

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2005.07.11	(73) Titular(es): MERCK PATENT GMBH FRANKFURTER STRASSE 250 64293 DARMSTADT DE
(30) Prioridade(s): 2004.07.21 DE 102004035337	
(43) Data de publicação do pedido: 2007.04.04	(72) Inventor(es): HELMUT FIEBIG HELGA KAHLERT MARTIN WALD ANDREAS NANDY BERNHARD WEBER DE DE DE DE DE
(45) Data e BPI da concessão: 2009.06.03 173/2009	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **VARIANTES DOS ALERGÉNIOS DO GRUPO 1 DAS POACEAE COM ALERGENECIDADE REDUZIDA E MANTENDO A REACTIVIDADE DAS CÉLULAS T**

(57) Resumo:

RESUMO

"VARIANTES DOS ALERGÉNIOS DO GRUPO 1 DAS *POACEAE* COM ALERGENECIDADE REDUZIDA E MANTENDO A REACTIVIDADE DAS CÉLULAS T"

A presente invenção é relativa à produção e à utilização de variantes dos alergénios do grupo 1 das *Poaceae* (gramíneas), caracterizadas por uma reactividade IgE reduzida em relação aos alergénios conhecidos do tipo selvagem e por, ao mesmo tempo, manterem em grande medida uma reactividade com os linfócitos T. Estas variantes de alergénios hipoalergénicas podem ser empregues na imunoterapia (hipossensibilização) específica de doentes com alergia aos pólenes das gramíneas, ou na imunoterapia preventiva de alergias aos pólenes das gramíneas.

DESCRIÇÃO
"VARIANTES DOS ALERGÉNIOS DO GRUPO 1 DAS POACEAE COM
ALERGENECIDADE REDUZIDA E MANTENDO A REACTIVIDADE DAS
CÉLULAS T"

A presente invenção é relativa à produção e à utilização de variantes do Phl p 1 do pólen do rabo-de-gato (*Phleum pratense*), caracterizadas por uma reactividade IgE reduzida em relação a alergénios conhecidos do tipo selvagem e por, ao mesmo tempo, manterem em grande medida uma reactividade com os linfócitos T. Estas variantes de alergénios hipoalergénicas podem ser empregues na imunoterapia específica (hipossensibilização) de doentes com alergia aos pólenes das gramíneas ou na imunoterapia preventiva de alergias aos pólenes das gramíneas.

Antecedentes da invenção

As alergias do tipo 1 têm um peso a nível mundial. Até 20% da população nos países industrializados sofrem de problemas relacionados com renite alérgica, conjuntivite ou bronquite asmática. Estas alergias são provocadas por alergénios que se encontram no ar (aeroalergénios), libertados por fontes de diferentes origens, tais como pólenes de plantas, ácaros, cães ou gatos. Até 40% destes indivíduos alérgicos do tipo 1 mostram, por sua vez, uma reactividade IgE específica aos alergénios dos pólenes das gramíneas (Freidhoff et al., 1986, "J. Allergy Clin. Immunol." 78: 1190 - 2002). No caso das substâncias que provocam alergias do tipo 1, tem-se as proteínas, as glicoproteínas ou os polipéptidos. Estes alergénios reagem, depois da absorção pelas mucosas, com as moléculas IgE ligadas à superfície dos mastócitos nas pessoas

sensibilizadas. Se duas moléculas IgE se ligarem uma à outra por intermédio de um alergénio, isto levará à libertação de mediadores (por exemplo, histamina, prostaglandinas) e de citocinas pelas células efectoras e, com isso, aos respectivos sintomas clínicos.

Em função da frequência relativa com que as diferentes moléculas de alergénios reagem com os anticorpos IgE de indivíduos alérgicos, assim é feita a distinção entre os alergénios *major* e *minor*. No caso do rabo-de-gato (*Phleum pratense*), identificou-se até à data o Phl p 1 (Petersen et al., 1993, "J. Allergy Clin. Immunol." 92, 789-796), o Phl p 5 (Matthiesen und Löwenstein, 1991, "Clin. Exp. Allergy" 21: 297-307; Petersen et al., 1992, "Int. Arch. Allergy Immunol." 98: 105-109), o Phl p 6 (Petersen et al., 1995, "Int. Arch. Allergy Immunol." 108, 49-54). O Phl p 2/3 (Dolecek et al., 1993, FEBS 335 (3), 299-304), o Phl p 4 (Haavik et al., 1985, "Int. Arch. Allergy Appl. Immunol." 78: 260-268; Valenta et al., 1992, "Int. Arch. Allergy Immunol." 97: 287-294, Fischer et al., 1996, "J Allergy Clin. Immunol." 98: 189-198) e Phl p 13 (Suck et al., 2000, "Clin. Exp. Allergy" 30: 324-332; Suck et al., 2000, "Clin. Exp. Allergy" 30: 1395-1402) como alergénios *major*.

Os alergénios *major* dominantes do rabo-de-gato (*Phleum pratense*) são o Phl p 1 e o Phl p 5. Visto que os alergénios *major* das gramíneas da família *Poaceae* têm grande homologia entre eles e, por isso, têm propriedades imunológicas e bioquímicas muito semelhantes, estas proteínas aparentadas são agrupadas como alergénios do grupo 1 ou do grupo 5. Os alergénios do grupo 1 reagem com os anticorpos IgE de mais de 95% dos indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas e são, por esse motivo,

alergénios *major* dominantes dos pólenes das gramíneas. Os alergénios do grupo 1 são glicoproteínas com uma massa molecular de cerca de 32 kDa e encontram-se localizados no citoplasma dos grãos de pólen. Tanto o contacto dos grãos de pólen com a mucosa das vias respiratórias superiores como a humedificação dos grãos de pólen pela chuva levam a uma libertação rápida destes alergénios. A libertação rápida dos alergénios do grupo 1, também na forma de micropartículas subcelulares, permite a penetração nas vias respiratórias inferiores, o que pode levar a graves ataques de asma.

Identificou-se os ADNc dos alergénios do grupo 1 do *Phleum pratense* (Laffer et al., 1994, "J. Allergy Clin. Immunol." 94: 689-698), *Lolium perenne* (Perez et al., 1990, "J. Biol. Chem." 265: 16210-16250), *Holcus lanatus* (Schramm et al., 1997, "J. Allergy Clin. Immunol." 1999: 781-787), *Poa pratensis* (Sturaro e Viotti, 1998, NCBI GenBank, Acc. No. AJ 131850), *Cynodon dactylon* (Smith et al., 1996, "J. Allergy Clin. Immunol." 98: 331-343), *Phalaris aquatica* (Suphioglu et al., 1995, "Clin. Exp. Allergy" 25: 853-865) e *Oryza sativa* (Xu et al., 1995, "Gene" 164: 255-259).

Aparte destas descrições iniciais da sequência, encontram-se publicadas em bases de dados outras sequências de alergénios do grupo 1, que se desviam em posições individuais das sequências originais. Estas isoformas são também conhecidas de outros alergénios dos pólenes das gramíneas.

Os alergénios do grupo 1 das gramíneas (*Poaceae*) apresentam, devido à sua homologia, uma grande reactividade cruzada com os anticorpos IgE humanos (Laffer et al., 1996,

"Mol. Immunology" 33: 417-426). Esta reactividade cruzada imunológica tem por base uma sequência de aminoácidos muito semelhante, como mostrado por uma comparação de sequências do Phl p 1, o alergénio do grupo 1 do rabo-de-gato (*Phleum pratense*), com moléculas do grupo 1 de espécies seleccionadas, na Figura 1.

Tanto para as áreas de sequência das deleções descritas neste caso na construção de variantes hipoalergénicas da sequência de aminoácidos do Phl p 1, como para as suas áreas de sequência associadas, existem áreas de sequência homólogas nos restantes alergénios do grupo 1 das *Poaceae*. Além disso, conserva-se tanto o número como as áreas envolventes das sequências das cisteínas dos alergénios do grupo 1 das *Poaceae*. Devido a níveis de homologia das sequências, os alergénios do grupo 1 das *Poaceae* são atribuídos à família das β -expansinas (Cosgrove D. J., 2000 *Nature* 407: 321-6).

Uma abordagem clássica para o tratamento terapêutico eficaz de alergias é representada pela hipossensibilização ou pela imunoterapia específica (Fiebig, 1995, *Allergo J.* 4 (6): 336-339; Bousquet et al., 1998, "J. Allergy Clin. Immunol." 102 (4), 558-562). Neste caso, injecta-se de forma subcutânea no doente extractos naturais de alergénios em doses crescentes. Em todo o caso, existe com este método o risco de reacções alérgicas ou até mesmo de um choque anafilático. De modo a minimizar estes riscos, empregam-se preparados inovadores na forma de alergóides. Trata-se a este respeito de extractos quimicamente modificados de alergénios, que apresentam uma reactividade IgE claramente reduzida, mas, contudo, uma reactividade com as células T idêntica à do extracto não tratado. Estes epítomos das

células T são decisivos na acção terapêutica dos preparados de alergénios na hipossensibilização (Fiebig, 1995, *Allergo J.* 4 (7), 377-382).

Uma maior optimização terapêutica seria possível com alergénios produzidos de forma recombinante. *Cocktails* definidos de alergénios produzidos de forma recombinante e altamente puros, eventualmente em consonância com o modelo de sensibilização individual do doente, poderiam substituir os extractos de fontes naturais de alergénios, visto estes conterem, além dos diferentes alergénios, um maior número de proteínas associadas imunogénicas mas não alergénicas.

Perspectivas realísticas, que podem levar a uma hipossensibilização segura com produtos de expressão recombinantes, proporcionam alergénios recombinantes que sofreram mutação, nos quais os epítomos da IgE são delectados de forma específica sem afectarem negativamente os epítomos das células T essenciais à terapia (Schramm *et al.*, 1999, "J. Immunol." 162: 2406-2414).

Um conceito daí derivado no intuito de uma hipossensibilização parte do princípio de que uma resposta imunitária protectora é induzida em especial por anticorpos IgG4 bloqueadores. Em conformidade com esta hipótese, descreveram-se fragmentos do Phl p 1 recombinantes, que deverão ser adequados à indução de uma resposta IgG4 protectora (Ball *et al.*, 1999, *FASEB J.* 13: 1277-1290). Este conceito distingue-se totalmente do conceito das variantes de alergénios hipoalergénicas com uma reduzida reactividade com a IgE e mantendo a reactividade com as células T.

Outra possibilidade de influenciar de forma terapêutica o equilíbrio das células T auxiliares, afectado nos indivíduos alérgicos, consiste no tratamento com ADN expressável, que codifica os alergénios relevantes (vacinação imunoterapêutica de ADN). As provas experimentais da influência específica de alergénios da resposta imunitária foram produzidas em roedores por meio da injeccção de ADN que codifica alergénios (Hsu et al., 1996, "Nature Medicine" 2 (5): 540-544).

O objectivo na base da presente invenção consistiu na preparação de novas variantes do Phl p 1 ao nível proteico e do ADN, que se distinguem por uma reduzida actividade da IgE mantendo em grande medida a reactividade com as células T e que, por isso, se adequam à imunoterapia específica curativa e preventiva, assim como à vacinação imunoterapêutica de ADN.

