palomino P and LaHoz C, "Olive pollen allergy: searching for immunodominant T-cell epitopes on the Ole e 1 molecule" *Clin. Exper. Allergy* 28:413-422. 1998). El método de producción se describe esquemáticamente en la Figura 4.

## 2.1 Material de partida

Se utilizan como material de partida las siguientes construcciones:

- Construcción 1: SEQ ID NO: 11 (651 pb) clonada en el vector pGEM-T Easy (Promega Corporation) (3.015 pb), como se describe en el Ejemplo 1 de esta memoria. Tamaño total de la construcción: 3.666 pb
- Construcción 2: SEQ ID NO: 22 (613 pb) clonada en el vector pGEM-T Easy (Promega Corporation) (3.015 pb), como se describe en el Ejemplo 1 de esta memoria. Tamaño total de la construcción: 3.628 pb. La SEQ ID NO: 22 codifica un polipéptido (SEQ ID 48) con dos modificaciones aminoacídicas (DEIPVEGWVKPS) en la región 78-89, correspondiente a la secuencia 91-102 de la secuencia aminoacídica de Ole e 1 (NEIPTEGWVKPS) (Villaba M, Batanero E, López-Otín et al., "The amino acid sequence of Ole e 1, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen". *Eur. J. Biochem.* 216:863-869. 1993), que corresponde a un epítomo inmunodominante de Ole e 1 responsable de la unión a células T. Dichas modificaciones son potencialmente responsables de alergenicidad reducida de Ole e 1 en el polen de esta variedad.
- Construcción 3: SEQ ID NO: 16 (641 pb) clonada en el vector pGEM-T Easy (Promega Corporation) (3.015 pb), como se describe en el Ejemplo 1 de esta memoria. Tamaño total de la construcción: 3.656 pb. La SEQ ID NO: 16 codifica un polipéptido (SEQ ID 42) con una modificación aminoacídica (TVNGTTRTINPL) en la región 93-104, correspondiente a la región 109-120 de la secuencia aminoacídica de Ole e 1 (TVNGTTRTVNPL) (Villaba M, Batanero E, López-Otín et al. "The amino acid sequence of Ole e 1, the major

allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen". *Eur. J. Biochem.* 216:863-869. 1993), que corresponde a un epítipo inmunodominante de Ole e 1 responsable de la unión a células T. Dicha modificación es potencialmente responsable de alergenidad reducida de Ole e 1 en el polen de esta variedad.

5

## 2.2 Generación de la quimera hipoalergénica 1

Tras un detallado mapeo de restricción de las secuencias SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 22 se ha determinado que los enzimas de restricción Bse XI y Tas I (Fermentas) son capaces de liberar un fragmento de DNA que incluye la secuencia que codifica la región 91-102 de la secuencia aminoacídica de Ole e 1 (Villaba M, Batanero E, López-Otín et al. "The amino acid sequence of Ole e 1, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen". *Eur. J. Biochem.* 216:863-869. 1993), que corresponde a un epítipo inmunodominante de Ole e 1 responsable de la unión a células T. Dichos enzimas no poseen otras secuencias de reconocimiento en las construcciones 1 y 2. Se realiza una digestión secuencial de las construcciones 1 y 2 con los enzimas de restricción Bse XI y Tas I (Fermentas) de acuerdo a las instrucciones aportadas por el fabricante. Una alícuota de los productos de la digestión se analiza mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE (Tris-acetato/EDTA). En dichos geles, aparecen bandas de 3.586 pb (construcción 1) y 3.548 pb (construcción 2) que son escindidas y purificadas utilizando un kit específico (Prep-A-Gene, de Bio-Rad). De forma paralela, otra alícuota de los mismos productos de la digestión se analiza mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% en TAE (Tris-acetato/EDTA). En dichos geles, aparecen bandas de 80 pb (construcción 1) y 80 pb (construcción 2) que son escindidas y purificadas utilizando un kit específico (Prep-A-Gene de Bio-Rad). Se realiza una reacción de ligación entre los productos purificados de 3.586 pb de la construcción 1 y de 80 pb de la construcción 2. El producto de dicha ligación (quimera hipoalergénica 1) se utiliza para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , y las células transformadas son seleccionadas con la utilización de medio de cultivo adicionado con ampicilina mediante métodos estándar (Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

30

## 2.3 Generación de la quimera hipoalergénica 2

Tras un detallado mapeo de restricción de las secuencias SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 16 se ha determinado que los enzimas de restricción Xap I y Hinf I (Fermentas) son

capaces de liberar un fragmento de DNA que incluye la secuencia que codifica la región 109-120 de la secuencia aminoacídica de Ole e 1 (Villaba M, Batanero E, López-Otín et al. "The amino acid sequence of Ole e 1, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen". Eur. J. Biochem. 216:863-869. 1993), que corresponde a un epítipo inmunodominante de Ole e 1 responsable de la unión a células T. Dichos enzimas no poseen otras secuencias de reconocimiento en las construcciones 1 y 3. Se realiza una digestión secuencial de las construcciones 1 y 3 con los enzimas de restricción Xap I y Hinf I (Fermentas) de acuerdo a las instrucciones aportadas por el fabricante. Una alícuota de los productos de la digestión se analiza mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE (Tris-acetato/EDTA). En dichos geles, aparecen bandas de 3.634 pb (construcción 1) y 3.624 pb (construcción 3) que son escindidas y purificadas utilizando un kit específico (Prep-A-Gene, de Bio-Rad). De forma paralela, otra alícuota de los mismos productos de la digestión se analiza mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% en TAE (Tris-acetato/EDTA). En dichos geles, aparecen bandas de 32 pb (construcción 1) y 32 pb (construcción 3) que son escindidas y purificadas utilizando un kit específico (Prep-A-Gene, de Bio-Rad). Se realiza una reacción de ligación entre los productos purificados de 3.634 pb de la construcción 1 y de 32 pb de la construcción 3. El producto de dicha ligación (quimera hipoalergénica 2) se utiliza para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , y las células transformadas son seleccionadas con la utilización de medio de cultivo adicionado con ampicilina mediante métodos estándar (Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

#### 2.4 Generación de la quimera hipoalergénica 3

Tras un detallado mapeo de restricción de la secuencia predicha para la quimera hipoalergénica 1 y de la secuencia SEQ ID NO: 16 se ha determinado que los enzimas de restricción Xap I y Hinf I (Fermentas) son capaces de liberar un fragmento de DNA que incluye la secuencia que codifica la región 109-120 de la secuencia aminoacídica de Ole e 1 (Villaba M, Batanero E, López-Otín et al. "The amino acid sequence of Ole e 1, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen". Eur. J. Biochem. 216:863-869. 1993), que corresponde a un epítipo inmunodominante de Ole e 1 responsable de la unión a células T. Dichos enzimas no poseen otras secuencias de reconocimiento en la quimera hipoalergénica 1 ni en la construcción 3. Se realiza una digestión secuencial de la quimera hipoalergénica 1

y la construcción 3 con los enzimas de restricción Xap I y Hinf I (Fermentas) de acuerdo a las instrucciones aportadas por el fabricante. Una alícuota de los productos de la digestión se analiza mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE (Tris-acetato/EDTA). En dichos geles, aparecen bandas de 3.634 pb (quimera hipoalergénica 1) y 3.624 pb (construcción 3) que son escindidas y purificadas utilizando un kit específico (Prep-A-Gene, de Bio-Rad). De forma paralela, otra alícuota de los mismos productos de la digestión se analiza mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% en TAE (Tris-acetato/EDTA). En dichos geles, aparecen bandas de 32 pb (quimera hipoalergénica 1) y 32 pb (construcción 3) que son escindidas y purificadas utilizando un kit específico (Prep-A-Gene, de Bio-Rad). Se realiza una reacción de ligación entre los productos purificados de 3.634 pb de la quimera hipoalergénica 1 y de 32 pb de la construcción 3. El producto de dicha ligación (quimera hipoalergénica 3) se utiliza para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , y las células transformadas son seleccionadas con la utilización de medio de cultivo adicionado con ampicilina mediante métodos estándar (Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

## **2.5 Obtención de las proteínas recombinantes, estandarización y utilización en diagnóstico e inmunoterapia**

Los métodos de obtención de las proteínas quiméricas recombinantes, su estandarización y su utilización en métodos de diagnóstico e inmunoterapia son idénticos a los descritos en el Ejemplo 1. En ausencia de evidencias experimentales *in vivo*, cabe esperar de estas quimeras recombinantes una menor alergenicidad que las correspondientes proteínas nativas, dada la naturaleza y la acumulación de las modificaciones incluidas en ellas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un ácido nucleico que codifica un péptido que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de-olivo de una variedad definida de olivo (*Olea europea L.*), en donde dicho ácido nucleico se selecciona entre:

a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las secuencias de nucleótidos identificadas como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24; o un fragmento de dichas secuencias de nucleótidos;

b) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido cuya secuencia de aminoácidos se selecciona entre las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50, o un fragmento del mismo;

c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a) o b);

d) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida con las secuencias de nucleótidos definidas en a), b) o c);

e) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos derivable por degeneración de las secuencias de nucleótidos definidas en a), b), c), o d); y

f) un ácido nucleico que comprende una secuencia complementaria a cualquiera de las secuencias definidas en a)-e).

2. Acido nucleico según la reivindicación 1, en la que dicha variedad definida de olivo se selecciona entre las variedades denominadas Picholine, Menara, Lucio, Picual, Loaime, Hojiblanca, Arbequina y Bella de España.

5 3. Una construcción génica que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, operativamente unido a una secuencia de control de la expresión.

4. Un vector recombinante que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o una construcción génica según la reivindicación 3.

10

5. Un sistema de expresión que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, una construcción génica según la reivindicación 3 o un vector recombinante según la reivindicación 4.

15

6. Un péptido que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo (*Olea europea*), en donde dicho péptido tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

20

7. Péptido según la reivindicación 6, en el que dicha variedad definida de olivo se selecciona entre las variedades denominadas Picholine, Menara, Lucio, Picual, Loaime, Hojiblanca, Arbequina y Bella de España.

25

8. Péptido según la reivindicación 6 ó 7, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 y un fragmento de las mismas.

30

9. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende una modificación que afecta:



- (i) al menos, a una de las regiones de inmunogenicidad elevada;
- (ii) al menos, a una de las regiones definidas como epítomos inmunodominantes de Ole e 1 responsables de la unión a células T;
- (iii) al menos, a una secuencia que afecta a la integridad de los puentes disulfuro presentes en dicho péptido; y/o
- (iv) a la adición o eliminación de secuencias de N-glicosilación potencial.

10. Péptido según la reivindicación 9, en el que:

- (i) las regiones de inmunogenicidad elevada se seleccionan entre VRLQCK, LVERDH, LIERDH, WAKPSL, WVKPSL y KKEALP;
- (ii) las regiones definidas como epítomos inmunodominantes de Ole e 1 responsables de la unión a células T se seleccionan entre NEIPTEGWAKPS, DEIPTEGWAKPS, DEIPTEGWVKPS, TVNGTTRTVNPL, TVNGTTRTINPL y PLGFFKKEALPK;
- (iii) la modificación que afecta a dicha secuencia que afecta a la integridad de los puentes disulfuro es una modificación que afecta a una región codificante de una cisteína implicada en la formación de un puente disulfuro presente en dicho péptido; y
- (iv) las secuencias de N-glicosilación potencial se seleccionan entre NGT y NVT.

11. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, en el que dicho péptido es una variante hipoalergénica del mismo.

12. Un procedimiento para la producción de un péptido que comprende, al menos, un epítomo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo (*Olea europea*) según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, que comprende la expresión de la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, contenida en un sistema de expresión según la reivindicación 5, bajo condiciones que permiten la expresión de dicha secuencia de nucleótidos y la producción de dicho péptido y, si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar dicho péptido.

13. Un anticuerpo caracterizado porque es capaz de unirse a un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11.

5 14. Anticuerpo según la reivindicación 13, en el que la secuencia aminoacídica de dicho péptido comprende, o está constituida por, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 27-50, o un fragmento de las mismas que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

10 15. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, caracterizado porque es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo totalmente humano, un anticuerpo no humano, o un fragmento de los mismos que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo.

16. Un soporte sólido que comprende:

- 15 a) una pluralidad de ácidos nucleicos, en donde cada uno de dichos ácidos nucleicos está separado del resto de ácidos nucleicos y su secuencia nucleotídica codifica, al menos, un epítipo de un alérgeno de polen de olivo específico de una variedad definida de olivo; o bien
- 20 b) una pluralidad de péptidos, en donde cada uno de dichos péptidos está separado del resto de péptidos y comprende, al menos, un epítipo de un alérgeno de polen de olivo específico de una variedad definida de olivo; o bien
- 25 c) una pluralidad de anticuerpos, en donde cada uno de dichos anticuerpos está separado del resto de anticuerpos y es capaz de unirse a un péptido que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo (*Olea europea*).

17. Soporte según la reivindicación 16, en el que dichos ácidos nucleicos, péptidos o anticuerpos están inmovilizados y dispuestos en dicho soporte sólido en una disposición orientada y ordenada.

30

18. Soporte según la reivindicación 16 ó 17, que comprende, al menos, un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

19. Soporte según la reivindicación 16 ó 17, que comprende, al menos, un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11.

5 20. Soporte según la reivindicación 16 ó 17, que comprende, al menos, un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15.

21. Una composición farmacéutica que comprende, como sustancia activa, al menos, un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, o, al menos, un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15.

10

22. Composición farmacéutica según la reivindicación 21, en donde dicha composición farmacéutica es una vacuna destinada a inmunoterapia frente a la alergia al polen de olivo.

15 23. Composición farmacéutica según la reivindicación 21 ó 22, que comprende, además, un vehículo, un excipiente, un diluyente, un adyuvante, un retardante y/o un estabilizante, farmacéuticamente aceptables.

20 24. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, que comprende, además, una sustancia activa adicional.

25 25. Composición farmacéutica según la reivindicación 24, en la que dicha sustancia activa adicional comprende un agente antihistamínico, una hormona esteroidea, un antagonista de receptores de histamina, leucotrienos, alergoides y mezclas de los mismos.

26. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, en una formulación en micropartículas, nanopartículas o liposomas.

30 27. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, en una forma farmacéutica de administración sólida, en una forma farmacéutica de administración líquida, o en una forma farmacéutica de administración que comprende un sistema disperso.

28. Composición farmacéutica según la reivindicación 27, en una forma farmacéutica de administración seleccionada entre soluciones inyectables, polvos, gránulos, perlas, comprimidos, cápsulas, jarabes, emulsiones, supositorios, colirios, nebulizaciones, aerosoles, cremas, geles y formas farmacéuticas de administración sublinguales.

5

29. Empleo de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, o, de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de la alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo.

10

30. Empleo según la reivindicación 29, en el que dicha composición farmacéutica es una vacuna destinada a inmunoterapia.

31. Un reactivo para su empleo en un método *in vitro* o *in vivo* para el diagnóstico de alergia a polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto, en donde dicho reactivo comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, o un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15.

15

32. Empleo de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, o de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en la elaboración de una composición para el diagnóstico *in vivo* de la alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto.

20

33. Un método *in vitro* para (i) el diagnóstico de alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto, o para (ii) determinar la evolución del curso de la alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto, o para (iii) evaluar la eficacia de un tratamiento contra alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto, que comprende determinar el título de IgE y, opcionalmente, IgG, frente a un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11 en una muestra biológica de dicho sujeto.

25

30

34. Empleo de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11 en un método *in vitro* para (i) el diagnóstico de la alergia al polen de olivo de una variedad

definida de olivo en un sujeto, o para (ii) determinar la evolución del curso de la alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto, o para (iii) evaluar la eficacia de un tratamiento contra alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto.

5

35. Un kit para la puesta en práctica de un método según la reivindicación 33 que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11 o un soporte sólido según cualquiera de las reivindicaciones 16, 17 ó 19.

10

36. Un kit para la puesta en práctica de un método para el diagnóstico *in vivo* de la alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo en un sujeto que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, o un soporte sólido según cualquiera de las reivindicaciones 16, 17, 19 ó 20.

15

37. Empleo de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11 para la identificación *in vitro* de la reacción celular al alérgeno Ole e 1 de polen de olivo de una variedad definida de olivo, mediante la estimulación o inhibición de dicha reacción celular.

20

38. Empleo de un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para obtener productos derivados de dichos ácidos nucleicos, potencialmente útiles en investigación, diagnóstico, terapia y/o prevención de alergia al polen de olivo y/o en la caracterización de cultivares de olivo.

25

39. Empleo según la reivindicación 38, en el que dichos productos derivados de dichos ácidos nucleicos comprenden sondas DNA opcionalmente marcadas, sondas RNA opcionalmente marcadas, vacunas DNA, construcciones antisentido, construcciones hipoalérgicas o hiperalérgicas modificadas, construcciones para la sobreexpresión del alérgeno recombinante, o construcciones de “knocking out” de genes de alérgenos.

30

40. Empleo de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11 para obtener productos derivados de dichos péptidos, potencialmente útiles en investigación,

diagnóstico, terapia y/o prevención de alergia al polen de olivo y/o en la caracterización de cultivares de olivo.

5 41. Empleo según la reivindicación 40, en el que dichos productos derivados de dichos péptidos comprenden oligómeros de dichos péptidos, anticuerpos o fragmentos de los mismos que reconocen epítomos de dichos péptidos o mimotopos.

10 42. Un producto derivado de un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, potencialmente útil en investigación, diagnóstico, terapia y/o prevención de alergia al polen de olivo y/o en la caracterización de cultivares de olivo, que comprende una sonda DNA opcionalmente marcada, una sonda RNA opcionalmente marcada, una vacuna DNA, una construcción antisentido, una construcción hipoalergénica o hiperalergénica modificada, una construcción para la sobreexpresión del alérgeno recombinante, o una construcción de “knocking out” de genes de alérgenos.

15

43. Un producto derivado de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, potencialmente útil en investigación, diagnóstico, terapia y/o prevención de alergia al polen de olivo y/o en la caracterización de cultivares de olivo, que comprende un oligómero de dicho péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo que reconoce un epítomo de dicho péptido o un mimotopo.

20

44. Un método *in vitro* para identificar el alérgeno del polen de la variedad de olivo (*Olea europea*) causante de alergia en un sujeto o para identificar la variedad de olivo (*Olea europea*) causante de alergia en un sujeto que comprende:

25

a) poner en contacto, por separado, una muestra biológica procedente de un sujeto con cada uno de los péptidos que constituyen una pluralidad de péptidos, en donde cada uno de dichos péptidos presente en dicha pluralidad de péptidos está separado del resto de péptidos y comprende, al menos, un epítomo de un alérgeno de polen de olivo específico de una variedad definida de olivo; y

30

b) determinar el título de IgE y, opcionalmente, de IgG, frente a dichos péptidos en dicha muestra biológica.

45. Método según la reivindicación 44, en el que cada uno de dichos péptidos presentes en dicha pluralidad de péptidos comprende, al menos, un epítipo de un alérgeno de polen de olivo específico de una variedad definida de olivo, en donde dicho alérgeno de polen de olivo se selecciona entre los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 3, Ole e 4, Ole e 5, Ole e 6, Ole e 7, Ole e 8, Ole e 9, Ole e 10 y sus mezclas.
46. Método según la reivindicación 44, en el que dicha pluralidad de péptidos contiene, al menos, un péptido que comprende, al menos, un epítipo del alérgeno Ole e 1 de polen de olivo específico de una variedad definida de olivo.
47. Método según la reivindicación 46, en el que dicha variedad definida de olivo se selecciona entre las variedades de olivo denominadas Picholine, Menara, Lucio, Picual, Loaime, Hojiblanca, Arbequina y Bella de España.
48. Método según la reivindicación 46 ó 47, en el que dicha pluralidad de péptidos comprende, al menos, un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11.
49. Método según la reivindicación 48, en el que dicho péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias identificadas como SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 y un fragmento de las mismas.
50. Método según cualquiera de las reivindicaciones 44 a 49 que comprende, antes de la etapa a), la etapa de poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con una mezcla de alérgenos de polen de olivo.
51. Método según la reivindicación 50, en el que dicha mezcla de alérgenos de polen de olivo comprende un extracto proteico de polen de olivo de cualquier variedad de olivo.

52. Método según la reivindicación 50, en el que dicha mezcla de alérgenos de polen de olivo contiene dos o más péptidos comprendiendo cada uno de dichos péptidos, al menos, un epítopo de un alérgeno de polen de olivo específico de una variedad definida de olivo.

5 53. Método según la reivindicación 52, en el que dicho alérgeno de polen de olivo se selecciona entre los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 3, Ole e 4, Ole e 5, Ole e 6, Ole e 7, Ole e 8, Ole e 9, Ole e 10 y sus mezclas.

10 54. Un método para diseñar una terapia personalizada para un sujeto que padece alergia al polen de olivo de una variedad definida de olivo que comprende:

- (i) identificar el alérgeno del polen de la variedad de olivo (*Olea europea*) o la variedad de olivo (*Olea europea*) causante de alergia en dicho sujeto; y
- (ii) preparar una composición farmacéutica que comprende el alérgeno identificado en (i) o una variante forma hipoalérgica del mismo o un anticuerpo capaz de unirse a dicho alérgeno.

15

55. Método según la reivindicación 54, en el que la identificación del alérgeno del polen de la variedad de olivo o de la variedad de olivo causante de alergia en dicho sujeto se lleva a cabo mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 44 a 53.