Figuras

Figura 1: Alinhamento de sequências de aminoácidos homólogas do Phl p 1 (sequências de proteínas maduras deduzidas de sequências de ADNc) de espécies das *Poaceae*: *Poa pratensis* (Poa p), *Holcus lanatus* (Hol l), *Lolium perenne* (Lol p), *Cynodon dactylon* (Cyn d), *Oryza sativa* (Ory s) e *Phalaris aquatica* (Pha a), sequências proteicas deduzidas de sequências de ADNc da base de dados "GenBank" do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Bethesda, EUA), numeração: posições de aminoácidos de proteínas maduras, identificados a sublinhado: aminoácidos diferentes da sequência do Phl p 1, moldura a preto: cisteínas

Figura 2: Alinhamento de sequências de aminoácidos da

proteína do tipo selvagem Phl p 1 processada e da variante Phl p 1 NoCys, Phl p1 Wt (tipo selvagem): sequência proteica deduzida da sequência de ADNc (registo na base de dados "GenBank" Z27090 do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), Bethesda, EUA), numeração: posições dos aminoácidos da proteína madura, moldura a preto: substituições de aminoácidos cisteína por serina na proteína Phl p 1 NoCys

Figura 3: Alinhamento de sequências de aminoácidos das variantes hipoalergénicas representadas a título de exemplo Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-220 e Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220, numeração: posições dos aminoácidos, identificadas a sublinhado: deleções

Figura 4: SDS-PAGE e teste de identidade das variantes recombinantes Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-220 e Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220

A: SDS-PAGE

B: Western Blot com anticorpos de aPhl p 1 (Allergopharma)

1. Proteínas marcadoras
2. nPhl p 1*
3. rPhl p 1 Wt (- His-tag)*
4. Proteínas marcadoras
5. Phl p 1 NoCys (+ His-tag)
6. Phl p 1 NoCys Δ 213-220 (+ His-tag)
7. Phl p 1 NoCys Δ 1-6 115-119, 213-220 (+ His-tag)
8. Proteínas marcadoras

* amostras reduzidas (ditiotreitól)

Figura 5: Teste das tiras para testar a capacidade de ligação a IgE de Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-220 e

Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220, sob condições não desnaturantes

- 1) rPhl p 1 Wt
- 2) Phl p 1 NoCys
- 3) Phl p 1 NoCys D213 - 220
- 4) Phl p 1 NoCys D1 - 6, 115 - 119, 213 - 220
- 5) rPhl p 1 Wt

TP: coloração proteica total

P: soros de indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas definidos a nível clínico

Figura 6: Comprovação da reactividade reduzida com a IgE dos Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-220 e Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220, por meio do teste de inibição EAST com quatro soros representativos de indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas (P)

Figura 7: Comprovação da hipoalergenicidade do Phl p 1 NoCys, por meio do teste de activação de basófilos com basófilos de quatro indivíduos alérgicos ao pólen das gramíneas (P)

Figura 8: Comprovação da hipoalergenicidade do Phl p 1 NoCys Δ 213-220, com o teste de activação de basófilos com basófilos de quatro indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas (P)

Figura 9: Comprovação da hipoalergenicidade do Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220, por meio do teste de activação de basófilos com basófilos de quatro indivíduos alérgicos ao pólen das gramínea (P)

Os trabalhos que levaram às variantes encontradas foram

realizados com base no Phl p 1.

Por conseguinte, a presente invenção tem por objecto variante do Phl p 1, caracterizadas por uma reactividade com a IgE menor do que os alergénios conhecidos do tipo selvagem, assim como por manterem uma reactividade com os linfócitos T.

O ponto de partida para a construção das variantes hipoalergénicas do Phl p 1 é o ADNc do tipo selvagem do Phl p 1, que foi isolado com *primers* (iniciadores) específicos, por reacção em cadeia da polimerase (PCR) de todo o ADNc de pólenes do *Phleum pratense* (registo no "GenBank" Z27090; NCBI, Bethesda, EUA) (SEQ ID NO 1). Da sequência de ADNc do tipo selvagem do Phl p 1, deduziu-se a sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ ID NO 2. O Phl p 1, composto por 240 aminoácidos e glicosilado na forma natural, caracteriza-se - como todos os alergénios do grupo 1 (ver a Fig. 1) - pela existência de sete cisteínas da molécula madura. À excepção das Cyn d1 e Ory s1, estas posições de aminoácidos têm em todos os alergénios do grupo 1 os números 41, 57, 69, 72, 77, 83 e 139 (Petersen *et al.*, 1995, "J. Allergy Clin. Immunol" 95: 987-994).

Foi possível exprimir o Phl p 1 em *E. coli* na forma de proteína não glicosilada. A proteína do tipo selvagem recombinante (rPhl p 1 Wt) reagiu com os anticorpos IgE dos indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas, que apresentavam uma reactividade ao Phl p 1 purificado natural (nPhl p 1) (Petersen *et al.*, 1998, "Clin. Exp. Allergy" 28: 315-321).

Descrição detalhada da invenção

Produção e caracterização de variantes do Phl p 1 hipoalergénicas

A partir do ADNc descrito do rPhl p 1 Wt produziu-se variantes recombinantes geneticamente modificadas do Phl p 1.

A sequência de aminoácidos da variante recombinante Phl p 1 NoCys (SEQ ID NO 4) apresenta, em vez das sete cisteínas que aparecem no tipo selvagem, sete radicais serina (Fig. 2). A variante Phl p 1 NoCys serviu de ponto de partida para a construção de diferentes mutantes de deleção. Nestes são, por sua vez, delectadas secções individuais com um comprimento de 15 a 90 bp (pares de bases) ou combinações destas secções do ADNc que codifica o Phl p 1 NoCys, do que resultam deleções correspondentes dos aminoácidos 1-6, 1-30, 92-104, 115-119, 175-185 e 213-220 nas cadeias polipeptídicas das proteínas expressas em *E. coli*: Phl p 1 NoCys Δ 1-6 (SEQ ID NO 5 e 6), Phl p 1 NoCys Δ 1-30 (SEQ ID NO 7 e 8), Phl p 1 NoCys Δ 92-104 (SEQ ID NO 9 e 10), Phl p 1 NoCys Δ 115-119 (SEQ ID NO 11 e 12), Phl p 1 NoCys Δ 175-185 (SEQ ID NO 13 e 14), Phl p 1 NoCys Δ 213-220 (SEQ ID NO 15 e 16), e Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 (SEQ ID NO 17 e 18).

A expressão das proteínas recombinantes ocorre na forma de proteínas de fusão de histidina em *Escherichia coli*. A caracterização imunológica foi realizada com estas proteínas de fusão.

Primeiro estudou-se as variantes recombinantes, após imobilização numa membrana de nitrocelulose, quanto à capacidade de ligação de anticorpos IgE de um *pool* de soros

representativo e de anticorpos IgE de soros individuais de indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas (teste das tiras). Neste processo, observou-se de forma surpreendente uma ligação reduzida dos anticorpos IgE ao Phl p 1 NoCys. Este resultado foi confirmado por um teste de inibição de IgE (EAST), no qual se analisa a capacidade de ligação IgE de uma proteína não imobilizada a anticorpos IgE em solução.

Por conseguinte, a presente invenção tem por objecto sobretudo aquelas variantes dos alergénios do grupo 1 em que as cisteínas das posições de aminoácidos 41, 57, 69, 72, 77, 83 e 139, que correspondem à proteína Phl p 1 madura, são removidas ou substituídas por outro aminoácido.

Uma reduzida ligação de anticorpos IgE é já conseguida se pelo menos duas das 7 cisteínas forem removidas sem substituição ou forem substituídas por outro aminoácido. Em termos preferenciais, são contudo substituídas todas as 7 cisteínas por serina.

Recorrendo a um teste de activação de granulócitos basófilos de indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas, estudou-se os efeitos da capacidade reduzida de ligação a IgE do Phl P 1 NoCys sobre a acção funcional na reticulação de IgE ligada a membrana das células efectoras e a sua activação *in vitro*. O Phl p 1 NoCys mostrou neste caso uma activação claramente menor dos granulócitos basófilos do que o rPhl p 1 Wt e, com isso, uma alergenicidade funcionalmente reduzida.

Os mutantes de deleção diferentes produzidos à base do Phl p 1 NoCys foram estudados pelo mesmo processo em termos da

capacidade de ligação a IgE (teste das tiras, EAST) e da acção funcional (activação de basófilos). De forma surpreendente, os mutantes de deleção mostraram propriedades hipoalergénicas particularmente fortes.

Assim sendo, a presente invenção tem ainda por objecto as variantes do alergénio Phl p 1 nas quais - facultativamente além das variantes acima descritas com Cys removida ou substituída - falta pelo menos uma área ou uma combinação de áreas que correspondem aos aminoácidos 1-6, 1-30, 92-104, 115-119, 175-185 e 213-220 da sequência primária da proteína Phl p 1 madura, em comparação com o alergénio do tipo selvagem.

Prefere-se em particular, e logo também constitui objecto da invenção, aquelas variantes do alergénio Phl p 1 em que faltam exclusivamente os aminoácidos 213-220 ou ao mesmo tempo os aminoácidos 1-6 e 115-119 correspondendo à sequência Phl p 1 madura.

A reactividade com as células T, na base da eficácia da imunoterapia específica, das variantes do Phl p 1 hipoalergénicas foi testada *in vitro* através de um teste de proliferação com linfócitos T específicos do Phl p 1 de indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas. Os alergénios modificados mostravam manter em grande medida uma reactividade com as células T, o que permite uma utilização imunoterapêutica das variantes do Phl p 1 hipoalergénicas.

É possível produzir as variantes de alergénios de acordo com a invenção, a partir da sequência de ADN clonada recorrendo a métodos de engenharia genética. Em princípio,

também se podem tratar de modificações químicas do extracto nativo de alergénios (Fiebig, 1995, *Allergo J.* 4 (7), 377-382). Naturalmente são igualmente possíveis, através das variações descritas no presente pedido de patente dos alergénios do grupo 1, outras modificações noutras posições - por exemplo, para aumentar a hipoalergenidade. No caso destas modificações, em questão podem estar, por exemplo, inserções, deleções e trocas de aminoácidos, clivagens da proteína em fragmentos, assim como fusões da proteína ou dos seus fragmentos com outras proteínas ou outros péptidos. O objecto consiste ainda numa molécula de ADN que codifica uma variante de alergénio acima descrita, um vector de expressão recombinante contendo esta molécula de ADN, assim como um organismo hospedeiro transformado com a referida molécula de ADN ou com o referido vector de expressão. Os organismos hospedeiros apropriados podem ser organismos procarióticos ou eucarióticos, unicelulares ou pluricelulares, tais como bactérias ou leveduras. Um organismo hospedeiro preferido de acordo com a invenção é a *E. coli*.

Além disso, a invenção é relativa a um processo para a produção de uma variante de alergénio de acordo com a invenção, através da cultura do referido organismo hospedeiro e da obtenção da variante correspondente do alergénio da cultura.

A presente invenção tem ainda por objecto as variantes de alergénios acima descritas, moléculas de ADN e vectores de expressão na sua propriedade como medicamento.

Além disso, a presente invenção tem por objecto preparações farmacêuticas que contêm pelo menos uma destas variantes de

alergénios ou uma molécula de ADN correspondente ou um vector de expressão correspondente, assim como, eventualmente, outras substâncias activas e/ou substâncias auxiliares no tratamento de alergias, em cujo desencadeamento estão implicados os alergénios do grupo 1 das *Poaceae*, ou na vacinação imunoterapêutica de doentes com alergias e/ou na prevenção deste tipo de alergias. Se em questão estiverem preparações farmacêuticas do segundo tipo (contendo pelo menos uma molécula de ADN ou um vector de expressão), estas preparações conterão ainda preferencialmente hidróxido de alumínio, um oligonucleótido contendo CpG imunoestimulador ou uma combinação dos dois como substâncias auxiliares.

No âmbito da presente invenção, as preparações farmacêuticas podem ser utilizadas como meios terapêuticos na medicina humana ou veterinária. As substâncias de suporte tratam-se de substâncias orgânicas ou inorgânicas que se adequem à aplicação parenteral e que não reajam com as variantes de alergénios do grupo 1 de acordo com a invenção. À aplicação parenteral destinam-se sobretudo soluções, de preferência soluções oleicas ou aquosas, e ainda suspensões, emulsões ou implantes. As variantes de alergénios de acordo com a invenção também podem ser liofilizadas e os liofilizados obtidos podem ser empregues, por exemplo, na produção de preparados injectáveis. As preparações indicadas podem ser esterilizadas e/ou conter substâncias auxiliares, tais como lubrificantes, conservantes, estabilizadores e/ou reticulantes, emulsionantes, sais para influenciar a pressão osmótica, substâncias tampão e/ou várias outras substâncias activas. Além disso, é possível obter preparados de acção retardada ("depot"), por intermédio da respectiva formulação das

variantes de alergénios de acordo com a invenção, através, por exemplo, de adsorção em hidróxido de alumínio.

Por fim, a presente invenção tem por objecto a utilização de pelo menos uma variante de alergénio de acordo com a invenção ou de uma molécula de ADN de acordo com a invenção ou de um vector de expressão de acordo com a invenção, na produção de um medicamento destinado ao tratamento de alergias, em cuja activação estão implicados os alergénios do grupo 1 das *Poaceae*, ou na vacinação imunoterapêutica de doentes com alergias em cuja activação estão implicados os alergénios do grupo 1 das *Poaceae*, e/ou tendo em vista a prevenção deste tipo de alergias.

A produção das variantes Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-220 e Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 (Fig. 3) e a respectiva caracterização imunológica encontram-se seguidamente representadas a título de exemplo no caso das variantes Phl p 1 hipoalergénicas com as modificações genéticas acima descritas.

Expressão e purificação de variantes do Phl p 1 recombinantes

A expressão das proteínas recombinantes teve lugar na forma de proteínas de fusão de histidina (vector de expressão pProExHT; Invitrogen, Carlsbad, EUA) em *Escherichia coli* (estirpe JM109). O rPhl p 1 Wt e as variantes foram primeiro purificados pela ligação específica dos radicais histidina de terminação N a uma matriz de quelato de Ni^{2+} (cromatografia de afinidade com metal imobilizado = *Immobilized-Metal-Ion-Affinity-Chromatography*, IMAC) e, em seguida, por filtração em gel preparativa (cromatografia

de exclusão molecular = *Size-Exclusion-Chromatography*, SEC). A pureza das proteínas eluídas foi controlada por SDS-PAGE e SEC analítica (Fig. 4a). A identidade das proteínas purificadas foi comprovada pela ligação de um anticorpo monoclonal específico de Phl p 1 (Fig. 4b).

Comprovação da ligação reduzida a IgE das variantes do Phl p 1 recombinantes

Um método de teste simples para determinar a reactividade IgE de IgE específica de soros de indivíduos alérgicos em proteínas de teste ligadas a membrana trata-se do teste de tiras. Para isso, as substâncias de teste são ligadas na mesma concentração e na mesma quantidade lado a lado numa tira de membrana de nitrocelulose sob condições não desnaturantes. Uma série destas tiras de membrana pode ser incubada em paralelo com diferentes soros de indivíduos alérgicos. Após uma etapa de lavagem, os anticorpos IgE ligados de forma específica tornam-se visíveis na membrana por uma reacção corante, mediada por um conjugado de fosfatase alcalina/IgE anti-humana.

Como exemplo para as moléculas Phl p 1 modificadas descritas, encontram-se aqui representados os resultados do teste de tiras relativamente aos Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-220 e Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220, mediante a utilização de soros individuais de sujeitos alérgicos aos pólenes das gramíneas (Fig. 5). Apenas foram aplicados soros de indivíduos alérgicos com um título IgE forte contra o Phl p 1 natural. Os anticorpos IgE destes doentes também reagem com o equivalente recombinante rPhl p 1 Wt.

Torna-se evidente que os anticorpos IgE específicos do Phl p 1 de todos os soros dos doentes ligam de forma reduzida a variante recombinante Phl p 1 NoCys, mas não o alergénio do tipo selvagem Phl p 1.

Consegue-se uma redução ainda maior da capacidade de ligação a IgE através da remoção adicional de certas secções de sequências, o que é representado com base na variante Phl p 1 NoCys Δ 213-220. A variante Phl p 1 NoCys Δ 213-220 mostra, com todos os soros de indivíduos alérgicos testados, uma capacidade de ligação a IgE fortemente reduzida comparativamente à proteína do tipo selvagem recombinante não modificada. Outra redução da capacidade de ligação IgE do Phl p 1 a anticorpos IgE de certos soros pode ser alcançada por combinação de várias deleções, o que se pode reconhecer no resultado do teste da variante Phl p 1 NoCys Δ 1 - 6, 115 - 119, 213 - 220 com o soro de um indivíduo alérgico ao pólen das gramíneas P 14 (Fig. 5). Deste modo, torna-se evidente que tanto a substituição das cisteínas como a deleção de secções específicas de sequências reduzem a capacidade de ligação a IgE por parte da molécula Phl p 1.

Ao contrário do teste das tiras, é possível com o teste de inibição EAST (*Enzyme Allergosorbent Test*) estudar as interacções de IgE/alergénio em solução, pelo que é em princípio possível excluir uma camuflagem prejudicial dos epítomos da substância de teste pela imobilização na membrana. O teste de inibição EAST é realizado como se segue. Placas de microtítulo são revestidas com alergénios, neste caso o nPhl p 1. Após a remoção das moléculas de alergénio não ligadas por meio de lavagem, bloqueia-se a placa com albumina de soro bovino para evitar ligações

posteriores inespecíficas. Os anticorpos IgE de indivíduos alérgicos são, como *pool* representativo de soros individuais (*pool* de soros) ou como soro individual, incubados numa diluição adequada com as placas de microtítulo revestidas com alergénio. A quantidade de anticorpos IgE ligados a alergénios é quantificada por fotometria por meio de um conjugado anti-hIgE/fosfatase alcalina pela transformação de um substrato, obtendo-se um produto final corado.

A ligação dos anticorpos IgE é inibida por um alergénio solúvel ou pela substância a ser testada (alergénio modificado recombinante) em função da concentração e da substância.

Como exemplo para as moléculas de Phl p 1 modificadas descritas, encontram-se neste documento representados os resultados de teste relativos a Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-220 e Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220, em comparação com a molécula de referência nPhl p 1.

O teste de inibição IgE representativo, representado na Figura 6 com quatro soros individuais de indivíduos alérgicos ao pólen das gramíneas, mostra que, mesmo com concentrações elevadas da variante Phl p 1 NoCys (até 5 μ g/mL), apenas se atingiu cerca de 20-50% da acção de inibição máxima do alergénio natural não modificado nPhl p 1. A acção de inibição máxima mais baixa aponta para uma perda de epítomos IgE. Os trajectos das curvas das variantes Phl p 1 NoCys Δ 213-220 e Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 apontam para uma capacidade de ligação a IgE ainda menor destas variantes do Phl p 1. Variando individualmente, não foi possível detectar uma acção de

inibição ou apenas uma muita ligeira (0-20% da acção de inibição máxima). Em consonância com o resultado do teste de tiras, é assim possível atestar que, através da inserção de deleções objectivas adicionais, é possível uma maior redução da capacidade de ligação a IgE do Phl p 1.

Comprovação da hipoalergenicidade das variantes recombinantes do Phl p 1 através do teste de activação de basófilos

A redução funcional da alergenicidade foi determinada *in vitro* por meio de um teste de activação de basófilos. Com vista ao teste de activação de basófilos, procede-se a incubação de sangue total heparinizado de indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas com diferentes concentrações das substâncias de teste. As substâncias alergénicas são ligadas de forma específica pelos anticorpos IgE ligados a FcεRI dos basófilos, e levam a uma reticulação das moléculas FcεRI. Esta reticulação das FcεRI mediada por IgE de indução por alergénios leva a uma activação dos basófilos. A activação constitui a primeira etapa na reacção alérgica destas células efectoras. A posterior transdução de sinal resulta na desgranulação das células efectoras e, com isso, no desencadear das reacções alérgicas *in vivo*.

É possível comprovar *in vitro* a activação induzida por alergénios de granulócitos basófilos, por meio de quantificação da expressão de uma proteína de superfície (CD203c) associada à transdução de sinal da reticulação dos receptores da IgE (Kahlert et al., 2003, "Clin. Exp. Allergy" 33: 1266-72). O número das proteínas CD203c expressas numa célula e o valor percentual das células

activadas de um *pool* de células são medidos com grande sensibilidade, através da ligação de um anticorpo monoclonal marcado com fluorescência ao marcador de superfície, e posterior análise por citometria de fluxo activada por fluorescência. Como substâncias de referência, empregou-se neste caso o Phl p 1 natural purificado (nPhl p 1) em paralelo com as substâncias de teste. Como exemplo para as moléculas de Phl p 1 modificadas descritas, encontram-se aqui representados os resultados Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-220 e Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220.

Os resultados de teste representativos da variante Phl p 1 NoCys com basófilos de indivíduos alérgicos clinicamente definidos são mostrados na Figura 7 na forma do trajecto de uma curva. A redução da eficácia alergénica da variante Phl p 1 NoCys em relação ao tipo selvagem nPhl p 1 torna-se evidente pela deslocação das curvas de activação. Os resultados de teste das variantes Phl p 1 NoCys Δ 213-220 e Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 apontam, em consonância com os resultados do teste de tiras e com o teste de inibição IgE, para uma redução ainda maior da eficácia alergénica relativa, como mostrado na Figura 8 e na Figura 9 com base nos trajectos de curva representativos. Enquanto numa gama de concentração das substâncias de teste de 100-1 000 pM, o alergénio natural já tinha activado um teor máximo de basófilos, não foi possível detectar ou apenas se detectou uma activação muito ligeira de basófilos com a utilização dos alergénios modificados Phl p 1 NoCys Δ 213-220 e Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220. A eficácia alergénica da variante Phl p 1 NoCys Δ 213-220 era, como se pode calcular através dos valores A50 dos trajectos de curva, de ~100-1 000 vezes e a

da variante Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 mais de 1 000 vezes menor do que a referência nPhl p 1 (A50: concentração de alergénios no caso de 50% do número máximo de basófilos activados).

Reactividade das células T das variantes do Phl p 1 hipoalergénicas

Os linfócitos T auxiliares reagem com os fragmentos peptídicos dos alergénios (cerca de 12-25 aminoácidos), que são originados pela degradação enzimática em células que apresentam antigénios (APC) e que se apresentam, depois da introdução dos péptidos apropriados nas moléculas MHC de classe II individuais na superfície das APC, às células T. A activação específica de alergénios dos linfócitos T auxiliares é a condição prévia para a proliferação e para a diferenciação funcional (TH1 ou TH2). A influência dos linfócitos T específicos de alergénios por meio do tratamento com alergénio ou com um derivado de alergénio na hipossensibilização é considerada a chave da eficácia terapêutica.

Para estudar a reactividade das células T, estabelece-se linhas de células T oligoclonais de indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas, sob estimulação com moléculas nPhl p 1 ou rPhl p 1 Wt por processos usuais. Num teste de proliferação, estimulou-se as diferentes linhas de células T com alergénios de referência nPhl p 1 e rPhl p 1 Wt e com as variantes do Phl p 1 recombinantes modificadas. Determinou-se a taxa de proliferação pela incorporação de [³H]-timidina pelos processos usuais.

Como exemplo para as moléculas Phl p 1 modificadas

descritas, estão neste caso apresentados os resultados do teste de proliferação de Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-220 e Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220.

Os resultados apresentados na Tabela 1, com linhas de células T de oito indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas, mostram que os linfócitos T poderão ser estimulados a proliferarem pelas variantes de alergénios recombinantes. A reactividade com as células T de Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-220 e Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 é apenas um pouco menor do que a dos alergénios do tipo selvagem recombinantes e dos naturais não modificados, o que comprova a conservação dos epítomos decisivos das células T.

Tabela 1: Comprovação da reactividade dos Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213 - 220 e Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 com as células T, através do teste de proliferação com as linhas de células T (TCL) reactivas com o Phl p 1

Dador ²	Índice de estimulação ¹					
	TCL	nPhl p 1	rPhl p 1 WI	Phl p 1 NoCys	Phl p 1 NoCys Δ 213-220	Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220
A	11.16	3,2	4,7	3,7	3,5	3,9
B	21.1	23,5	13,9	12,1	13,0	12,3
C	60.51	3,9	5,7	3,9	4,2	2,0
D	104.8	2,6	4,6	4,1	3,4	3,0
E	10.27	26,4	27,8	32,7	30,8	31,4
F	41.8	2,7	4,9	3,5	3,0	3,1
G	55.74	7,6	8,4	4,9	4,6	4,5
H	57.43	3,1	4,0	3,0	2,6	2,9

¹ calculado com base em valores de medição [³H], valores de medição cpm de culturas de células estimuladas com alergénios/valores de medição cpm de culturas de células não estimuladas

² Dadores: indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas definidos a nível clínico

Construção por engenharia genética de variantes do Phl p 1 hipoalergénicas

Exemplo 1: Phl p 1 NoCys

Para a construção da variante Phl p 1 NoCys (SEQ ID NO 3 e 4), foram realizadas seis etapas PCR a partir do ADNc do rPhl p 1 Wt (registo do "GenBank" Z27090; NCBI, Bethesda, EUA). As mutações pontuais foram introduzidas ao ter-se empregue iniciadores de PCR específicos que continham, em vez dos codões que codificam a cisteína, aqueles que codificam a serina (sequências de iniciadores, ver a Tab. 2).

Etapa 1 - Produção do fragmento de ADN de terminação N "Phl p 1 [C41S, C57S, C69S] (bp: 1-212)": através de amplificação de oligonucleótidos sobrepostos compridos (P 1-63, P 49-111, P 97-158 e P 144-212) através de PCR, gerou-se um fragmento de ADN com as mutações C41S, C57S, C69S.