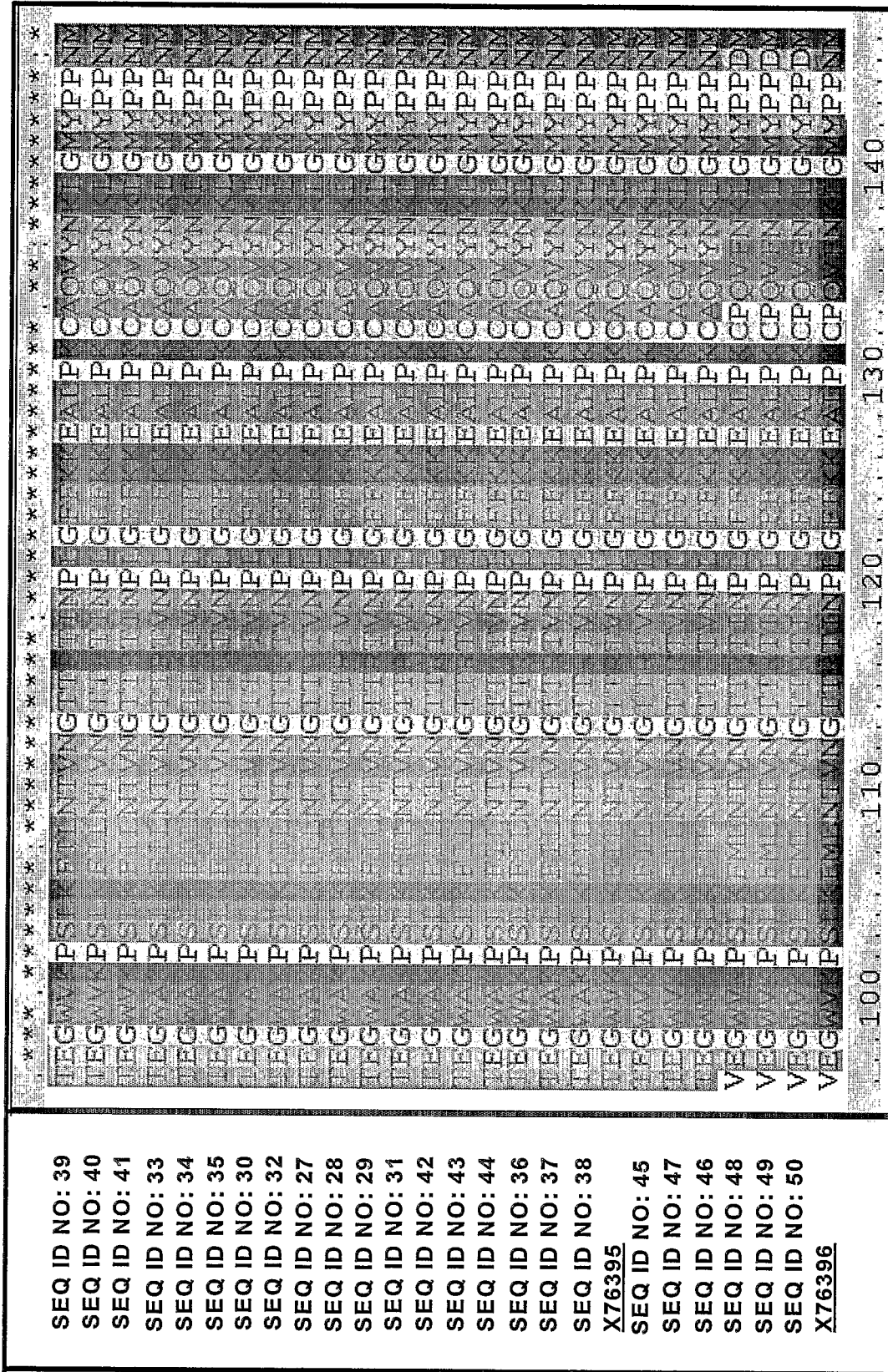
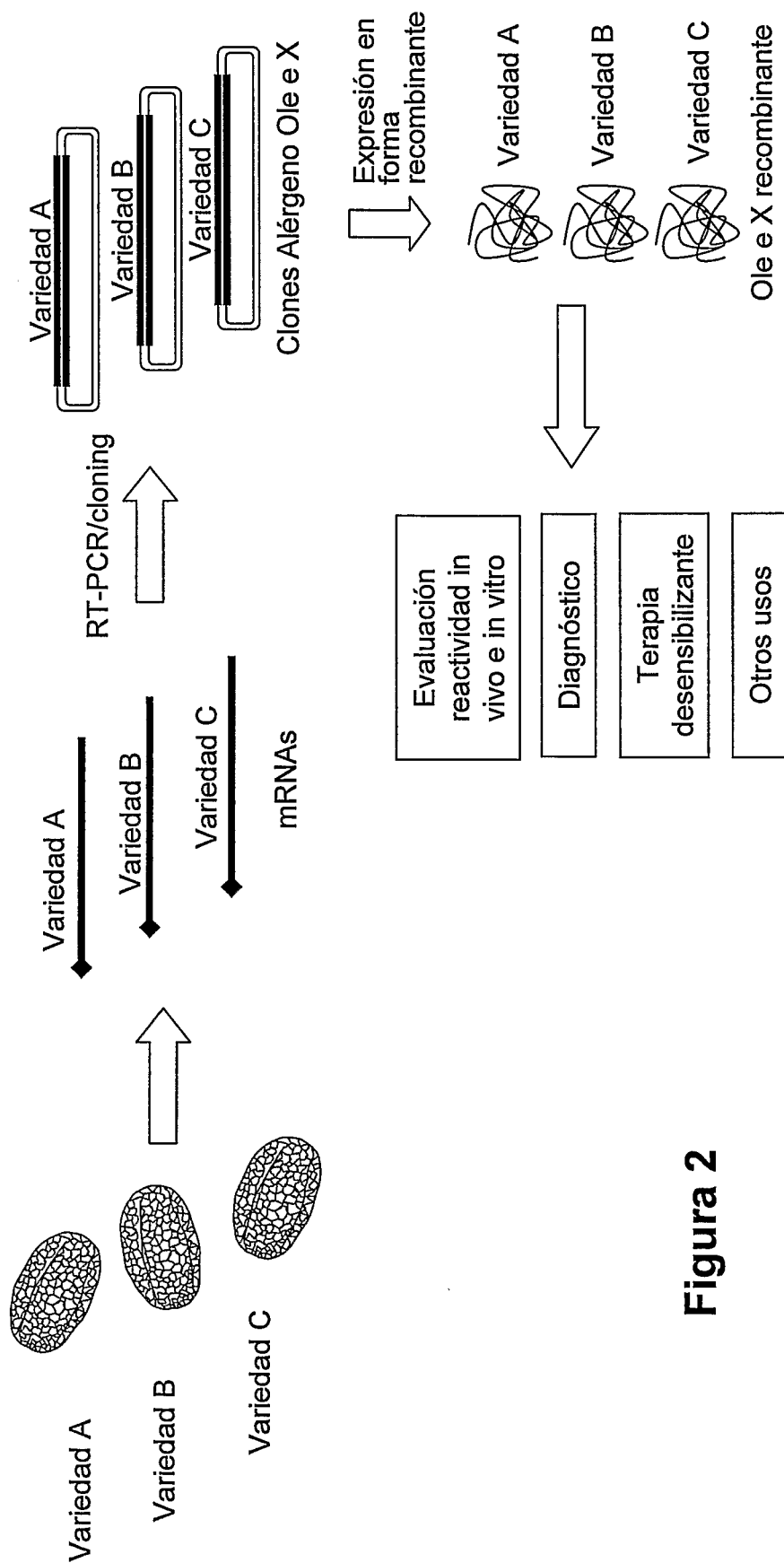


Figura 1 (cont.)



**Figura 2**

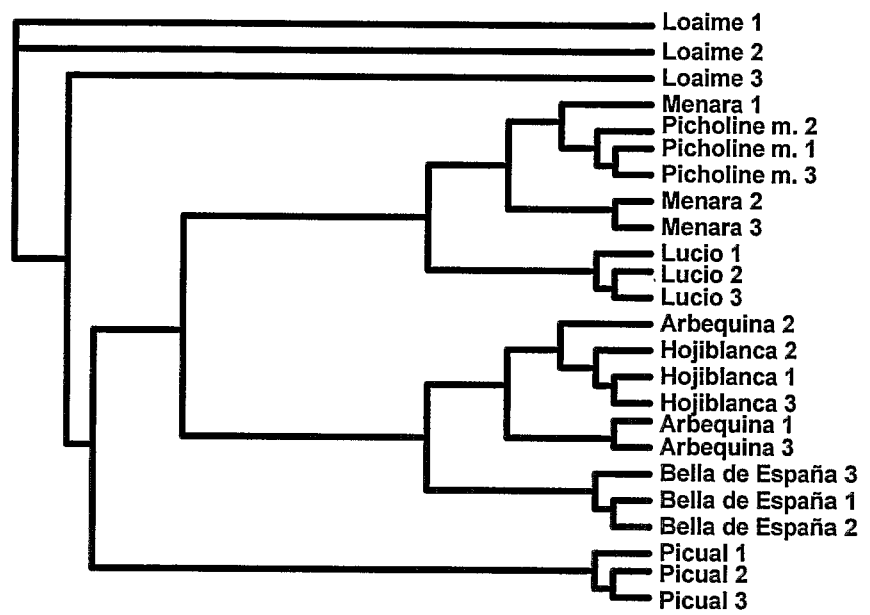


Figura 3

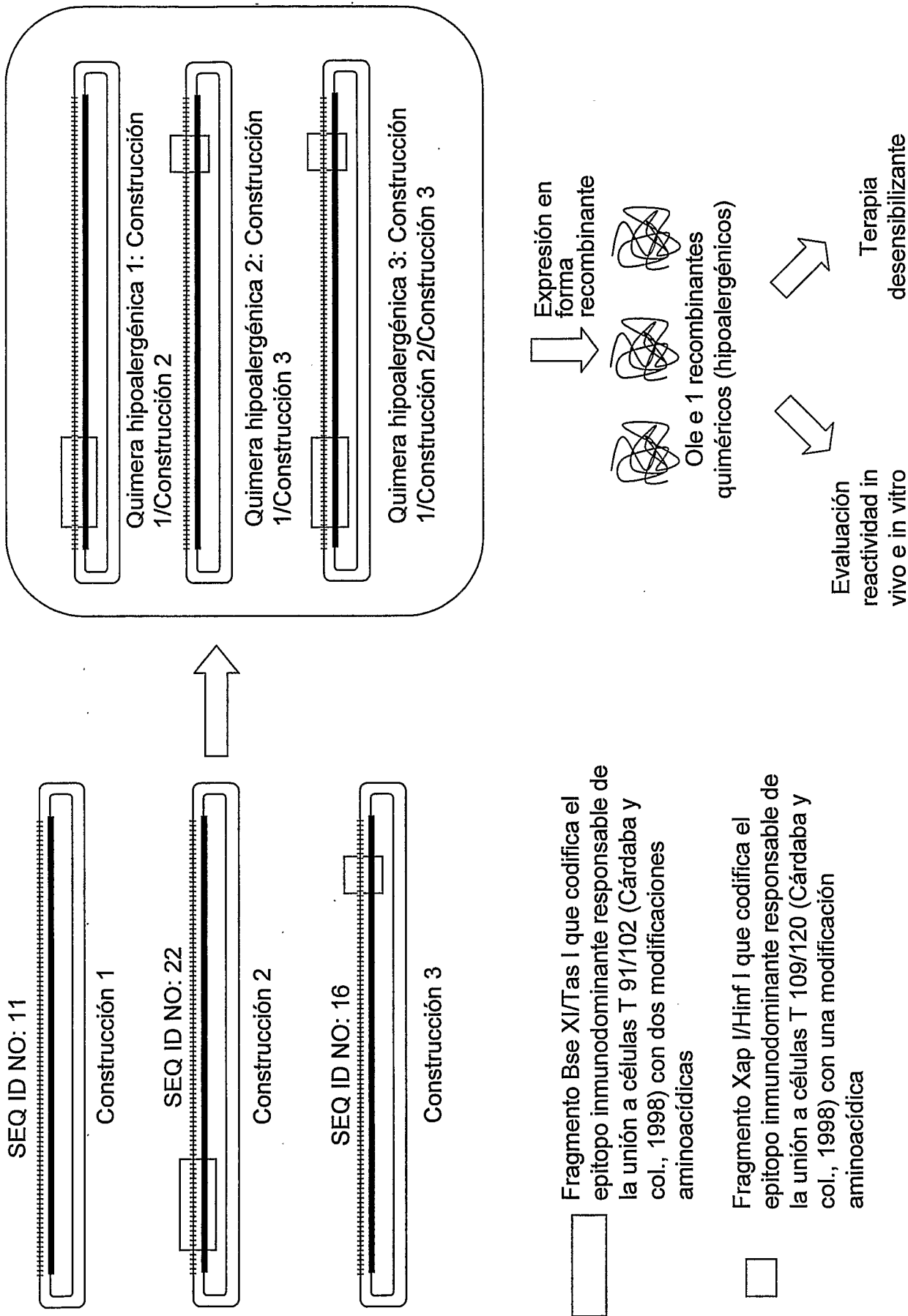


Figura 4

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas

<120> ÁCIDOS NUCLEICOS Y ALÉRGICOS DEL POLEN DE OLIVO DE VARIETADES  
DEFINIDAS DE OLIVO Y APLICACIONES

<160> 52

<210> 1

<211> 648

<212> ADN complementario (ADNc)