Etapa 2 - Produção do fragmento de ADN de terminação C "Phl p 1 [C69S, C72S, C77S, C83S] (bp: 193-720)": PCR do ADNc do Phl p 1 Wt com os iniciadores P 193-261 e P 703-720 *HindIII*.

Etapa 3 - Produção do ADN que codifica "Phl p 1 [C41S, C57S, C69S, C72S, C77S, C83S] (bp: 1-720)": PCR dos fragmentos sobrepostos "Phl p 1 [C41S, C57S, C69S] (bp: 1-212)" e "Phl p 1 [C69S, C72S, C77S, C83S] (bp: 193-720)" com os iniciadores P 1-63 e P 703-720 *HindIII*.

Etapa 4 - Produção do fragmento de ADN de terminação N de "Phl p 1 [C41S, C57S, C69S, C72S, C77S, C83S, C139S] (bp:

1-428)": PCR do ADNc de "Phl p 1 [C41S, C57S, C69S, C72S, C77S, C83S] (bp: 1-720)" com os iniciadores P 1-63 e P 406-428 as.

Etapa 5: Produção do fragmento de ADN de terminação C "Phl p 1 [C139S] (bp: 406-720)": PCR do ADNc do rPhl p 1 Wt com os iniciadores P 406-428S e P 703-720 *HindIII*.

Etapa 6 - Produção do ADN total que codifica o Phl p 1 NoCys: PCR dos fragmentos sobrepostos "Phl p 1 [C41S, C57S, C69S, C72S, C77S, C83S, C139S] (bp: 1-428)" e "Phl p 1 [C139S] (bp: 406-720) com os iniciadores P 1-63 e P 703-720 *HindIII*".

Os ADN que codificam o Phl p 1 NoCys foram digeridos com a enzima de restrição *HindIII* e foram ligados através dos locais de clivagem de restrição *EheI* e *HindIII* no vector de expressão pProExHt (Invitrogen, Carlsbad, EUA), e em seguida totalmente sequenciados.

Tabela 2: Resumo dos iniciadores de PCR empregues na produção dos Phl p 1 NoCys, Phl p 1 NoCys Δ 213-220 e Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220

Iniciador	Direção	SEQ ID NO	Sequência (5'→3')
P 1-18 ¹	sentido	19	atc ccg aag gtc ccg ccg
P 1-63	sentido	20	atc ccg aag gtc ccg ccg ggc ccg aac atc acg gcg acc tac ggc gac aag tgg ctg gac gcg
P 49-111	anti-sentido	21	ggt gtc ctt ggg acc ggc ggc cgt cgg ctt gcc gta cca ggg gct ctt cgc gtc cag cca ctt
P 97-158	sentido	22	ggg ccc aag gac aac ggc ggc gcg agc ggg tac aag gac gtc gac aag ccc ccg ttc agc gg
P 144-212	anti-sentido	23	gag ccg ct gcc ccg gcc gga ctt gaa gat ggg ggt gtt gcc gga gcc ggt cat gcc gct gaa cgg ggg c
P 193-261	sentido	24	tcg ggc cgg ggc agc ggc tcc tcc ttc gag atc aag agc acc aag ccc gag gcc tcc tcc ggc gag ccc
P 703-720 <i>HindIII</i>	anti-sentido	25	ggg aag ctt tca ctt gga ctc gta ggc ggt
P 406-426 as	anti-sentido	26	tcc ggg tac ttg gac ttg acg cg
P 406-426 s	sentido	27	cgc gtc aag tcc aag tac ccg ga
P 22-63 (Δ1-18)	sentido	28	ccg aac atc acg gcg acc tac ggc gac aag tgg ctg gac gcg
P 250-318	anti-sentido	29	gtc gaa gtc gta cgc ggc gat ggg ctc ctc gtt gtc gtc ggt gat gtc gac cac cac ggg ctc gcc gga
P 301-384 (Δ343-357)	sentido	30	gcc gcg tac cac ttc gac ctc tcc ggc atc gcg ttc ggg tcc gac gag cag aag ctg cgc agc gcc ggc
P 613-720 (Δ637-660) <i>HindIII</i>	anti-sentido	31	ggg aag ctt tca ctt gga ctc gta ggc ggt gtc ggc ctt cca gcc ctc ggg gat gac gtc ctt ggc ctc gcc gcg gac ggt gaa ggc gcc ctt gag

¹ Dados numéricos: Posições dos iniciadores em relação à sequência nucleotídica da proteína do tipo selvagem Phl p 1 (sem péptido de sinal; registo no "GenBank" Z27090; NCBI, Bethesda, EUA). As sequências de iniciadores estão em parte optimizadas com codões para *E. coli*.

Exemplo 2: Phl p 1 NoCys Δ213-220

A sequência de ADN que codifica a variante de deleção Phl p 1 NoCys Δ213-220 (SEQ ID NO 15 e 16) foi gerada por PCR do ADN do Phl p 1 NoCys, mediante a utilização do iniciador 5' P 1-18 e do iniciador 3' P 613-720 (Δ637-660) *HindIII*, encurtado de forma específica em torno da área a ser delectada da sequência. Os ADNc foram digeridos com a enzima de restrição *HindIII* e ligados através dos locais de clivagem de restrição *EheI* e *HindIII* no vector de expressão pProExHT (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e, depois, completamente sequenciados.

Exemplo 3: Construção genética do Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220

A sequência de ADN que codifica a variante de deleção Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220 (SEQ ID NO 5 e 6) foi gerada por PCR em três etapas, utilizando oligonucleótidos encurtados de forma específica em torno da área a ser delectada da sequência.

Etapa 1 - Produção do fragmento de ADN de terminação N "Phl p 1 NoCys Δ 1-6 (bp: 1-300)": PCR do ADNc do Phl p 1 NoCys com os iniciadores P22-63 (Δ 1-18) e P 250-318.

Etapa 2 - Produção do fragmento de ADN de terminação C "Phl p 1 NoCys Δ 115-119, 213-220 (bp: 283-663)": PCR do Phl p 1 NoCys com os iniciadores P 301-384 (Δ 343-357) e P 613-720 (Δ 637-660) *HindIII*.

Etapa 3 - Produção do ADN total que codifica o Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119, 213-220: PCR dos fragmentos sobrepostos "Phl p 1 NoCys Δ 1-6 (bp: 1-300)" e "Phl p 1 NoCys Δ 115-119, 213-220 (bp 283-663)" com os iniciadores P22-63 (Δ 1-18) e P 703-720 *HindIII*.

O ADN que codifica o Phl p 1 NoCys Δ 1 - 6, 115 - 119, 213 - 220 foi digerido com a enzima de restrição *HindIII* e foi ligado através dos locais de clivagem de restrição *EheI* e *HindIII* no vector de expressão pProExHT (Invitrogen, Carlsbad, EUA), e foi em seguida totalmente sequenciado.

Os ADN das variantes Phl p 1 NoCys Δ 1-6 (SEQ ID NO 5 e 6, Phl p 1 NoCys Δ 1-30 (SEQ ID NO 7 e 8), Phl p 1 NoCys Δ 92-104 (SEQ ID NO 9 e 10), Phl p 1 NoCys Δ 115-119 (SEQ ID NO 11 e 12), Phl p 1 NoCys Δ 175-185 (SEQ ID NO 13 e 14)

foram produzidos de forma correspondente, foram clonados e sequenciados.

Protocolo de sequências

<110> Merck Patent GmbH

<120> Variantes dos alergénios do grupo 1 de Poaceae com alergenicidade reduzida e mantendo a reactividade das células T

<130> P 04/107

<140> DE 102004035337.9

<141> 2004-07-17

<150> 31

<170> PatentIn versão 3.1

<210> 1

<211> 723

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(723)

<223>

<400> 1

atc	ccc	aag	gtc	ccc	ccc	ggc	ccg	aac	atc	acg	gcg	acc	tac	ggc	gac	48
Ile	Pro	Lys	Val	Pro	Pro	Gly	Pro	Asn	Ile	Thr	Ala	Thr	Tyr	Gly	Asp	
1				5				10						15		
aag	tgg	ctg	gac	gcg	aag	agc	acc	tgg	tac	ggc	aag	ccg	acg	gcc	gcc	96
Lys	Trp	Leu	Asp	Ala	Lys	Ser	Thr	Trp	Tyr	Gly	Lys	Pro	Thr	Ala	Ala	
			20					25						30		

```

ggt ccc aag gac aac ggc ggc gcg tgc ggg tac aag gac gtg gac aag      144
Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
      35      40      45
ccc ccg ttc agc ggc atg acc ggc tgc ggc aac acc ccc atc ttc aag      192
Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
      50      55      60
tcc ggc cgg ggc tgc ggc tcc tgc ttc gag atc aag tgc acc aag ccc      240
Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro
      65      70      75      80
gag gcc tgc tcc ggc gag ccc gtg gtg gtc cac atc acc gac gac aac      288
Glu Ala Cys Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn
      85      90      95
gag gag ccc atc gcc gcg tac cac ttc gac ctc tcc ggc atc gcg ttc      336
Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe
      100      105      110
ggg tcc atg gcc aag aag ggc gac gag cag aag ctg cgc agc gcc ggc      384
Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly
      115      120      125
gag gtg gag atc cag ttc cgc cgc gtc aag tgc aag tac ccg gag ggc      432
Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro Glu Gly
      130      135      140
acc aag gtc acc ttc cac gtg gag aag ggg tcc aac ccc aac tac ctg      480
Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu
      145      150      155      160
gcg ctg ctg gtg aag ttt gtc gcc ggc gac ggc gac gtg gtg gcg gtg      528
Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val
      165      170      175
gac atc aag gag aag ggc aag gac aag tgg atc gcg ctc aag gag tcg      576
Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser
      180      185      190
tgg gga gcc atc tgg agg atc gac acc ccg gag gtg ctc aag ggc ccc      624
Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro
      195      200      205
ttc acc gtc cgc tac acc acc gag ggc ggc acc aag ggc gag gcc aag      672
Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu Ala Lys
      210      215      220
gac gtc atc ccc gag ggc tgg aag gcc gac acc gcc tac gag tcc aag      720
Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
      225      230      235      240
tga
      723

<210> 2

<211> 240

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 2
ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp
1      5      10      15
Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala
20      25      30
Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
35      40      45

```

Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
 50 55 60
 Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro
 65 70 75 80
 Glu Ala Cys Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn
 85 90 95
 Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe
 100 105 110
 Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly
 115 120 125
 Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro Glu Gly
 130 135 140
 Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu
 145 150 155 160
 Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val
 165 170 175
 Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser
 180 185 190
 Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro
 195 200 205
 Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu Ala Lys
 210 215 220
 Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
 225 230 235 240

<210> 3

<211> 723

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(723)

<223>

<400> 3

atc ccg aag gtc ccg ccg ggc ccg aac atc acg gcg acc tac ggc gac 48
 Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp
 1 5 10 15
 aag tgg ctg gac gcg aag agc acc tgg tac ggc aag ccg acg gcc gcc 96
 Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala
 20 25 30

```

ggc ccc aag gac aac ggc ggc gcg agc ggc tac aag gac gtg gac aag      144
Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
      35              40              45

ccc ccg ttc agc ggc atg acc ggc tcc ggc aac acc ccc atc ttc aag      192
Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
      50              55              60

tcc ggc cgg ggc agc ggc tcc tcc ttc gag atc aag agc acc aag ccc      240
Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro
      65              70              75              80

gag gcc tcc tcc ggc gag ccc gtg gtg gtc cac atc acc gac gac aac      288
Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn
      85              90              95

gag gag ccc atc gcc gcg tac cac ttc gac ctc tcc ggc atc gcg ttc      336
Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe
      100             105             110

ggg tcc atg gcc aag aag ggc gac gag cag aag ctg cgc agc gcc ggc      384
Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly
      115             120             125

gag gtg gag atc cag ttc cgc cgc gtc aag tcc aag tac ccg gag ggc      432
Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro Glu Gly
      130             135             140

acc aag gtg acc ttc cac gtg gag aag ggc tcc aac ccc aac tac ctg      480

Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu
145              150              155              160

gcg ctg ctg gtg aag ttt gtc gcc ggc gac ggc gac gtg gtg gcg gtg      528
Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val
      165              170              175

gac atc aag gag aag ggc aag gac aag tgg atc gcg ctc aag gag tcg      576
Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser
      180              185              190

tgg gga gcc atc tgg agg atc gac acc ccg gag gtg ctc aag ggc ccc      624
Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro
      195              200              205

ttc acc gtc cgc tac acc acc gag ggc ggc acc aag ggc gag gcc aag      672
Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu Ala Lys
      210              215              220

gac gtc atc ccc gag ggc tgg aag gcc gac acc gcc tac gag tcc aag      720
Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
      225              230              235              240

tga                                                                    723

<210> 4
<211> 240
<212> PRT
<213> Phleum pratense