<213> *Olea europea* L. Subsp. *Picholine marocaine*

<223> alergeno Ole e 1 clon 1

<400> 1

attcggacag	tttattgtga	tacatgtcgt	gctggattca	ttactgaact	tagcgagttc	60
atcccagggtg	ccagtgtacg	cctccaatgc	aaagacaagg	agaatggaga	cataacattt	120
actgaggtgg	gttacacgag	agcgggaagg	ctctatagca	tgctcgtgga	acgtgatcac	180
aagaatgagt	tctgtgaaat	cacactgatt	tcaagtggca	gaaaagattg	taatgaaatt	240
cctactgaag	gatgggcaaa	accatcatta	aaatttatac	tcaatacagt	aaatggcacc	300
acacgcaccg	taaatoctct	tggattcttc	aagaaagaag	ctcttccaaa	atgtgcacaa	360
gtctataata	agctgggtat	gtatcccca	aatatgtgaa	gatcaaaaag	aagacgttaa	420
tttattacaa	gaaccttagt	ttcctcactt	tattgtagct	gaataattat	gtggcctttt	480
tgtcaaggct	ttttatggcc	caactaaaat	gccttggaaa	ataaaataat	ttgctttgta	540
atctctgtaa	gttcccaaga	attaccttgt	ggaaagacaa	taaagtttgt	cgattttgag	600
ataaacaata	aatgcgttat	attatgattt	tctcccaaaa	aaaaaaaa		648

<210> 2

<211> 650

<212> ADNc

<213> *Olea europea* L. Subsp. *Picholine marocaine*

<223> alergeno Ole e 1 clon 2

<400> 2

attcggacag	tttattgtga	tacatgtcgt	gctggattca	ttactgaact	tagcgagttc	60
atcccagggtg	ccagtgtacg	cctccaatgc	aaagacaagg	agaatggaga	cataacattt	120
actgaggtgg	gttacacgag	agcgggaagg	ctctatagca	tgctcgtgga	acgtgatcac	180
aagaatgagt	tctgtgaaat	cacactgatt	tcaagtggca	gaaaagattg	taatgaaatt	240
cctactgaag	gatgggcaaa	accatcatta	aaatttatac	tcaatacagt	aaatggcacc	300
acacgcaccg	taaatoctct	tggattcttc	aagaaagaag	ctcttccaaa	atgtgcacaa	360
gtctataata	agctgggtat	gtatcccca	aatatgtgaa	gatcaaaaag	aagacgttaa	420
tttattacaa	gaaccttagt	ttcctcactt	tattgtagct	gaataattat	gtggcctttt	480
tgtcaaggct	ttttatggcc	caattaaaat	gccttggaaa	ataaaataat	ttgctttgga	540
atctctgtaa	gttcccaaga	attaccttgt	ggaaagacaa	taaagtttgt	cgattttgag	600
ataaacaata	aatgcgttat	attatgattt	tctcccaaaa	aaaaaaaa		650

<210> 3

<211> 648

<212> ADNc

<213> *Olea europea* L. Subsp. *Picholine marocaine*

<223> alergeno Ole e 1 clon 3

<400> 3

attcggacag	tttattgtga	tacatgtcgt	gctggattca	ttactgaact	tagcgagttc	60
atcccagggtg	ccagtgtacg	cctccaatgc	aaagacaagg	agaatggaga	cataacattt	120

actgaggtgg	gttacacgag	agcggaagga	ctctatagca	tgctcgtgga	acgtgatcac	180
aagaatgagt	tctgtgaaat	cacactgatt	tcaagtggca	gaaaagattg	taatgaaatt	240
cctactgaag	gatgggcaaa	accatcatta	aaatztatc	tcaatacagt	aatggcacc	300
acacgcaccg	taaatcctct	tggtattcttc	aagaaagaag	ctcttccaaa	atgtgcacaa	360
gtctataata	agctgggtat	gtatccccc	aatatgtgaa	gatcaaaaag	aagacgttaa	420
tttattacaa	gaaccttagt	ttcctcactt	tattgtagct	gaataattat	gtggcctatt	480
tgtcaaggct	ttttatggcc	caactaaaat	gccttggaaa	ataaaaataat	ttgctttgta	540
atctctgtaa	gttcccaaga	attaccttgt	ggaaagacaa	taaagtttgt	cgattttgag	600
ataaacaata	aatgcgttat	attatgattt	tctccccaaa	aaaaaaaa		648

<210> 4

<211> 652

<212> ADNc

<213> *Olea europea* L. Subsp. Menara

<223> alergeno Ole e 1 clon 1

<400> 4

atcaggacag	ttcattgtga	tacatgtcgt	gctggattca	ttactgaact	tagcgagttc	60
atcccagggtg	ccagtgtacg	cctccaatgc	aaagacaagg	agaatggaga	cataacattt	120
actgaggtgg	gttacacgag	agcggaagga	ctctatagca	tgctcgtgga	acgtgatcac	180
aagaatgagt	tctgtgaaat	cacactgatt	tcaagtggca	gaaaagattg	taatgaaatt	240
cctactgaag	gatgggcaaa	accatcattg	aaatztatc	tcaatacagt	aatggcacc	300
acacgcaccg	taaatcctct	tggtattcttc	aagaaagaag	ctcttccaaa	atgtgcacaa	360
gtctataata	agctgggtat	gtatccccc	aatatgtgaa	gatcaaaaag	aagacgttaa	420
tttattacaa	gaaccttagt	ttcctcactt	tattgtagct	gaataattat	gtggcctttt	480
tgtcaaggct	ttttatggcc	caactaaaat	gccttggaaat	ataaaaaaat	tttgctttgg	540
aatttctgta	agttcccaaa	aattaccttg	tggaaagaca	ataaagtttg	tcgattatga	600
gataaacaat	aatgcgttta	tattatgatt	ttctccccaa	aaaaaaaaaa	aa	652

<210> 5

<211> 651

<212> ADNc

<213> *Olea europea* L. Subsp. Menara

<223> alergeno Ole e 1 clon 2

<400> 5

atcaggacag	tttactgtga	tacatgtcgt	gctggattca	ttactgaact	tagcgagttc	60
atcccagggtg	ccagtgtacg	cctccaatgc	aaagacaagg	agaatggaga	cataacattt	120
actgaggtgg	gttacacgag	agcggaagga	ctctatagca	tgctcgtgga	acgtgatcac	180
aagaatgagt	tctgtgaaat	cacactgatt	tcaagtggca	gaaaagattg	taatgaaatt	240
cctactgaag	gatgggcaaa	accatcattg	aaatztatc	tcaatacagt	aatggcacc	300
acacgcaccg	taaatcctct	tggtattcttc	aagaaagaag	ctcttccaaa	atgtgcacaa	360
gtctataata	agctgggtat	gtatccccc	aatatgtgaa	gatcaaaaag	aagacgttaa	420
tttattacaa	gaaccttagt	ttcctcactt	tattgtagct	gaataattat	gtggcctttt	480
tgtcaaggct	ttttatggcc	caactaaaat	gccttggaaat	ataaaaaaat	tttgctttgg	540
aatttctgta	agttcccaaa	aattaccttg	tggaaagaca	ataaagtttg	tcgattattg	600
agataaacia	taaatgcatt	atattatgat	ttccccccc	aaaaaaaaaa	a	651

<210> 6

<211> 650

<212> ADNc

<213> *Olea europea* L. Subsp. Menara

<223> alergeno Ole e 1 clon 3

<400> 6



atcaggacag	tttactgtga	tacatgtcgt	gctggattca	ttactgaact	tagcgagttc	60
atcccagggtg	ccagtgtacg	cctccaatgc	aaagacaagg	agaatggaga	cataacattt	120
actgagggtg	gttacacgag	agcggaagga	ctctatagca	tgctcgtgga	acgtgatcac	180
aagaatgagt	tctgtgaaat	cacactgatt	tcaagtggca	gaaaagattg	taatgaaatt	240
cctactgaag	gatgggcaaa	accatcattg	aaatttatac	tcaatacagt	aatggcacc	300
acacgcaccg	taaatecctct	tggattcttc	aagaaagaag	ctcttccaaa	atgtgcacaa	360
gtctataata	agctgggtat	gtatcccca	aatatgtgaa	gatcaaaaag	aagacgttaa	420
tttattacaa	gaaccttagt	ttcctcactt	tattgtagct	gaataattat	gtggcctttt	480
tgtcaaggct	ttttatggcc	caactaaaat	gccttggaa	ataaaaaaat	tttcttttg	540
aatttctgta	agttcccaaa	aattaccttg	tggaaagaca	ataaagtttg	tcgattattg	600
agataaacia	taaatgcatt	atattatgat	ttccccccc	aaaaaaaaa		650

<210> 7

<211> 653

<212> ADNc

<213> *Olea europea* L. Subsp. Lucio

<223> alergeno Ole e 1 clon 1

<400> 7

atcgggcaag	tttactgtga	cacatgccgt	gctggattca	ttactgaact	tagcgagttc	60
atcccagggtg	ccagtgtacg	cctccaatgc	aaagacaagg	agaatggaga	cataacattt	120
actgaggtag	gttacacgag	agcggaagga	ctctatagca	tgctcgtgga	acgtgatcac	180
aagaatgagt	tctgtgaaat	cacactgatt	tcaagtggca	gaaaagattg	taatgaaatt	240
cctactgaag	gatgggcaaa	accatcatta	aaatttatac	tcaatacagt	aatggcacc	300
acacgcaccg	taaatecctct	tggattcttc	aagaaagaag	ctcttccaaa	atgtgcacaa	360
gtctataata	agctgggtat	gtatcccca	aatatgtgaa	gatcaaaaag	aagacgttaa	420
tttattacaa	gaaccttagt	ttcctcactt	tattgtagct	gaataattat	gtggcctttt	480
tgtcaaggct	ttttatggcc	caattaaaag	gccttggaaa	ataaaaaaat	tttcttttg	540
aatttctgta	agttcccaaa	aattaccttg	tggaaagaca	ataaagtttg	tccgattttg	600
agataaacia	taaatgcgat	atattatgat	ttccccccc	aaaaaaaaa	aaa	653