```

<400> 4

```

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

Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe
100          105          110
Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly
115          120          125
Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro Glu Gly
130          135          140
Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu
145          150          155          160
Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val
165          170          175
Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser
180          185          190
Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro
195          200          205
Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu Ala Lys
210          215          220
Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
225          230          235          240

```

<210> 5

<211> 705

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(705)

<223>

<400> 5

```

ggc ccg aac atc acg gcg acc tac ggc gac aag tgg ctg gac gcg aag      48
Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp Lys Trp Leu Asp Ala Lys
1          5          10          15

agc acc tgg tac ggc aag ccg acg gcc gcc ggt ccc aag gac aac ggc      96

Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly
          20          25          30

ggc gcg agc ggg tac aag gac gtg gac aag ccc ccg ttc agc ggc atg      144
Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met
          35          40          45

acc ggc tcc ggc aac acc ccc atc ttc aag tcc ggc cgg ggc agc ggc      192
Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys Ser Gly Arg Gly Ser Gly
          50          55          60

tcc tcc ttc gag atc aag agc acc aag ccc gag gcc tcc tcc ggc gag      240
Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Ser Gly Glu
          65          70          75          80

ccc gtg gtg gtc cac atc acc gac gac aac gag gag ccc atc gcc gcg      288
Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Ala
          85          90          95

tac cac ttc gac ctc tcc ggc atc gcg ttc ggg tcc atg gcc aag aag      336
Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe Gly Ser Met Ala Lys Lys
          100          105          110

ggc gac gag cag aag ctg cgc agc gcc ggc gag gtg gag atc cag ttc      384
Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly Glu Val Glu Ile Gln Phe
          115          120          125

cgc cgc gtc aag tcc aag tac ccg gag ggc acc aag gtg acc ttc cac      432
Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His
          130          135          140

gtg gag aag ggg tcc aac ccc aac tac ctg gcg ctg ctg gtg aag ttt      480
Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Phe
          145          150          155          160

gtc gcc ggc gac ggc gac gtg gtg gcg gtg gac atc aag gag aag ggc      528
Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly
          165          170          175

aag gac aag tgg atc gcg ctc aag gag tcg tgg gga gcc atc tgg agg      576
Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg
          180          185          190

atc gac acc ccg gag gtg ctc aag ggc ccc ttc acc gtc cgc tac acc      624
Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr
          195          200          205

```

acc gag ggc ggc acc aag ggc gag gcc aag gac gtc atc ccc gag ggc 672
 Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu Gly
 210 215 220

tgg aag gcc gac acc gcc tac gag tcc aag tga 705
 Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
 225 230

<210> 6

<211> 234

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 6

Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp Lys Trp Leu Asp Ala Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly
 20 25 30
 Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met
 35 40 45
 Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys Ser Gly Arg Gly Ser Gly
 50 55 60
 Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Ser Gly Glu
 65 70 75 80
 Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Ala
 85 90 95
 Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe Gly Ser Met Ala Lys Lys
 100 105 110
 Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly Glu Val Glu Ile Gln Phe
 115 120 125
 Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His
 130 135 140
 Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Phe
 145 150 155 160
 Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly
 165 170 175
 Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg
 180 185 190
 Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr
 195 200 205
 Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu Gly
 210 215 220

Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
225 230

<210> 7

<211> 633

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(633)

<223>

<400> 7

gcc gcc ggt ccc aag gac aac ggc ggc gcg agc ggg tac aag gac gtg	48
Ala Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val	
1 5 10 15	
gac aag ccc ccg ttc agc ggc atg acc ggc tcc ggc aac acc ccc atc	96
Asp Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile	
20 25 30	
ttc aag tcc ggc cgg ggc agc ggc tcc tcc ttc gag atc aag agc acc	144
Phe Lys Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr	
35 40 45	
aag ccc gag gcc tcc tcc ggc gag ccc gtg gtg gtc cac atc acc gac	192
Lys Pro Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp	
50 55 60	
gac aac gag gag ccc atc gcc gcg tac cac ttc gac ctc tcc ggc atc	240
Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile	
65 70 75 80	
gcg ttc ggg tcc atg gcc aag aag ggc gac gag cag aag ctg cgc agc	288
Ala Phe Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser	
85 90 95	
gcc ggc gag gtg gag atc cag ttc cgc cgc gtc aag tcc aag tac ccg	336
Ala Gly Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro	
100 105 110	
gag ggc acc aag gtg acc ttc cac gtg gag aag ggg tcc aac ccc aac	384
Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn	
115 120 125	
tac ctg gcg ctg ctg gtg aag ttt gtc gcc ggc gac ggc gac gtg gtg	432
Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val	
130 135 140	
gcg gtg gac atc aag gag aag ggc aag gac aag tgg atc gcg ctc aag	480

Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys
 145 150 155 160

gag tcg tgg gga gcc atc tgg agg atc gac acc ccg gag gtg ctc aag 528
 Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys
 165 170 175

ggc ccc ttc acc gtc cgc tac acc acc gag ggc ggc acc aag ggc gag 576
 Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu
 180 185 190

gcc aag gac gtc atc ccc gag ggc tgg aag gcc gac acc gcc tac gag 624
 Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu
 195 200 205

tcc aag tga 633
 Ser Lys
 210

<210> 8

<211> 210

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 8

Ala Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val
 1 5 10 15

Asp Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile
 20 25 30

Phe Lys Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr
 35 40 45

Lys Pro Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp
 50 55 60

Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile
 65 70 75 80

Ala Phe Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser
 85 90 95

Ala Gly Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro
 100 105 110

Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn
 115 120 125

Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val
 130 135 140

Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys
 145 150 155 160

Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys
 165 170 175

Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu
 180 185 190

Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu
 195 200 205

Ser Lys
 210

<210> 9

<211> 684

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(684)

<223>

<400> 9

atc ccg aag gtc ccg ccg ggc ccg aac atc acg gcg acc tac ggc gac 48
 Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp
 1 5 10 15

aag tgg ctg gac gcg aag agc acc tgg tac ggc aag ccg acg gcc gcc 96
 Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala
 20 25 30

ggt ccc aag gac aac ggc ggc gcg agc ggg tac aag gac gtg gac aag 144
 Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
 35 40 45

ccc ccg ttc agc ggc atg acc ggc tcc ggc aac acc ccc atc ttc aag 192
 Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
 50 55 60

tcc gcc cgg gcc agc gcc tcc tcc ttc gag atc aag agc acc aag ccc 240
 Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro
 65 70 75 80
 gag gcc tcc tcc gcc gag ccc gtg gtg gtc cac ttc gac ctc tcc gcc 288
 Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Phe Asp Leu Ser Gly
 85 90 95
 atc gcg ttc ggg tcc atg gcc aag aag gcc gac gag cag aag ctg cgc 336
 Ile Ala Phe Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg
 100 105 110
 agc gcc gcc gag gtg gag atc cag ttc cgc cgc gtc aag tcc aag tac 384
 Ser Ala Gly Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr
 115 120 125
 ccg gag gcc acc aag gtg acc ttc cac gtg gag aag ggg tcc aac ccc 432
 Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro
 130 135 140
 aac tac ctg gcg ctg ctg gtg aag ttt gtc gcc gcc gac gcc gac gtg 480
 Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val
 145 150 155 160
 gtg gcg gtg gac atc aag gag aag gcc aag gac aag tgg atc gcg ctc 528
 Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu
 165 170 175
 aag gag tgg tgg gga gcc atc tgg agg atc gac acc ccg gag gtg ctc 576
 Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu
 180 185 190
 aag gcc ccc ttc acc gtc cgc tac acc acc gag gcc gcc acc aag gcc 624
 Lys Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly
 195 200 205
 gag gcc aag gac gtc atc ccc gag gcc tgg aag gcc gac acc gcc tac 672
 Glu Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr
 210 215 220
 gag tcc aag tga 684
 Glu Ser Lys
 225

<210> 10

<211> 227

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 10

Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp
 1 5 10 15

Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala
20 25 30

Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
35 40 45

Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
50 55 60

Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro
65 70 75 80

Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Phe Asp Leu Ser Gly
85 90 95

Ile Ala Phe Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg
100 105 110

Ser Ala Gly Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr
115 120 125

Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro
130 135 140

Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val
145 150 155 160

Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu
165 170 175

Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu
180 185 190

Lys Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly
195 200 205

Glu Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr
210 215 220

Glu Ser Lys
225

<210> 11

<211> 708

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(708)

<223>

<400> 11

atc ccg aag gtc ccg ccg ggc ccg aac atc acg gcg acc tac ggc gac	48
Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp	
1 5 10 15	
aag tgg ctg gac gcg aag agc acc tgg tac ggc aag ccg acg gcc gcc	96
Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala	
20 25 30	
ggt ccc aag gac aac ggc ggc gcg agc ggg tac aag gac gtg gac aag	144
Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys	
35 40 45	
ccc ccg ttc agc ggc atg acc ggc tcc ggc aac acc ccc atc ttc aag	192
Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys	
50 55 60	
tcc ggc cgg ggc agc ggc tcc tcc ttc gag atc aag agc acc aag ccc	240
Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro	
65 70 75 80	
gag gcc tcc tcc ggc gag ccc gtg gtg gtc cac atc acc gac gac aac	288
Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn	
85 90 95	
gag gag ccc atc gcc gcg tac cac ttc gac ctc tcc ggc atc gcg ttc	336
Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe	
100 105 110	
ggg tcc gac gag cag aag ctg cgc agc gcc ggc gag gtg gag atc cag	384
Gly Ser Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly Glu Val Glu Ile Gln	
115 120 125	
ttc cgc cgc gtc aag tcc aag tac ccg gag ggc acc aag gtg acc ttc	432
Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe	
130 135 140	
cac gtg gag aag ggg tcc aac ccc aac tac ctg gcg ctg ctg gtg aag	480
His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys	
145 150 155 160	
ttt gtc gcc ggc gac ggc gac gtg gtg gcg gtg gac atc aag gag aag	528
Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys	
165 170 175	
ggc aag gac aag tgg atc gcg ctc aag gag tcg tgg gga gcc atc tgg	576
Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp	
180 185 190	

agg atc gac acc cgg gag gtg ctc aag ggc ccc ttc acc gtc cgc tac 624
Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr
195 200 205

acc acc gag ggc ggc acc aag ggc gag gcc aag gac gtc atc ccc gag 672
Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu
210 215 220

ggc tgg aag gcc gac acc gcc tac gag tcc aag tga 708
Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
225 230 235

<210> 12

<211> 235

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 12

Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp
1 5 10 15

Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala
20 25 30

Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
35 40 45

Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
50 55 60

Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro
65 70 75 80

Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn
85 90 95

Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe
100 105 110

Gly Ser Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly Glu Val Glu Ile Gln
115 120 125

Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe
130 135 140

His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys
 145 150 155 160

Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys
 165 170 175

Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp
 180 185 190

Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr
 195 200 205

Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu
 210 215 220

Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
 225 230 235

<210> 13

<211> 690

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(690)