<210> 8

<211> 652

<212> ADNc

<213> *Olea europea* L. Subsp. Lucio

<223> alergeno Ole e 1 clon 2

<400> 8

atcgggcaag	tttactgtga	cacatgccgt	gctggattca	ttactgaact	tagcgagttc	60
atcccagggtg	ccagtgtacg	cctccaatgc	aaagacaagg	agaatggaga	cataacattt	120
actgaggtag	gttacacgag	agcggaagga	ctctatagca	tgctcgtgga	acgtgatcac	180
aagaatgagt	tctgtgaaat	cacactgatt	tcaagtggca	gaaaagattg	taatgaaatt	240
cctactgaag	gatgggcaaa	accatcatta	aaatttatac	tcaatacagt	aatggcacc	300
acacgcaccg	taaatecctct	tggattcttc	aagaaagaag	ctcttccaaa	atgtgcacaa	360
gtctataata	agctgggtat	gtatcccca	aatatgtgaa	gatcaaaaag	aagacgttaa	420
tttattacaa	gaaccttagt	ttcctcactt	tattgtagct	gaataattat	gtggcctttt	480
tgtcaaggct	ttttatggcc	caattaaaag	gccttggaaa	ataaaaaaat	tttcttttg	540
aatttctgta	agttcccaaa	aattaccttg	tggaaagaca	ataaagtttg	tccgattttg	600
agataaacia	taaatgcgat	atattatgat	ttccccccc	aaaaaaaaa	aa	652

<210> 9

<211> 653

<212> ADNc

<213> *Olea europea* L. Subsp. Lucio

<223> alergeno Ole e 1 clon 3

<400> 9  
 atcgggcaag tttactgtga cacatgccgt gctggattca ttactgaact tagcgagttc 60  
 atcccagggt ccagtgtacg cctccaatgc aaagacaagg agaatggaga cataacattt 120  
 actgaggtag gttacacgag agcggaagga ctctatagca tgctcgtgga acgtgatcac 180  
 aagaatgagt tctgtgaaat cacactgatt tcaagtggca gaaaagattg taatgaaatt 240  
 cctactgaag gatgggcaaa accatcatta aaatttatac tcaatacagt aaatggcacc 300  
 acacgcaccg taaatcctct tggattcttc aagaaagaag ctcttccaaa atgtgcacaa 360  
 gtctataata agctgggtat gtatccccc aatatgtgaa gatcaaaaag aagacgttaa 420  
 tttattacaa gaaccttagt ttcctcactt tattgtagct gaataattat gtggcctttt 480  
 tgtcaaggct ttttatggcc caattaaag gccttggaaa ataaaaaat ttttctttgg 540  
 aatttctgta agttcccaaa aattaccttg tggatagaca ataaagtttg tccgattttg 600  
 agataaacia taaatgcgat atattatgat tttccccccc caaaaaaaaaaaa aaa 653

<210> 10  
 <211> 650  
 <212> ADNc  
 <213> *Olea europea* L. Subsp. Picual

<223> alergeno Ole e 1 clon 1

<400> 10  
 tctggacagt ttcctgtgac acttgtcgtg ctggattcat tactgaactt agcgagttca 60  
 tcccagggtc cagtgtacgc ctccaatgca aagacaagga gaatggagac ataacattta 120  
 ctgaggtagg ttacacaaga gcggaaggac tctatagcat gctcgtggaa cgtgatcaca 180  
 agaatgagt ttgtgaaatc aactgattt caagtggcag aaaagattgt gatgaaattc 240  
 ctactgaagg atgggcaaaa ccatcattga aatttatact caatacagta aatggcacca 300  
 cacgcaccgt aaatcctctt ggattcttca agaaagaagc tcttccaaaa tgtgcacaag 360  
 tctataataa gctgggtatg tatcccccaa atatgtgaag atcaaaaaga agacgttaat 420  
 ttattacaag aaccttactt tctcacttt attggagctg aataattatg tggccttttt 480  
 gtcaaagggt ttttatggcc aactaaaaag ccttggaaata aaaaaaaatt ttgctttgta 540  
 atttttggga agttcccaaa aattaccttg tggaaaaaca ataaagattt tcgattttga 600  
 gataaacaat aatgcaata tattttgttt ttccccccc aaaaaaaaaaaa 650

<210> 11  
 <211> 651  
 <212> ADNc  
 <213> *Olea europea* L. Subsp. Picual

<223> alergeno Ole e 1 clon 2

<400> 11  
 atcttgacag tttactgtga cacatgtcgt gctggattca ttactgaact tagcgagttc 60  
 atcccagggt ccagtgtacg cctccaatgc aaagacaagg agaatggaga cataacattt 120  
 actgaggtag gttacacaag agcggaagga ctctatagca tgctcgtgga acgtgatcac 180  
 aagaatgagt tttgtgaaat cacactgatt tcaagtggca gaaaagattg tgatgaaatt 240  
 cctactgaag gatgggcaaa accatcattg aaatttatac tcaatacagt aaatggcacc 300  
 acacgcaccg taaatcctct tggattcttc aagaaagaag ctcttccaaa atgtgcacaa 360  
 gtctataata agctgggtat gtatccccc aatatgtgaa gatcaaaaag aagacgttaa 420  
 tttattacaa gaaccttact ttcctcactt tattggagct gaataattat gtggcctttt 480  
 tgtcaaagggt ttttatggcc caactaaaa gccttggaaa aaaaaaaat tttgctttgt 540  
 aatttttggga agttcccaaa aattaccttg tggaaaaaca ataaagtttt tcgattttga 600  
 gataaacaat aatgcaata tcttttgcct ttccccccc aaaaaaaaaaaa a 651

<210> 12  
 <211> 650  
 <212> ADNc  
 <213> *Olea europea* L. Subsp. Picual

<223> alergeno Ole e 1 clon 3

<400> 12

atcttgacag	tttactgtga	cacatgtcgt	gctggattca	ttactgaact	tagcgagttc	60
atcccaggtg	ccagtgtacg	cctccaatgc	aaagacaagg	agaatggaga	cataacattt	120
actgaggtag	gttacacaag	agcgggaagga	ctctatagca	tgctcgtgga	acgtgatcac	180
aagaatgagt	tttgtgaaat	cacactgatt	tcaagtggca	gaaaagattg	tgatgaaatt	240
cctactgaag	gatgggcaaa	accatcattg	aaatttatac	tcaatacagt	aaatggcacc	300
acacgcaccg	taaatacctct	tggattcttc	aagaaagaag	ctcttccaaa	atgtgcacaa	360
gtctataata	agctgggtat	gtatccccc	aatatgtgaa	gatcaaaaag	aagacgttaa	420
tttattacaa	gaaccttact	ttcctcactt	tattggagct	gaataattat	gtggcctttt	480
tgtcaaaggt	ttttatgggc	caactaaaa	gccttggaaa	aaaaaaaaat	tttgctttgt	540
aatTTTTgga	agttcccaa	aattaccttg	tgcaaaaaca	ataaagtttt	tcgattttga	600
gataaacaat	aaatgcaata	tcttttgcct	ttcccccca	aaaaaaaaa		650

<210> 13

<211> 651

<212> ADNc

<213> *Olea europea* L. Subsp. Loaime

<223> alergeno Ole e 1 clon 1

<400> 13

atctggacag	tttactgtga	cacatgtcgt	gctggattca	ttactgaact	tagcgagttc	60
atcccaggtg	ccagtgtacg	cctccaatgc	aaagacaagg	agaatggaga	cataacattt	120
actgaggtag	gttacacgag	agcgggaagga	ctctatagca	tgctcgtgga	acgtgatcac	180
aagaatgagt	tttgtgaaat	cacactgatt	tcaagtggca	gaaaagattg	tgatgaaatt	240
cctactgaag	gatgggcaaa	accatcattg	aaatttatac	tcaatacagt	aaatggcacc	300
acacgcaccg	taaatacctct	tggattcttc	aagaaagaag	ctcttccaaa	atgtgcacaa	360
gtctataata	agctgggtat	gtatccccc	aatatgtgaa	gatcaaaaag	aagacgttaa	420
tttattacaa	gaaccttact	ttcctcactt	tattgtagct	gaataattat	gtggcctttt	480
tgtcaaaggt	ttttatgggc	caactaaaa	gccttggaaa	aaaaaaaaat	tttgctttgt	540
aatTTTTgga	agttcccaa	aattaccttg	tggaaaaaca	ataaagtttt	tcgattttga	600
gataaacaat	aaatgcaata	tattttgatt	ttcccccca	aaaaaaaaa	a	651

<210> 14

<211> 652

<212> ADNc

<213> *Olea europea* L. Subsp. Loaime

<223> alergeno Ole e 1 clon 2

<400> 14

atctggacag	tttactgtga	cacatgtcgt	gctggattca	ttactgaact	tagcgagttc	60
atcccaggtg	ccagtgtacg	cctccaatgc	aaagacaagg	agaatggaga	cataacattt	120
actgaggtag	gttacacgag	agcgggaagga	ctctatagca	tgctcgtgga	acgtgatcac	180
aagaatgagt	tttgtgaaat	cacactgatt	tcaagtggca	gaaaagattg	tgatgaaatt	240
cctactgaag	gatgggcaaa	accatcattg	aaatttatac	tcaatacagt	aaatggcacc	300
acacgcaccg	taaatacctct	tggattcttc	aagaaagaag	ctcttccaaa	atgtgcacaa	360
gtctataata	agctgggtat	gtatccccc	aatatgtgaa	gatcaaaaag	aagacgttaa	420
tttattacaa	gaaccttact	ttcctcactt	tattgtagct	gaataattat	gtggcctttt	480
tgtcaaaggt	ttttatgggc	caactaaaa	gccttggaaa	aaaaaaaaat	tttgctttgt	540
aatTTTTgga	agttcccaa	aattaccttg	tggaaaaaca	ataaagattt	tcgattttga	600
gataaacaat	aaatgcaata	tattttgatt	ttcccccca	aaaaaaaaa	aa	652

<210> 15

<211> 653

<212> ADNc  
 <213> *Olea europea* L. Subsp. Loaime

<223> alergeno Ole e 1 clon 3

<400> 15

atctggacag	tttactgtga	cacatgtcgt	gctggattca	ttactgaact	tagcgagttc	60
atcccaggtg	ccagtgtacg	cctccaatgc	aaagacaagg	agaatggaga	cataacattt	120
actgaggtag	gttacacgag	agcgggaagga	ctctatagca	tgctcgtgga	acgtgatcac	180
agaatgag	tttgtgaaat	cacactgatt	tcaagtggca	gaaaagattg	tgatgaaatt	240
cctactgaag	gatgggcaaa	accatcattg	aaatttatac	tcaatacagt	aaatggcacc	300
acacgcacog	taaatcctct	tggattcttc	aagaaagaag	ctcttccaaa	atgtgcacaa	360
gtctataata	agctgggtat	gtatccccc	aatatgtgaa	gatcaaaaag	aagacgtaa	420
tttattacaa	gaaccttact	ttcctcactt	tattgtagct	gaataattat	gtggcctttt	480
tgtaaaaggt	ttttatgggc	caactaaaa	gccttggaaa	aaaaaaaaat	tttgctttgt	540
aatttttgg	agttcccaa	aattaccttg	tggaaaaaca	ataaagattt	tcgattttga	600
gataaacaat	aaatgcaata	tattttgatt	ttcccccca	aaaaaaaaaa	aaa	653

<210> 16  
 <211> 641  
 <212> ADNc  
 <213> *Olea europea* L. Subsp. Hojiblanca

<223> alergeno Ole e 1 clon 1

<400> 16

acagttattg	tgacacatgt	cgtgctggat	tcattactga	acttagcgag	ttcatcccag	60
gtgccggtgt	acgcctccaa	tgcaaagacg	gggagaatgg	aaacataaca	tttactgagg	120
taggttacac	gagagcagaa	ggactctata	gcatgctcgt	ggaacgtgat	cacaagaatg	180
agttttgtga	aatcacactg	atttcaagtg	gcagaaaaga	ttgtgatgaa	attcctactg	240
aaggatgggt	aaaaccatca	ttgaaattta	tactcaacac	agtaaattggc	accacacgca	300
ccataaatcc	tcttggattc	ttcaagaaag	aagctcttcc	aaaatgtgca	caagtctata	360
ataagctggg	tatgtatccc	ccaaatatgt	gaagatcaaa	aagaagacgt	taatttatta	420
caagaacctt	actttcctca	ctttattgta	gttgaataat	tatgtggcct	ttttgtcaaa	480
ggtttttatg	ggccaaataa	aatgccttgg	ccccaaaaat	aattttgctt	tggaaattat	540
gtaagggtccc	caaaattacc	ttgtgtaaag	aaaataaaga	ttgtcgatta	tgagataaac	600
aaaaaatgca	aaatattttg	gtttttccaa	caaaaaaaaa	a		641

<210> 17  
 <211> 641  
 <212> ADNc  
 <213> *Olea europea* L. Subsp. Hojiblanca

<223> alergeno Ole e 1 clon 2

<400> 17

acagttactg	tgacacatgt	cgtgctggat	tcattactga	acttagcgag	ttcatcccag	60
gtgccggtgt	acgcctccaa	tgcaaagacg	gggagaatgg	aaacataaca	tttactgagg	120
taggttacac	gagagcagaa	ggactctata	gcatgctcgt	ggaacgtgat	cacaagaatg	180
agttttgtga	aatcacactg	atttcaagtg	gcagaaaaga	ttgtgatgaa	attcctactg	240
aaggatgggt	aaaaccatca	ttgaaattta	tactcaacac	agtaaattggc	accacacgca	300
ccataaatcc	tcttggattc	ttcaagaaag	aagctcttcc	aaaatgtgca	caagtctata	360
ataagctggg	tatgtatccc	ccaaatatgt	gaagatcaaa	aagaagacgt	taatttatta	420
caagaacctt	actttcctca	ctttattgta	attgaataat	tatgtggcct	ttttgtcaaa	480
ggtttttatg	ggccaaataa	aatgccttgg	ccccaaaaat	aattttgctt	tggaaattat	540
gtaagggtccc	caaaattacc	ttgtgtaaag	acaataaaga	ttgtcgata	tgagataaac	600
aaaaaatgca	aaatattttg	gtttctccaa	caaaaaaaaa	a		641

<210> 18  
 <211> 642  
 <212> ADNc  
 <213> *Olea europea* L. Subsp. Hojiblanca

<223> alergeno Ole e 1 clon 3

<400> 18  
 acagttattg tgacacatgt cgtgctggat tcattactga acttagcgag ttcattcccag 60  
 gtgccgggtg acgcctccaa tgcaaagacg gggagaatgg aaacataaca tttactgagg 120  
 taggttacac gagagcagaa ggactctata gcatgctcgt ggaacgtgat cacaagaatg 180  
 agttttgtga aatcacactg atttcaagtg gcagaaaaga ttgtgatgaa attcctactg 240  
 aaggatgggt aaaacatca ttgaaattta tactcaacac agtaaattggc accacacgca 300  
 ccataaatcc tcttgattc ttcaagaaag aagctcttcc aaaatgtgca caagtctata 360  
 ataagctggg tatgtatccc ccaaattatg gaagatcaaa aagaagacgt taatttatta 420  
 caagaacctt actttcctca ctttattgta gttgaaaaat tatgtggcct ttttgtcaaa 480  
 ggtttttatg ggccaaataa aatgccttgg cccaaaaaat aattttgctt tggaaattat 540  
 gtaaggtccc caaaattacc ttgtgtaaag aaaataaagt ttgtcgatta tgagataaac 600  
 aaaaaatgca aatatatttg gtttttccaa caaaaaaaaa aa 642

<210> 19  
 <211> 653  
 <212> ADNc  
 <213> *Olea europea* L. Subsp. Arbequina

<223> alergeno Ole e 1 clon 1

<400> 19  
 atcaggacag ttaccgagac acatgtcgtg ctggattcat tactgaactt agcgagttca 60  
 tcccagggtg cagtgtacgc ctccaatgca aagacagga gaatggagac ataacattta 120  
 ctgaggtagg ttacacgaga gcagaaggac tctatagcat gctcgtggaa cgtgatcaca 180  
 agaatgagtt ttgtgaaatc aactgattt caagtggcag aaaagattgt gatgaaattc 240  
 ctactgaagg atgggtaaaa ccatcattga aatttatact caacacagta aatggcacca 300  
 cacgcaccgt aaatcctctt ggattcttca agaaagaagc tcttccaaaa tgtgcacaag 360  
 tctataataa gctgggtatg tatcccccaa atatgtgaag atcaaaaaga agacgttaat 420  
 ttattacaag aaccttagtt tctcacttt attgtagctg aataattatg tggccttttt 480  
 gtcaaaggtt tttatgggcc aactaaaatg ccttgacca aaaaataatt ttgcttttga 540  
 atttctgtaa gttccccaaa attaccttgt ggaaagacaa taaagtttgt cgattatgag 600  
 ataaacaata aatgcaatat attatgattt tccccccaaa aaaaaaaaaa aaa 653

<210> 20  
 <211> 651  
 <212> ADNc  
 <213> *Olea europea* L. Subsp. Arbequina

<223> alergeno Ole e 1 clon 2

<400> 20  
 atcaggcagt ttactgtgac acatgtcgtg ctggattcat tactgaactt agcgagttca 60  
 tcccagggtg cagtgtacgc ctccaatgca aagacagga gaatggagac ataacattta 120  
 ctgaggtagg ttacacgaga gcagaaggac tctatagcat gctcgtggaa cgtgatcaca 180  
 agaatgagtt ttgtgaaatc aactgattt caagtggcag aaaagattgt gatgaaattc 240  
 ctactgaagg atgggtaaaa ccatcattga aatttatact caacacagta aatggcacca 300  
 cacgcaccgt aaatcctctt ggattcttca agaaagaagc tcttccaaaa tgtgcacaag 360  
 tctataataa gctgggtatg tatcccccaa atatgtgaag atcaaaaaga agacgttaat 420  
 ttattacaag aaccttactt tctcacttt attgtagctg aataattatg tggccttttt 480  
 gtcaaaggtt tttatgggcc aactaaactg ccttgacca aaaaataatt ttgcttttga 540  
 atttctgtaa gttccccaaa attaccttgt ggaaagacaa taaagattgt cgattatgga 600  
 gataaacaat aatgcaaaa tatttttggt tcccccccaa aaaaaaaaaa a 651

<210> 21  
 <211> 651  
 <212> ADNc  
 <213> *Olea europea* L. Subsp. Arbequina

<223> alergeno Ole e 1 clon 3

<400> 21  
 atcaggacag ttaccgagac acatgtcgtg ctggattcat tactgaactt agcgagttca 60  
 tcccaggtgc cagtgtacgc ctccaatgca aagacagggga gaatggagac ataacattta 120  
 ctgaggtag ttacacgaga gcagaaggac tctatagcat gctcgtggaa cgtgatcaca 180  
 agaatgagtt ttgtgaaatc aactgattt caagtggcag aaaagattgt gatgaaattc 240  
 ctactgaagg atgggtaaaa ccatcattga aatttatact caacacagta aatggcaoca 300  
 cacgcaccgt aaatcctctt ggattcttca agaaagaagc tcttccaaaa tgtgcacaag 360  
 tctataataa gctgggtatg tatcccccaa atatgtgaag atccaaaaga agacgttaat 420  
 ttattacaag aaccttagtt tctcactttt attgtagctg aataattatg tggccttttt 480  
 gtcaaaggtt tttatgggcc aactaaaatg ccttggacca aaaaataatt ttgcttttga 540  
 atttctgtaa gttccccaaa attaccttgt ggaaagacaa taaagtttat cgattatgag 600  
 ataaacaata aatgcaatat attatgattt tcccccaaaa aaaaaaaaaa a 651

<210> 22  
 <211> 613  
 <212> ADNc  
 <213> *Olea europea* L. Subsp. Bella de España

<223> alergeno Ole e 1 clon 1

<400> 22  
 atcaggacag tttcccagga cacatgttgt gcccgattca ttactgaact tagcgagttc 60  
 atcccaggtg ccggtgtacg cctccagtcg aaagacgggg agaatggaaa tgtaacattt 120  
 actgaggtag gttacacaag agcagaagga ctctatagca tgctcattga acgcatcac 180  
 aagaatgagt tttgcgaaat cacgctgctt tcaagtagca gaaaagattg tgatgaaatc 240  
 cctggtgaag gatgggtaaa accatcattg aaatttatgc tcaacacggt aaatggtacc 300  
 acacgcacca taaatcctct tggattcttc aagaaagaag ctcttccaaa atgtccacaa 360  
 gtctttaata agctgggtat gtatccccca gatatgtgaa gatcaaaaag aaaatgttaa 420  
 ttgaataatt atgcgcgcct ttttgccaag ggttttgatg gcctaattaa agggccttgt 480  
 agtaaaaaaa tatttttgctt tgaaatttct ttaagttccc aaaaattttc ttgtggaagg 540  
 acaacaaaaag ttgtacatta ttagatcaac cgtaaatgaa atattttattg tcgtatacga 600  
 caaaaaaaaaa aaa 613

<210> 23  
 <211> 614  
 <212> ADNc  
 <213> *Olea europea* L. Subsp. Bella de España