<223>

<400> 13

atc ccg aag gtc ccg ccg ggc ccg aac atc acg gcg acc tac ggc gac 48
 Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp
 1 5 10 15

aag tgg ctg gac gcg aag agc acc tgg tac ggc aag ccg acg gcc gcc 96
 Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala
 20 25 30

ggt ccc aag gac aac ggc ggc gcg agc ggg tac aag gac gtg gac aag 144
 Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
 35 40 45

ccc ccg ttc agc ggc atg acc ggc tcc ggc aac acc ccc atc ttc aag 192
 Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
 50 55 60

tcc ggc cgg ggc agc ggc tcc tcc ttc gag atc aag agc acc aag ccc 240

Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro
 65 70 75 80
 gag gcc tcc tcc ggc gag ccc gtg gtg gtc cac atc acc gac gac aac 288
 Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn
 85 90 95
 gag gag ccc atc gcc gcg tac cac ttc gac ctc tcc ggc atc gcg ttc 336
 Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe
 100 105 110
 ggg tcc atg gcc aag aag ggc gac gag cag aag ctg cgc agc gcc ggc 384
 Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly
 115 120 125
 gag gtg gag atc cag ttc cgc cgc gtc aag tcc aag tac ccg gag ggc 432
 Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro Glu Gly
 130 135 140
 acc aag gtg acc ttc cac gtg gag aag ggc tcc aac ccc aac tac ctg 480
 Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu
 145 150 155 160
 gcg ctg ctg gtg aag ttt gtc gcc ggc gac ggc gac gtg gtg tgg atc 528
 Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Trp Ile
 165 170 175
 gcg ctc aag gag tgg tgg gga gcc atc tgg agg atc gac acc ccg gag 576
 Ala Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu
 180 185 190
 gtg ctc aag ggc ccc ttc acc gtc cgc tac acc acc gag ggc ggc acc 624
 Val Leu Lys Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr
 195 200 205
 aag ggc gag gcc aag gac gtc atc ccc gag ggc tgg aag gcc gac acc 672
 Lys Gly Glu Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr
 210 215 220
 gcc tac gag tcc aag tga 690
 Ala Tyr Glu Ser Lys
 225

<210> 14

<211> 229

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 14

Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp
 1 5 10 15
 Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala
 20 25 30

Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
 35 40 45

Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
 50 55 60

Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro
 65 70 75 80

Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn
 85 90 95

Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe
 100 105 110

Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly
 115 120 125

Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro Glu Gly
 130 135 140

Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu
 145 150 155 160

Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Trp Ile
 165 170 175

Ala Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu
 180 185 190

Val Leu Lys Gly Pro Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr
 195 200 205

Lys Gly Glu Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr
 210 215 220

Ala Tyr Glu Ser Lys
 225

<210> 15

<211> 699

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(699)

<223>

<400> 15

atc ccg aag gtc ccg ccg ggc ccg aac atc acg gcg acc tac ggc gac	48
Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp	
1 5 10 15	
aag tgg ctg gac gcg aag agc acc tgg tac ggc aag ccg acg gcc gcc	96
Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala	
20 25 30	
ggt ccc aag gac aac ggc ggc gcg agc ggg tac aag gac gtg gac aag	144
Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys	
35 40 45	
ccc ccg ttc agc ggc atg acc ggc tcc ggc aac acc ccc atc ttc aag	192
Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys	
50 55 60	
tcc ggc cgg ggc agc ggc tcc tcc ttc gag atc aag agc acc aag ccc	240
Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro	
65 70 75 80	
gag gcc tcc tcc ggc gag ccc gtg gtg gtc cac atc acc gac gac aac	288
Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn	
85 90 95	
gag gag ccc atc gcc gcg tac cac ttc gac ctc tcc ggc atc gcg ttc	336
Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe	
100 105 110	
ggg tcc atg gcc aag aag ggc gac gag cag aag ctg cgc agc gcc ggc	384
Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly	
115 120 125	
gag gtg gag atc cag ttc cgc cgc gtc aag tcc aag tac ccg gag ggc	432
Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro Glu Gly	
130 135 140	
acc aag gtg acc ttc cac gtg gag aag ggg tcc aac ccc aac tac ctg	480
Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu	
145 150 155 160	
gcg ctg ctg gtg aag ttt gtc gcc ggc gac ggc gac gtg gtg gcg gtg	528
Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val	
165 170 175	
gac atc aag gag aag ggc aag gac aag tgg atc gcg ctc aag gag tcg	576
Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser	
180 185 190	
tgg gga gcc atc tgg agg atc gac acc ccg gag gtg ctc aag ggc ccc	624

Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro
 195 200 205

ttc acc gtc cgc ggc gag gcc aag gac gtc atc ccc gag ggc tgg aag 672
 Phe Thr Val Arg Gly Glu Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys
 210 215 220

gcc gac acc gcc tac gag tcc aag tga 699
 Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
 225 230

<210> 16
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Phleum pratense

<400> 16

Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp
 1 5 10 15

Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala
 20 25 30

Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
 35 40 45

Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
 50 55 60

Ser Gly Arg Gly Ser Gly Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro
 65 70 75 80

Glu Ala Ser Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn
 85 90 95

Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe
 100 105 110

Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly
 115 120 125

Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser Lys Tyr Pro Glu Gly
 130 135 140

Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu
 145 150 155 160

Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val
 165 170 175

Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser
 180 185 190

Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro
 195 200 205

Phe Thr Val Arg Gly Glu Ala Lys Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys
 210 215 220

Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
 225 230

<210> 17

<211> 666

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(666)

<223>

<400> 17

ggc ccg aac atc acg gcg acc tac ggc gac aag tgg ctg gac gcg aag 48
 Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp Lys Trp Leu Asp Ala Lys
 1 5 10 15

agc acc tgg tac ggc aag ccg acg gcc gcc ggt ccc aag gac aac ggc 96
 Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly
 20 25 30

ggc gcg agc ggg tac aag gac gtg gac aag ccc ccg ttc agc ggc atg 144
 Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met
 35 40 45

acc ggc tcc ggc aac acc ccc atc ttc aag tcc ggc cgg ggc agc ggc 192
 Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys Ser Gly Arg Gly Ser Gly
 50 55 60

tcc tcc ttc gag atc aag agc acc aag ccc gag gcc tcc tcc ggc gag 240
 Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Ser Gly Glu
 65 70 75 80

```

ccc gtg gtg gtc cac atc acc gac gac aac gag gag ccc atc gcc gcg      288
Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Ala
      85                      90                      95

tac cac ttc gac ctc tcc ggc atc gcg ttc ggg tcc gac gag cag aag      336
Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe Gly Ser Asp Glu Gln Lys
      100                    105                    110

ctg cgc agc gcc ggc gag gtg gag atc cag ttc cgc cgc gtc aag tcc      384
Leu Arg Ser Ala Gly Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser
      115                    120                    125

aag tac ccg gag ggc acc aag gtg acc ttc cac gtg gag aag ggg tcc      432
Lys Tyr Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser
      130                    135                    140

aac ccc aac tac ctg gcg ctg ctg gtg aag ttt gtc gcc ggc gac ggc      480
Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly
      145                    150                    155                    160

gac gtg gtg gcg gtg gac atc aag gag aag ggc aag gac aag tgg atc      528
Asp Val Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile
      165                    170                    175

gcg ctc aag gag tgg tgg gga gcc atc tgg agg atc gac acc ccg gag      576
Ala Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu
      180                    185                    190

gtg ctc aag ggc ccc ttc acc gtc cgc ggc gag gcc aag gac gtc atc      624
Val Leu Lys Gly Pro Phe Thr Val Arg Gly Glu Ala Lys Asp Val Ile
      195                    200                    205

ccc gag ggc tgg aag gcc gac acc gcc tac gag tcc aag tga      666
Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
      210                    215                    220

```

<210> 18

<211> 221

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 18

```

Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp Lys Trp Leu Asp Ala Lys
1                      5                      10                      15

```

```

Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala Gly Pro Lys Asp Asn Gly
20                    25                    30

```

```

Gly Ala Ser Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys Pro Pro Phe Ser Gly Met
35                    40                    45

```

Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys Ser Gly Arg Gly Ser Gly
50 55 60

Ser Ser Phe Glu Ile Lys Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Ser Gly Glu
65 70 75 80

Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn Glu Glu Pro Ile Ala Ala
85 90 95

Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe Gly Ser Asp Glu Gln Lys
100 105 110

Leu Arg Ser Ala Gly Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Ser
115 120 125

Lys Tyr Pro Glu Gly Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser
130 135 140

Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly
145 150 155 160

Asp Val Val Ala Val Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile
165 170 175

Ala Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu
180 185 190

Val Leu Lys Gly Pro Phe Thr Val Arg Gly Glu Ala Lys Asp Val Ile
195 200 205

Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ala Tyr Glu Ser Lys
210 215 220

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 19
atcccgaagg tcccgccg

18

<210> 20

<211> 63

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 20

atcccgaagg tcccgccggg ccggaacatc acggcgacct acggcgacaa gtggctggac 60
gcg 63

<210> 21

<211> 63

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 21

gttgctcttg ggaccggcgg ccgtcggctt gccgtaccag gtgctcttcg cgtccagcca 60
ctt 63

<210> 22

<211> 62

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 22

ggtcccaagg acaacggcgg cgcgagcggg tacaaggacg tggacaagcc ccggttcagc 60
gg 62

<210> 23

<211> 69

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 23

gagccgctgc cccggccgga cttgaagatg ggggtgttgc cggagccggt catgccgctg 60
aacggggggc 69

<210> 24

<211> 69

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 24

tccggccggg gcagcggctc ctccttcgag atcaagagca ccaagcccga ggcctcctcc 60

ggcgagccc 69

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 25

ggtaagcttt cacttggact cgtaggcggt 30

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 26

tccgggtact tggacttgac gcg 23

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 27

cgcgtcaagt ccaagtaccc gga 23

<210> 28

<211> 42

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 28
ccgaacatca cggcgaccta cggcgacaag tggctggacg cg 42

<210> 29

<211> 69

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 29
gtcgaagtgg tacgcggcga tgggctcctc gttgtcgtcg gtgatgtgga ccaccacggg 60
ctcgccgga 69

<210> 30

<211> 69

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 30
gccgcgtacc atttcgacct ctccggcctc gcgttcgggt ccgacgagca gaagctgcgc 60
agcgcgggc 69

<210> 31

<211> 96

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 31
ggtaagcttt cacttggact cgtaggcggt gtcggccttc cagccctcgg ggatgacgtc 60
cttggcctcg ccgcgacgg tgaaggggcc cttgag 96

Lisboa, 31 de Agosto de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Variantes do Phl p 1, caracterizadas por apresentarem uma menor reactividade IgE do que o alergénio do tipo selvagem, e por manterem em grande medida a reactividade dos linfócitos T, e por faltarem as cisteínas das posições de aminoácidos 41, 57, 69, 72, 77, 83 e 139 que correspondem à proteína Phl p 1 madura.
2. Variantes do Phl p 1, de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas por as cisteínas das posições de aminoácidos 41, 57, 69, 72, 77, 83 e 139, que correspondem à proteína Phl p 1 madura, serem substituídas por outro aminoácido.
3. Variante do Phl p 1 de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por as cisteínas das posições de aminoácidos 41, 57, 69, 72, 77, 83 e 139, que correspondem à proteína Phl p 1 madura, serem substituídas por serina (variante Phl p 1 NoCys de acordo com a SEQ ID NO 4).
4. Variantes do Phl p 1 de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 - 3, caracterizadas por faltar pelo menos uma área ou uma combinação de áreas que corresponde aos aminoácidos 1-6, 1-30, 92-104, 115-119, 175-185 e 213-220 da sequência primária da proteína Phl p 1 madura, em relação ao alergénio do tipo selvagem.
5. Variantes do Phl p 1, de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 - 4, nas quais faltam os aminoácidos

213 - 220 que correspondem à sequência Phl p 1 madura.

6. Variante do Phl p 1 de acordo com a reivindicação 4 ou 5, na qual as cisteínas 41, 57, 69, 72, 77, 83 e 139 da proteína madura são substituídas por serina, e na qual faltam os aminoácidos 213-220 (variante Phl p 1 NoCys Δ 213-220 de acordo com a SEQ ID NO 16).
7. Variante do Phl p 1 de acordo com a reivindicação 4, na qual faltam os aminoácidos 1-6, 115-119 e 213-220 correspondendo à sequência do Phl p 1 madura.
8. Variante do Phl 1 de acordo com a reivindicação 4 ou 7, na qual as cisteínas 41, 57, 69, 72, 77, 83 e 139 da proteína madura são substituídas por serina, e na qual faltam os aminoácidos 1-6, 115-119 e 213-220 (variante Phl p 1 NoCys Δ 1-6, 115-119 e 213-220 de acordo com a SEQ ID NO 18).
9. Variantes do Phl p 1 de acordo com as reivindicações 1 - 8, caracterizadas por terem sido obtidas por métodos recombinantes de engenharia genética.
10. Moléculas de ADN que codificam as variantes de alergénios de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 - 9.
11. Vector de expressão recombinante que contém uma molécula de ADN de acordo com a reivindicação 10, ligado de forma funcional a uma sequência de controlo de expressão.
12. Organismo hospedeiro não-humano, transformado com uma

molécula de ADN de acordo com a reivindicação 10 ou com um vector de expressão de acordo com a reivindicação 11.