<223> alergeno Ole e 1 clon 2

<400> 23  
 atcaggacag ttttccgtgt tacctgtcgt gctcgattca ttactgaact tagcgagttc 60  
 atcccaggtg ccggtgtacg cctccagtcg aaagacgggg agaatggaaa tgtaacattt 120  
 actgaggtag gttacacaag agcagaagga ctctatagca tgctcattga acgcatcac 180  
 aagaatgagt tttgcgaaat cacgctgctt tcaagtagca gaaaagattg tgatgaaatc 240  
 cctggtgaag gatgggtaaa accatcattg aaatttatgc tcaacacggt aaatggtacc 300  
 acacgcacca taaatcctct tggattcttc aagaaagaag ctcttccaaa atgtccacaa 360  
 gtctttaata agctgggtat gtatccccca gatatgtgaa gatcaaaaag aaaatgttaa 420  
 ttgaataatt atgcgcgcct ttttgccaag ggttttgatg gcctaattaa agggccttgt 480  
 agtaaaaaaa tatttttgctt tgaaatttct ttaagttccc aaaaattttc ttgtggaagg 540

acaacaaaag ttgtacatta ttagatcaac cgtaaataaa atattttattg tcgtatacga 600  
caaaaaaaaaaaaa aaaa 614

<210> 24  
<211> 613  
<212> ADNc  
<213> *Olea europea* L. Subsp. Bella de España

<223> alergeno Ole e 1 clon 3

<400> 24  
atcaggacag ttactcggga cactgtcgtg ctcgattcat tactgaactt agcgagttca 60  
tcccagggtgc cgggtgtacgc ctccagtgca aagacgggga gaatggaaat gtaacattta 120  
ctgaggtagg ttacacaaga gcagaaggac tctatagcat gctcattgaa cgcgatcaca 180  
agaatgagtt ttgcgaaatc acgctgcttt caagtagcag aaaagattgt gatgaaatcc 240  
ctggtgaaag atgggtaaaa ccatcattga aatttatgct caacacggta aatggtagca 300  
cacgcaccat aaatcctctt ggattcttca agaaagaagc tcttccaaaa tgtccacaag 360  
tctttaataa gctgggtatg tatccccag atatgtgaag atcaaaaaga aaatgttaat 420  
tgaataatta tgcgcgcctt tttgccaagg gttttgatgg cctaatttaa gggccttgta 480  
gtaaaaaaat attttgcttt gaaatttctt taagttccca aaaattttct tgtggaagga 540  
caacaaaagt tgtacattat tagatcaaca gtaaataaaa tattttattgt cgtatatgac 600  
aaaaaaaaaaaa aaa 613

<210> 25  
<211> 404  
<212> ADN genómico  
<213> *Olea europea* L. Subsp. Picual

<223> alergeno Ole e 1 clon 1

<400> 25  
tcggacagtt actgtgacac atgccgtgct ggattcttac tgaacttagc gagttcatcc 60  
caggtgccag tttacgcctc caatgcaaag acaaggagaa tggagacgta acatttactg 120  
aggtaggtta cacgagagca gaaggactct acagcatgct cgtggaacgt gatcacaaga 180  
atgagttctg tgaatcaca ctgatttcaa gtggcagaaa agattgtaat gaaattccta 240  
ctgaaggatg ggtaaaacca tcattaaaaat ttatactcaa cacagtaaat ggcaccacac 300  
gcaccgtaaa tcctcttgga tttttcaaga aagaagctct tccaaaatgt gcacaagtct 360  
ataataagtt gggaatgtac ccgccaacat ggaatgtgac gatc 404

<210> 26  
<211> 405  
<212> ADN genómico  
<213> *Olea europea* L. Subsp. *sylvestris*

<223> alergeno Ole e 1 clon 1

<400> 26  
atcggacggt taccggatac tgccgtgctg gattcattac tgaacttagc gagttcatcc 60  
caggtgccag tttacgcctc caatgcaaag acaaggagaa tggagacgta acatttactg 120  
aggtaggtta cacgagagca gaaggactct acagcatgct cgtggaacgt gatcacaaga 180  
atgagttctg tgaatcaca ctgatttcaa gtggcagaaa agattgtaat gaaattccta 240  
ctgaaggatg ggtaaaacca tcattaaaaat ttatactcaa cacagtaaat ggcaccacac 300  
gcaccgtaaa tcctcttgga tttttcaaga aagaagctct tccaaaatgt gcacaagtct 360  
ataataagtt gggaatgtac ccgccaacc atggaatgtc acgat 405

<210> 27  
<211> 132

&lt;212&gt; PRT

<213> *Olea euroapea* L. Subsp. *Picholine marocaine*

&lt;223&gt; alergeno Ole e 1 clon 1

&lt;400&gt; 27

Ile	Arg	Thr	Val	Tyr	Cys	Asp	Thr	Cys	Arg	Ala	Gly	Phe	Ile	Thr	Glu
1				5					10					15	

Leu	Ser	Glu	Phe	Ile	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Arg	Leu	Gln	Cys	Lys	Asp
			20					25					30		

Lys	Glu	Asn	Gly	Asp	Ile	Thr	Phe	Thr	Glu	Val	Gly	Tyr	Thr	Arg	Ala
		35					40					45			

Glu	Gly	Leu	Tyr	Ser	Met	Leu	Val	Glu	Arg	Asp	His	Lys	Asn	Glu	Phe
	50					55					60				

Cys	Glu	Ile	Thr	Leu	Ile	Ser	Ser	Gly	Arg	Lys	Asp	Cys	Asn	Glu	Ile
65					70					75				80	

Pro	Thr	Glu	Gly	Trp	Ala	Lys	Pro	Ser	Leu	Lys	Phe	Ile	Leu	Asn	Thr
				85					90					95	

Val	Asn	Gly	Thr	Thr	Arg	Thr	Val	Asn	Pro	Leu	Gly	Phe	Phe	Lys	Lys
		100						105					110		

Glu	Ala	Leu	Pro	Lys	Cys	Ala	Gln	Val	Tyr	Asn	Lys	Leu	Gly	Met	Tyr
		115					120					125			

Pro	Pro	Asn	Met
		130	

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 132

&lt;212&gt; PRT

<213> *Olea euroapea* L. Subsp. *Picholine marocaine*

&lt;223&gt; alergeno Ole e 1 clon 2

&lt;400&gt; 28

Ile	Arg	Thr	Val	Tyr	Cys	Asp	Thr	Cys	Arg	Ala	Gly	Phe	Ile	Thr	Glu
1				5					10					15	

Leu	Ser	Glu	Phe	Ile	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Arg	Leu	Gln	Cys	Lys	Asp
			20					25					30		

Lys	Glu	Asn	Gly	Asp	Ile	Thr	Phe	Thr	Glu	Val	Gly	Tyr	Thr	Arg	Ala
		35					40					45			

Glu	Gly	Leu	Tyr	Ser	Met	Leu	Val	Glu	Arg	Asp	His	Lys	Asn	Glu	Phe
	50					55					60				

Cys	Glu	Ile	Thr	Leu	Ile	Ser	Ser	Gly	Arg	Lys	Asp	Cys	Asn	Glu	Ile
65					70					75				80	

Pro	Thr	Glu	Gly	Trp	Ala	Lys	Pro	Ser	Leu	Lys	Phe	Ile	Leu	Asn	Thr
				85					90					95	



Val Asn Gly Thr Thr Arg Thr Val Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys  
 100 105 110

Glu Ala Leu Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr  
 115 120 125

Pro Pro Asn Met  
 130

<210> 29

<211> 132

<212> PRT

<213> *Olea euroaepa* L. Subsp. *Picholine marocaine*

<223> alergeno Ole e 1 clon 3

<400> 29

Ile Arg Thr Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu  
 1 5 10 15

Leu Ser Glu Phe Ile Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp  
 20 25 30

Lys Glu Asn Gly Asp Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala  
 35 40 45

Glu Gly Leu Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe  
 50 55 60

Cys Glu Ile Thr Leu Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asp Cys Asn Glu Ile  
 65 70 75 80

Pro Thr Glu Gly Trp Ala Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr  
 85 90 95

Val Asn Gly Thr Thr Arg Thr Val Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys  
 100 105 110

Glu Ala Leu Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr  
 115 120 125

Pro Pro Asn Met  
 130

<210> 30

<211> 132

<212> PRT

<213> *Olea euroaepa* L. Subsp. *Menara*

<223> alergeno Ole e 1 clon 1

<400> 30

Ile Arg Thr Val His Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu  
 1 5 10 15

Leu Ser Glu Phe Ile Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp  
 20 25 30

Lys Glu Asn Gly Asp Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala  
35 40 45

Glu Gly Leu Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe  
50 55 60

Cys Glu Ile Thr Leu Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asp Cys Asn Glu Ile  
65 70 75 80

Pro Thr Glu Gly Trp Ala Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr  
85 90 95

Val Asn Gly Thr Thr Arg Thr Val Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys  
100 105 110

Glu Ala Leu Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr  
115 120 125

Pro Pro Asn Met  
130

<210> 31

<211> 132

<212> PRT

<213> *Olea europea* L. Subsp. Menara

<223> alergeno Ole e 1 clon 2

<400> 31

Ile Arg Thr Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu  
1 5 10 15

Leu Ser Glu Phe Ile Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp  
20 25 30

Lys Glu Asn Gly Asp Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala  
35 40 45

Glu Gly Leu Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe  
50 55 60

Cys Glu Ile Thr Leu Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asp Cys Asn Glu Ile  
65 70 75 80

Pro Thr Glu Gly Trp Ala Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr  
85 90 95

Val Asn Gly Thr Thr Arg Thr Val Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys  
100 105 110

Glu Ala Leu Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr  
115 120 125

Pro Pro Asn Met  
130

<210> 32

<211> 132

<212> PRT

<213> *Olea europea* L. Subsp. Menara

<223> alergeno Ole e 1 clon 3

<400> 32

Ile Arg Thr Val His Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu  
1 5 10 15

Leu Ser Glu Phe Ile Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp  
20 25 30

Lys Glu Asn Gly Asp Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala  
35 40 45

Glu Gly Leu Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe  
50 55 60

Cys Glu Ile Thr Leu Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asp Cys Asn Glu Ile  
65 70 75 80

Pro Thr Glu Gly Trp Ala Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr  
85 90 95

Val Asn Gly Thr Thr Arg Thr Val Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys  
100 105 110

Glu Ala Leu Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr  
115 120 125

Pro Pro Asn Met  
130

<210> 33

<211> 132

<212> PROT

<213> *Olea europea* L. Subsp. Lucio

<223> alergeno Ole e 1 clon 1

<400> 33

Ile Gly Gln Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu  
1 5 10 15

Leu Ser Glu Phe Ile Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp  
20 25 30

Lys Glu Asn Gly Asp Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala  
35 40 45

Glu Gly Leu Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe  
50 55 60

Cys Glu Ile Thr Leu Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asp Cys Asn Glu Ile  
65 70 75 80

Pro Thr Glu Gly Trp Ala Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr  
85 90 95

Val Asn Gly Thr Thr Arg Thr Val Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys  
100 105 110

Glu Ala Leu Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr  
 115 120 125

Pro Pro Asn Met  
 130

<210> 34  
 <211> 132  
 <212> PROT  
 <213> *Olea euroaepa* L. Subsp. Lucio

<223> alergeno Ole e 1 clon 2

<400> 34  
 Ile Gly Gln Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu  
 1 5 10 15

Leu Ser Glu Phe Ile Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp  
 20 25 30

Lys Glu Asn Gly Asp Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala  
 35 40 45

Glu Gly Leu Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe  
 50 55 60

Cys Glu Ile Thr Leu Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asp Cys Asn Glu Ile  
 65 70 75 80

Pro Thr Glu Gly Trp Ala Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr  
 85 90 95

Val Asn Gly Thr Thr Arg Thr Val Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys  
 100 105 110

Glu Ala Leu Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr  
 115 120 125

Pro Pro Asn Met  
 130

<210> 35  
 <211> 132  
 <212> PROT  
 <213> *Olea euroaepa* L. Subsp. Lucio

<223> alergeno Ole e 1 clon 3

<400> 35  
 Ile Gly Gln Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu  
 1 5 10 15

Leu Ser Glu Phe Ile Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp  
 20 25 30

Lys Glu Asn Gly Asp Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala  
 35 40 45

Glu Gly Leu Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe  
50 55 60

Cys Glu Ile Thr Leu Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asp Cys Asn Glu Ile  
65 70 75 80

Pro Thr Glu Gly Trp Ala Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr  
85 90 95

Val Asn Gly Thr Thr Arg Thr Val Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys  
100 105 110

Glu Ala Leu Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr  
115 120 125

Pro Pro Asn Met  
130

<210> 36

<211> 131

<212> PROT

<213> *Olea euroapea* L. Subsp. Picual

<223> alergeno Ole e 1 clon 1

<400> 36

Trp Thr Val Ser Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu Leu  
1 5 10 15

Ser Glu Phe Ile Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp Lys  
20 25 30

Glu Asn Gly Asp Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala Glu  
35 40 45

Gly Leu Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe Cys  
50 55 60

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

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

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

Ala Leu Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro  
115 120 125

Pro Asn Met  
130

<210> 37

<211> 132

<212> PROT

<213> *Olea euroapea* L. Subsp. Picual

<223> alergeno Ole e 1 clon 2

&lt;400&gt; 37

Ile Leu Thr Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu  
1 5 10 15

Leu Ser Glu Phe Ile Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp  
20 25 30

Lys Glu Asn Gly Asp Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala  
35 40 45

Glu Gly Leu Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe  
50 55 60

Cys Glu Ile Thr Leu Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asp Cys Asp Glu Ile  
65 70 75 80

Pro Thr Glu Gly Trp Ala Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr  
85 90 95

Val Asn Gly Thr Thr Arg Thr Val Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys  
100 105 110

Glu Ala Leu Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr  
115 120 125

Pro Pro Asn Met  
130

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 132

&lt;212&gt; PROT

<213> *Olea europea* L. Subsp. Picual

&lt;223&gt; alergeno Ole e 1 clon 3

&lt;400&gt; 38

Ile Leu Thr Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu  
1 5 10 15

Leu Ser Glu Phe Ile Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp  
20 25 30

Lys Glu Asn Gly Asp Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala  
35 40 45

Glu Gly Leu Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe  
50 55 60

Cys Glu Ile Thr Leu Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asp Cys Asp Glu Ile  
65 70 75 80

Pro Thr Glu Gly Trp Ala Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr  
85 90 95

Val Asn Gly Thr Thr Arg Thr Val Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys  
100 105 110

Glu Ala Leu Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr  
115 120 125

Pro Pro Asn Met  
130

<210> 39  
<211> 132  
<212> PROT  
<213> *Olea euroapea* L. Subsp. Loaime

<223> alergeno Ole e 1 clon 1

<400> 39

Ile Trp Thr Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu  
1 5 10 15

Leu Ser Glu Phe Ile Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp  
20 25 30

Lys Glu Asn Gly Asp Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala  
35 40 45

Glu Gly Leu Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe  
50 55 60

Cys Glu Ile Thr Leu Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asp Cys Asp Glu Ile  
65 70 75 80

Pro Thr Glu Gly Trp Ala Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr  
85 90 95

Val Asn Gly Thr Thr Arg Thr Val Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys  
100 105 110

Glu Ala Leu Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr  
115 120 125

Pro Pro Asn Met  
130

<210> 40  
<211> 132  
<212> PROT  
<213> *Olea euroapea* L. Subsp. Loaime

<223> alergeno Ole e 1 clon 2

<400> 40

Ile Trp Thr Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu  
1 5 10 15

Leu Ser Glu Phe Ile Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp  
20 25 30

Lys Glu Asn Gly Asp Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala  
35 40 45

Glu Gly Leu Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe  
50 55 60

Cys Glu Ile Thr Leu Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asp Cys Asp Glu Ile  
65 70 75 80

Pro Thr Glu Gly Trp Ala Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr  
85 90 95

Val Asn Gly Thr Thr Arg Thr Val Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys  
100 105 110

Glu Ala Leu Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr  
115 120 125

Pro Pro Asn Met  
130

<210> 41

<211> 132

<212> PROT

<213> *Olea euroapea* L. Subsp. *Loaime*

<223> alergeno Ole e 1 clon 3

<400> 41

Ile Trp Thr Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu  
1 5 10 15

Leu Ser Glu Phe Ile Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp  
20 25 30

Lys Glu Asn Gly Asp Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala  
35 40 45

Glu Gly Leu Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe  
50 55 60

Cys Glu Ile Thr Leu Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asp Cys Asp Glu Ile  
65 70 75 80

Pro Thr Glu Gly Trp Ala Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr  
85 90 95

Val Asn Gly Thr Thr Arg Thr Val Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys  
100 105 110

Glu Ala Leu Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr  
115 120 125

Pro Pro Asn Met  
130

<210> 42

<211> 129

<212> PROT

<213> *Olea euroapea* L. Subsp. *Hojiblanca*

<223> alergeno Ole e 1 clon 1

<400> 42



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

Met

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 129

&lt;212&gt; PROT

<213> *Olea euroaepa* L. Subsp. Hojiblanca

&lt;223&gt; alergeno Ole e 1 clon 2

&lt;400&gt; 43

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

Met

<210> 44  
 <211> 129  
 <212> PROT  
 <213> *Olea euroapea* L. Subsp. Hojiblanca

<223> alergeno Ole e 1 clon 3

<400> 44

Ser Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu  
 1 5 10 15

Phe Ile Pro Gly Ala Gly Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp Gly Glu Asn  
 20 25 30

Gly Asn Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala Glu Gly Leu  
 35 40 45

Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe Cys Glu Ile  
 50 55 60

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

Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr Val Asn Gly  
 85 90 95

Thr Thr Arg Thr Ile Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys Glu Ala Leu  
 100 105 110

Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro Pro Asn  
 115 120 125

Met

<210> 45  
 <211> 131  
 <212> PROT  
 <213> *Olea euroapea* L. Subsp. Arbequina

<223> alergeno Ole e 1 clon 1

<400> 45

Gln Asp Ser Tyr Arg Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu Leu  
 1 5 10 15

Ser Glu Phe Ile Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp Arg  
 20 25 30

Glu Asn Gly Asp Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala Glu  
 35 40 45

Gly Leu Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe Cys  
 50 55 60

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

Thr Glu Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr Val  
 85 90 95

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

Ala Leu Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro  
 115 120 125

Pro Asn Met  
 130

<210> 46

<211> 131

<212> PROT

<213> *Olea euroapea* L. Subsp. *Arbequina*

<223> alergeno Ole e 1 clon 2

<400> 46

Gln Ala Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu Leu  
 1 5 10 15

Ser Glu Phe Ile Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp Arg  
 20 25 30

Glu Asn Gly Asp Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala Glu  
 35 40 45

Gly Leu Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe Cys  
 50 55 60

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

Thr Glu Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr Val  
 85 90 95

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

Ala Leu Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro  
 115 120 125

Pro Asn Met  
 130

<210> 47

<211> 131

<212> PROT

<213> *Olea euroapea* L. Subsp. *Arbequina*

<223> alergeno Ole e 1 clon 3

<400> 47

Gln Asp Ser Tyr Arg Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu Leu  
 1 5 10 15

Ser Glu Phe Ile Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp Arg  
 20 25 30

Glu Asn Gly Asp Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala Glu  
35 40 45

Gly Leu Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe Cys  
50 55 60

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

Thr Glu Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr Val  
85 90 95

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

Ala Leu Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro  
115 120 125

Pro Asn Met  
130

<210> 48

<211> 132

<212> PROT

<213> *Olea euroapea* L. Subsp. *Bella de España*

<223> alergeno Ole e 1 clon 1

<400> 48

Ile Arg Thr Val Ser Gln Asp Thr Cys Cys Ala Arg Phe Ile Thr Glu  
1 5 10 15

Leu Ser Glu Phe Ile Pro Gly Ala Gly Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp  
20 25 30

Gly Glu Asn Gly Asn Val Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala  
35 40 45

Glu Gly Leu Tyr Ser Met Leu Ile Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe  
50 55 60

Cys Glu Ile Thr Leu Leu Ser Ser Ser Arg Lys Asp Cys Asp Glu Ile  
65 70 75 80

Pro Val Glu Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Met Leu Asn Thr  
85 90 95

Val Asn Gly Thr Thr Arg Thr Ile Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys  
100 105 110

Glu Ala Leu Pro Lys Cys Pro Gln Val Phe Asn Lys Leu Gly Met Tyr  
115 120 125

Pro Pro Asp Met  
130

<210> 49

<211> 132

<212> PROT

<213> *Olea europea* L. Subsp. *Bella de España*

<223> alergeno Ole e 1 clon 2

<400> 49

Ile Arg Thr Val Phe Arg Val Thr Cys Arg Ala Arg Phe Ile Thr Glu  
1 5 10 15

Leu Ser Glu Phe Ile Pro Gly Ala Gly Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp  
20 25 30

Gly Glu Asn Gly Asn Val Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala  
35 40 45

Glu Gly Leu Tyr Ser Met Leu Ile Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe  
50 55 60

Cys Glu Ile Thr Leu Leu Ser Ser Ser Arg Lys Asp Cys Asp Glu Ile  
65 70 75 80

Pro Val Glu Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Met Leu Asn Thr  
85 90 95

Val Asn Gly Thr Thr Arg Thr Ile Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys  
100 105 110

Glu Ala Leu Pro Lys Cys Pro Gln Val Phe Asn Lys Leu Gly Met Tyr  
115 120 125

Pro Pro Asp Met  
130

<210> 50

<211> 131

<212> PROT

<213> *Olea europea* L. Subsp. *Bella de España*

<223> alergeno Ole e 1 clon 3

<400> 50

Gln Asp Ser Tyr Ser Gly His Cys Arg Ala Arg Phe Ile Thr Glu Leu  
1 5 10 15

Ser Glu Phe Ile Pro Gly Ala Gly Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp Gly  
20 25 30

Glu Asn Gly Asn Val Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala Glu  
35 40 45

Gly Leu Tyr Ser Met Leu Ile Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe Cys  
50 55 60

Glu Ile Thr Leu Leu Ser Ser Ser Arg Lys Asp Cys Asp Glu Ile Pro  
65 70 75 80

Val Glu Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Met Leu Asn Thr Val  
85 90 95

Asn Gly Thr Thr Arg Thr Ile Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys Glu  
100 105 110

Ala Leu Pro Lys Cys Pro Gln Val Phe Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro  
 115 120 125

Pro Asp Met  
 130

<210> 51  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético  
 <223> Iniciador adaptador oligo-dT diseñado para amplificar, en combinación con SEQ ID NO: 52, la totalidad o parte de la región codificante de Ole e 1 de polen de olivo

<400> 51  
 gactcgcgctc gacatcgcatt tttttttttt ttttt 35

<210> 52  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético  
 <223> Iniciador Ole e 1 diseñado para amplificar, en combinación con SEQ ID NO: 51, la totalidad o parte de la región codificante de Ole e 1 de polen de olivo

<400> 52  
 acctccagtt tctcaatttc ac 22