13. Processo para a produção de uma variante de alergénio de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 - 9, por meio de cultura de um organismo hospedeiro de acordo com a reivindicação 18, e por meio da obtenção da respectiva variante de alergénio da cultura.
14. Variante de alergénio de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 - 9 como medicamento.
15. Preparação farmacêutica que contém pelo menos uma variante de alergénio correspondendo a uma ou mais das reivindicações 1 - 9 e, eventualmente, outras substâncias activas e/ou substâncias auxiliares no tratamento preventivo e terapêutico de alergias, em cujo desencadeamento estão implicados os alergénios do grupo 1 das espécies da família *Poaceae*.
16. Utilização de pelo menos uma variante de alergénio de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 - 9, na produção de um medicamento destinado à prevenção e à terapia de alergias, em cujo desencadeamento estão implicados os alergénios do grupo 1 de espécies da *Poaceae*.
17. Molécula de ADN de acordo com a reivindicação 10 como medicamento.
18. Vector de expressão recombinante de acordo com a reivindicação 11 como medicamento.

19. Preparação farmacêutica que contém pelo menos uma molécula de ADN de acordo com a reivindicação 10 ou pelo menos um vector de expressão de acordo com a reivindicação 18 e, eventualmente, outras substâncias activas e/ou substâncias auxiliares na vacinação imunoterapêutica de ADN de doentes com alergias, em cujo desencadeamento estão implicados os alérgenos do grupo 1 das *Poaceae*, e/ou tendo em vista a prevenção deste tipo de alergias.
20. Utilização de pelo menos uma molécula de ADN de acordo com a reivindicação 10 ou de pelo menos um vector de expressão de acordo com a reivindicação 18, na produção de um medicamento destinado à vacinação imunoterapêutica de ADN de doentes com alergias, em cujo desencadeamento estão implicados os alérgenos do grupo 1 das *Poaceae* e/ou tendo em vista a prevenção deste tipo de alergias.

Lisboa, 31 de Agosto de 2009

Figura 1:

```

1  : I P K V P P G P N I T A T Y G D K W L D A K S T W Y G K : P  Phi p 1 Wt GenBank Z27090
1  : I A K V P P G P N I T A T Y G D K W L D A K S T W Y G K : P  Poa p 1 GenBank AJ131850
1  : I A K V P P G P N I T A T Y G D K W L D A K S T W Y G K : P  Hol i 1 GenBank AJ012714
1  : I A K V P P G P N I T A T Y G D K W L D A K S T W Y G K : P  Lol p 1 GenBank M35687
1  A M G D : K P G P N I T A T Y G D K W L D A K A T E Y G S D P  Cyn d 1 GenBank AF177379
1  G E P K V P P G P N I T I S Y G D K W L E A K A T W Y G A : P  Ory s 1 GenBank AF261270.1
1  : I A K V P P G P N I T A E Y G D K W L D A K S T W Y G K : P  Pha a 1 GenBank S80654

30  T A A G P K D N G G A C G Y K D V D K P P F S G M T G C G N T  Phi p 1 Wt GenBank Z27090
30  T G A G P K D N G G A C C G Y K D V D K A P F S G M T G C G N T  Poa p 1 GenBank AJ131850
30  T G A G P K D N G G A C C G Y K D V D K P P F S G M T G C G N T  Hol i 1 GenBank AJ012714
30  T G A G P K D N G G A C C G Y K D V D K A P F N G M T G C G N T  Lol p 1 GenBank M35687
31  B G A A P D D H G G A C C G Y K D V D K A P F Q G M T G C G N E  Cyn d 1 GenBank AF177379
31  K G A G P K D N G G A C C G Y K D V D K A P F L G M N S C G N D  Ory s 1 GenBank AF261270.1
30  T G A G P K D N G G A C G Y K D V D K A P F N G M T G C G N T  Pha a 1 GenBank S80654

61  P I F K S G R G C G S C F E I K C T K P E A C S G E P V V V H  Phi p 1 Wt GenBank Z27090
61  P I F K S G R G C G S C F E I K C T K P E S C S G E P V L V H  Poa p 1 GenBank AJ131850
61  P I F K S G R G C G S C F E I K C T K P E S C S G E P I V V H  Hol i 1 GenBank AJ012714
61  P I F K D G R G C G S C F E I K C T K P E S C S G E A V I V I  Lol p 1 GenBank M35687
62  P I F K D G L G C G S C F E I K C S K P E A C S G E P V L I K  Cyn d 1 GenBank AF177379
62  P I F K D G K G C G S C F E I K C S K P E A C S D K P A L I H  Ory s 1 GenBank AF261270.1
61  P I F K D G R G C G S C F E L K C S K P E S C S G E P I I V H  Pha a 1 GenBank S80654

92  I T D D N E E P I A A Y H F D L S G I A F G S M A K K G D E Q  Phi p 1 Wt GenBank Z27090
92  I T D D N E E P I A A Y H F D L S G K A F G A M A K K G E E Q  Poa p 1 GenBank AJ131850
92  I T D D N E E P I A A Y H L D L S G K A F G A M A K K G E E Q  Hol i 1 GenBank AJ012714
92  I T D D N E E P I A P Y H F D L S G H A F G S M A K K G E E Q  Lol p 1 GenBank M35687
93  I T D K N Y E H I A A Y H F D L S G K A F G A M A K K G E E D  Cyn d 1 GenBank AF177379
93  Y T D M N E E P I A A Y H F D L S G L A F G A M A K D G K D E  Ory s 1 GenBank AF261270.1
92  I T D D N E E P I A P Y H F D L S G H A F G S M A K K G E E E  Pha a 1 GenBank S80654

123 K L R S A G E V E I Q F R R V K C K Y P E G T K V T F H V E K  Phi p 1 Wt GenBank Z27090
123 K L R S A G E L E L K F R R V K C E Y P E G T K V T F H V E K  Poa p 1 GenBank AJ131850
123 K L R S A G E L E L K F R R V K C E Y P K G T K V T F H V E K  Hol i 1 GenBank AJ012714
123 N Y R S A G E L E L Q F R R V K C K Y P D Q T K P T F H V E K  Lol p 1 GenBank M35687
124 K L R K A G E L M L Q F R R V K C E Y P S D T K I T F H V E K  Cyn d 1 GenBank AF177379
124 E L R K A G I I D I O F R R V K C K Y P A D T K I T F H I E K  Ory s 1 GenBank AF261270.1
123 N Y R S A G E L E L Q F R R V K C K Y P D Q T K P T F H V E K  Pha a 1 GenBank S80654

154 G S N P N Y L A L L V K F V A G D G D V V A V D I K E K G K D  Phi p 1 Wt GenBank Z27090
154 G S N P N Y L A L L V K Y V I G D G D V V A V D I K E K G K D  Poa p 1 GenBank AJ131850
154 G S N P N Y L A L L V K Y V D G D G D V V A V D I K E K G K D  Hol i 1 GenBank AJ012714
154 G S N P N Y L A I L V K Y V D G D G D V V A V D I K E K G K D  Lol p 1 GenBank M35687
155 G S S P N Y L A L L V K Y A A G D G N I V G V D I K E K G S D  Cyn d 1 GenBank AF177379
155 A S N P N Y L A L L V K Y V A G D G D V V E V E I K E K G S E  Ory s 1 GenBank AF261270.1
154 G S N P N Y L A L L V K Y V D G D G D V V A V D I K E K G K D  Pha a 1 GenBank S80654

185 K W I A L K E S W G A I W R I D T P E V L K G P F T V R Y T T  Phi p 1 Wt GenBank Z27090
185 K W I E L K E S W G S I W R V D T P D K L I G P F T V R Y T T  Poa p 1 GenBank AJ131850
185 K W I E L K E S W G A V W R V D T P D K L I G P F T V R Y T T  Hol i 1 GenBank AJ012714
185 K W I E L K E S W G A V W R I D T P D K L I G P F T V R Y T T  Lol p 1 GenBank M35687
186 V E L P M K L S W G A I W R M D P P K E L I G P F T I R L T S  Cyn d 1 GenBank AF177379
185 E W K A L K E S W G A I W R I D T P K E L K G P F S V R V T T  Ory s 1 GenBank AF261270.1
185 K W I E L K E S W G A I W R I D T P D K L I G P F T V R Y T T  Pha a 1 GenBank S80654

216 E G G T K G E A K D V I P E G W K A O T A Y E S : : : K  Phi p 1 Wt GenBank Z27090
216 E G G T K G E A E D V I P E G W K A O T A Y A S : : : K  Poa p 1 GenBank AJ131850
216 E G G T K Y E A E D V I P E G W K A O T A Y E S : : : K  Hol i 1 GenBank AJ012714
216 E G G T K S E V E D V I P E G W K A O T S Y S A K :  Lol p 1 GenBank M35687
217 E S G G H V E A E D V I P E G W K E D T Y Y K S K I Q E  Cyn d 1 GenBank AF177379
217 E G G E K I I A E D A I P D G W K A D S Y Y K S N V Q A K  Ory s 1 GenBank AF261270.1
216 E G G T K A E E D V I P E G W K A O T : H D A S : : : K  Pha a 1 GenBank S80654

```

Figura 2:

	10	20	30	
1	I P K V P P G P N I T A T Y G D K W L D A K S T W Y G K P T	Phil p 1 Wt GenBank Z27090		
1	I P K V P P G P N I T A T Y G D K W L D A K S T W Y G K P T	Phil p 1 NoCys		
	40	50	60	
31	A A G P K D N G G A C G Y K D V D K P P F S G M T G C G N T	Phil p 1 Wt GenBank Z27090		
31	A A G P K D N G G A [S] G Y K D V D K P P F S G M T G [S] G N T	Phil p 1 NoCys		
	70	80	90	
61	P I F K S G R G C G S C F E I K C T K P E A C S G E P V V V	Phil p 1 Wt GenBank Z27090		
61	P I F K S G R G [S] G S [S] F E I K [S] T K P E A [S] S G E P V V V	Phil p 1 NoCys		
	100	110	120	
91	H I T D D N E E P I A A Y H F D L S G I A F G S M A K K G D	Phil p 1 Wt GenBank Z27090		
91	H I T D D N E E P I A A Y H F D L S G I A F G S M A K K G D	Phil p 1 NoCys		
	130	140	150	
121	E Q K L R S A G E V E I Q F R R V K C K Y P E G T K V T F H	Phil p 1 Wt GenBank Z27090		
121	E Q K L R S A G E V E I Q F R R V K [S] K Y P E G T K V T F H	Phil p 1 NoCys		
	160	170	180	
151	V E K G S N P N Y L A L L V K F V A G D G D V V A V D I K E	Phil p 1 Wt GenBank Z27090		
151	V E K G S N P N Y L A L L V K F V A G D G D V V A V D I K E	Phil p 1 NoCys		
	190	200	210	
181	K G K D K W I A L K E S W G A I W R I D T P E V L K G P F T	Phil p 1 Wt GenBank Z27090		
181	K G K D K W I A L K E S W G A I W R I D T P E V L K G P F T	Phil p 1 NoCys		
	220	230	240	
211	V R Y T T E G G T K G E A K D V I P E G W K A D T A Y E S K	Phil p 1 Wt GenBank Z27090		
211	V R Y T T E G G T K G E A K D V I P E G W K A D T A Y E S K	Phil p 1 NoCys		

Figura 3:

		10	20	30																											
1	I	P	K	V	P	P	G	P	N	I	T	A	T	Y	G	D	K	W	L	D	A	K	S	T	W	Y	G	K	P	T	Phl p 1 NoCys
1	I	P	K	V	P	P	G	P	N	I	T	A	T	Y	G	D	K	W	L	D	A	K	S	T	W	Y	G	K	P	T	Phl p 1 NoCys d213-220
1	:	:	:	:	:	:	G	P	N	I	T	A	T	Y	G	D	K	W	L	D	A	K	S	T	W	Y	G	K	P	T	Phl p 1 NoCys d1-6,115-119,213-220
		40	50	60																											
31	A	A	G	P	K	D	N	G	G	A	S	G	Y	K	D	V	D	K	P	P	F	S	G	M	T	G	S	G	N	T	Phl p 1 NoCys
31	A	A	G	P	K	D	N	G	G	A	S	G	Y	K	D	V	D	K	P	P	F	S	G	M	T	G	S	G	N	T	Phl p 1 NoCys d213-220
25	A	A	G	P	K	D	N	G	G	A	S	G	Y	K	D	V	D	K	P	P	F	S	G	M	T	G	S	G	N	T	Phl p 1 NoCys d1-6,115-119,213-220
		70	80	90																											
61	P	I	F	K	S	G	R	G	S	G	S	S	F	E	I	K	S	T	K	P	E	A	S	S	G	E	P	V	V	V	Phl p 1 NoCys
61	P	I	F	K	S	G	R	G	S	G	S	S	F	E	I	K	S	T	K	P	E	A	S	S	G	E	P	V	V	V	Phl p 1 NoCys d213-220
55	P	I	F	K	S	G	R	G	S	G	S	S	F	E	I	K	S	T	K	P	E	A	S	S	G	E	P	V	V	V	Phl p 1 NoCys d1-6,115-119,213-220
		100	110	120																											
91	H	I	T	D	D	N	E	E	P	I	A	A	Y	H	F	D	L	S	G	I	A	F	G	S	M	A	K	K	G	D	Phl p 1 NoCys
91	H	I	T	D	D	N	E	E	P	I	A	A	Y	H	F	D	L	S	G	I	A	F	G	S	M	A	K	K	G	D	Phl p 1 NoCys d213-220
85	H	I	T	D	D	N	E	E	P	I	A	A	Y	H	F	D	L	S	G	I	A	F	G	S	:	:	:	:	:	D	Phl p 1 NoCys d1-6,115-119,213-220
		130	140	150																											
121	E	Q	K	L	R	S	A	G	E	V	E	I	Q	F	R	R	V	K	S	K	Y	P	E	G	T	K	V	T	F	H	Phl p 1 NoCys
121	E	Q	K	L	R	S	A	G	E	V	E	I	Q	F	R	R	V	K	S	K	Y	P	E	G	T	K	V	T	F	H	Phl p 1 NoCys d213-220
110	E	Q	K	L	R	S	A	G	E	V	E	I	Q	F	R	R	V	K	S	K	Y	P	E	G	T	K	V	T	F	H	Phl p 1 NoCys d1-6,115-119,213-220
		160	170	180																											
151	V	E	K	G	S	N	P	N	Y	L	A	L	L	V	K	F	V	A	G	D	G	D	V	V	A	V	D	I	K	E	Phl p 1 NoCys
151	V	E	K	G	S	N	P	N	Y	L	A	L	L	V	K	F	V	A	G	D	G	D	V	V	A	V	D	I	K	E	Phl p 1 NoCys d213-220
140	V	E	K	G	S	N	P	N	Y	L	A	L	L	V	K	F	V	A	G	D	G	D	V	V	A	V	D	I	K	E	Phl p 1 NoCys d1-6,115-119,213-220
		190	200	210																											
181	K	G	K	D	K	W	I	A	L	K	E	S	W	G	A	I	W	R	I	D	T	P	E	V	L	K	G	P	F	T	Phl p 1 NoCys
181	K	G	K	D	K	W	I	A	L	K	E	S	W	G	A	I	W	R	I	D	T	P	E	V	L	K	G	P	F	T	Phl p 1 NoCys d213-220
170	K	G	K	D	K	W	I	A	L	K	E	S	W	G	A	I	W	R	I	D	T	P	E	V	L	K	G	P	F	T	Phl p 1 NoCys d1-6,115-119,213-220
		220	230	240																											
211	V	R	Y	T	T	E	G	G	T	K	G	E	A	K	D	V	I	P	E	G	W	K	A	D	T	A	Y	E	S	K	Phl p 1 NoCys
211	V	R	:	:	:	:	:	:	:	:	G	E	A	K	D	V	I	P	E	G	W	K	A	D	T	A	Y	E	S	K	Phl p 1 NoCys d213-220
200	V	R	:	:	:	:	:	:	:	:	G	E	A	K	D	V	I	P	E	G	W	K	A	D	T	A	Y	E	S	K	Phl p 1 NoCys d1-6,115-119,213-220

Figura 4:

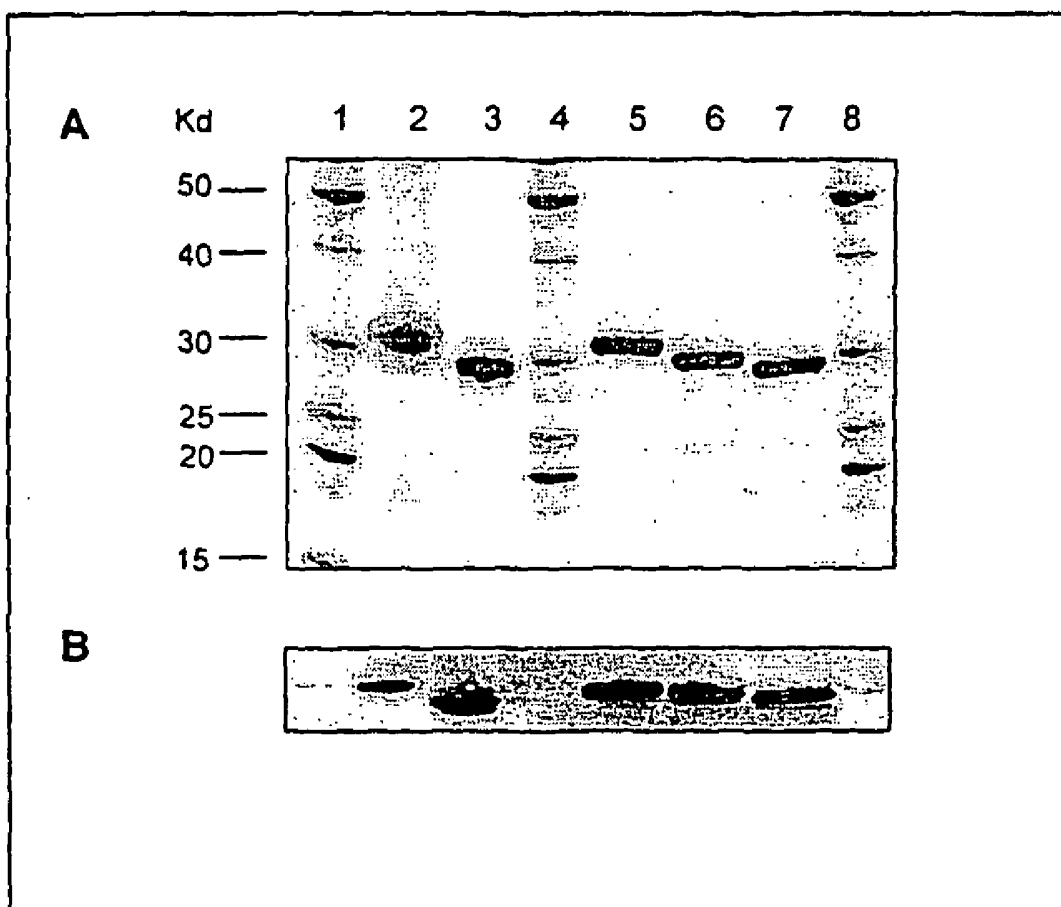


Figura 5:

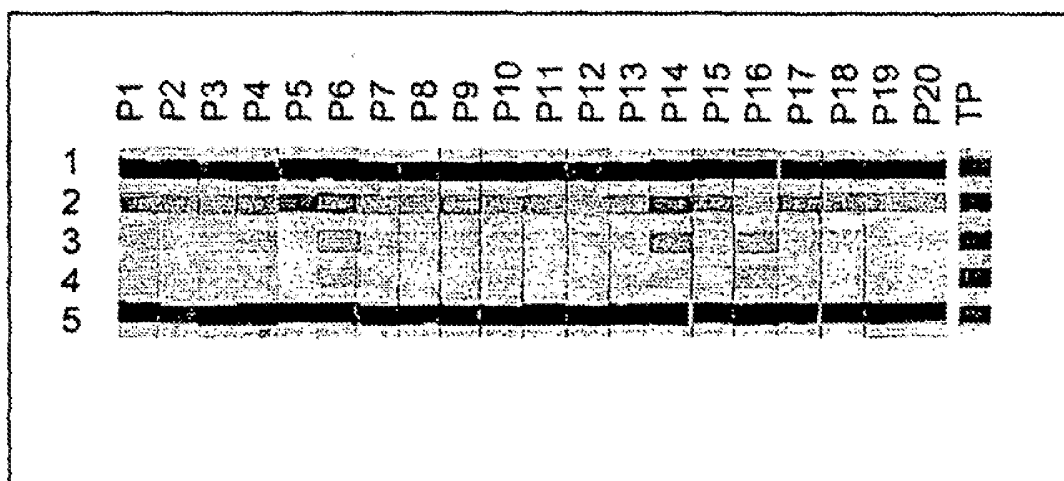


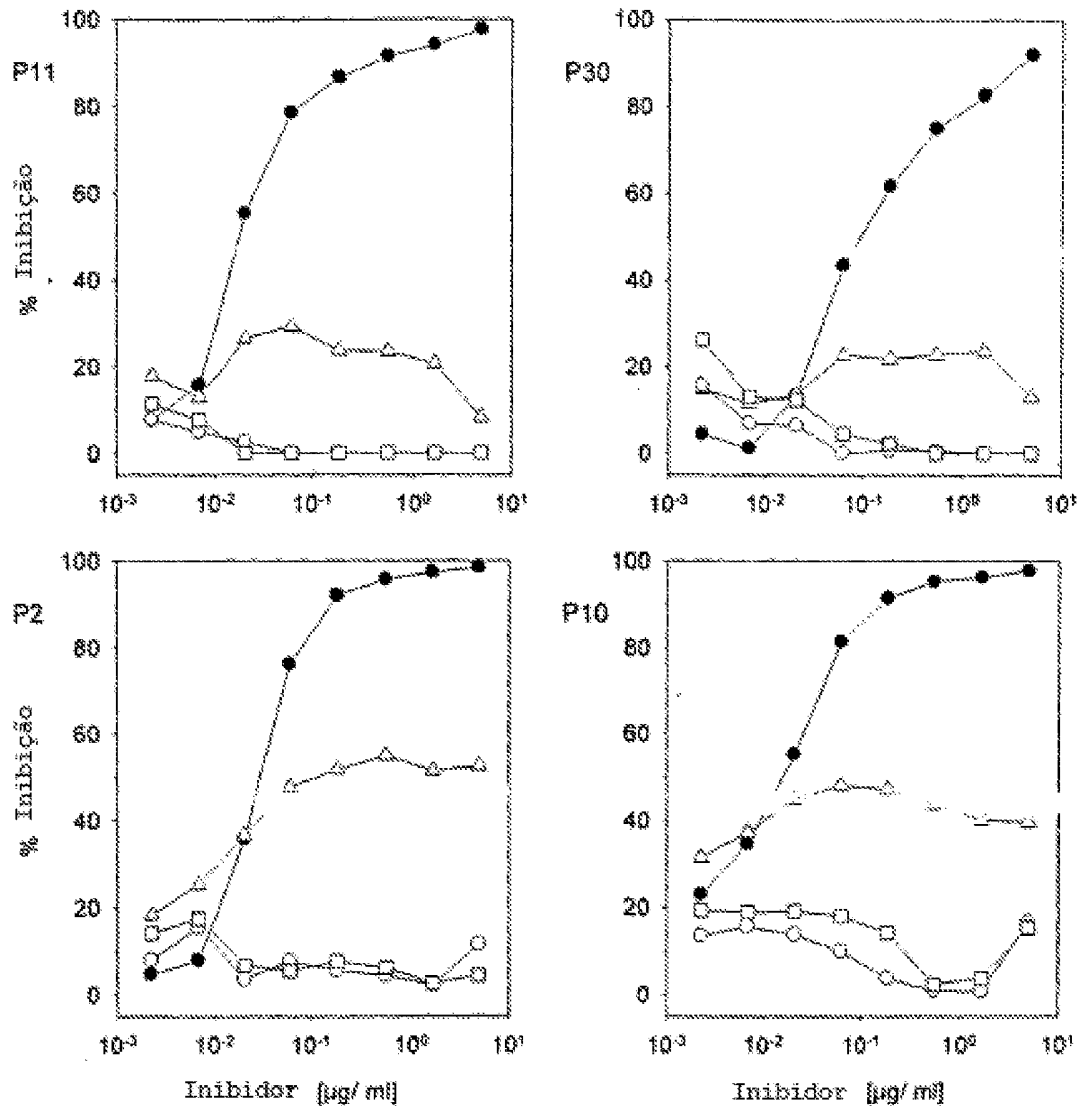
Figura 6:

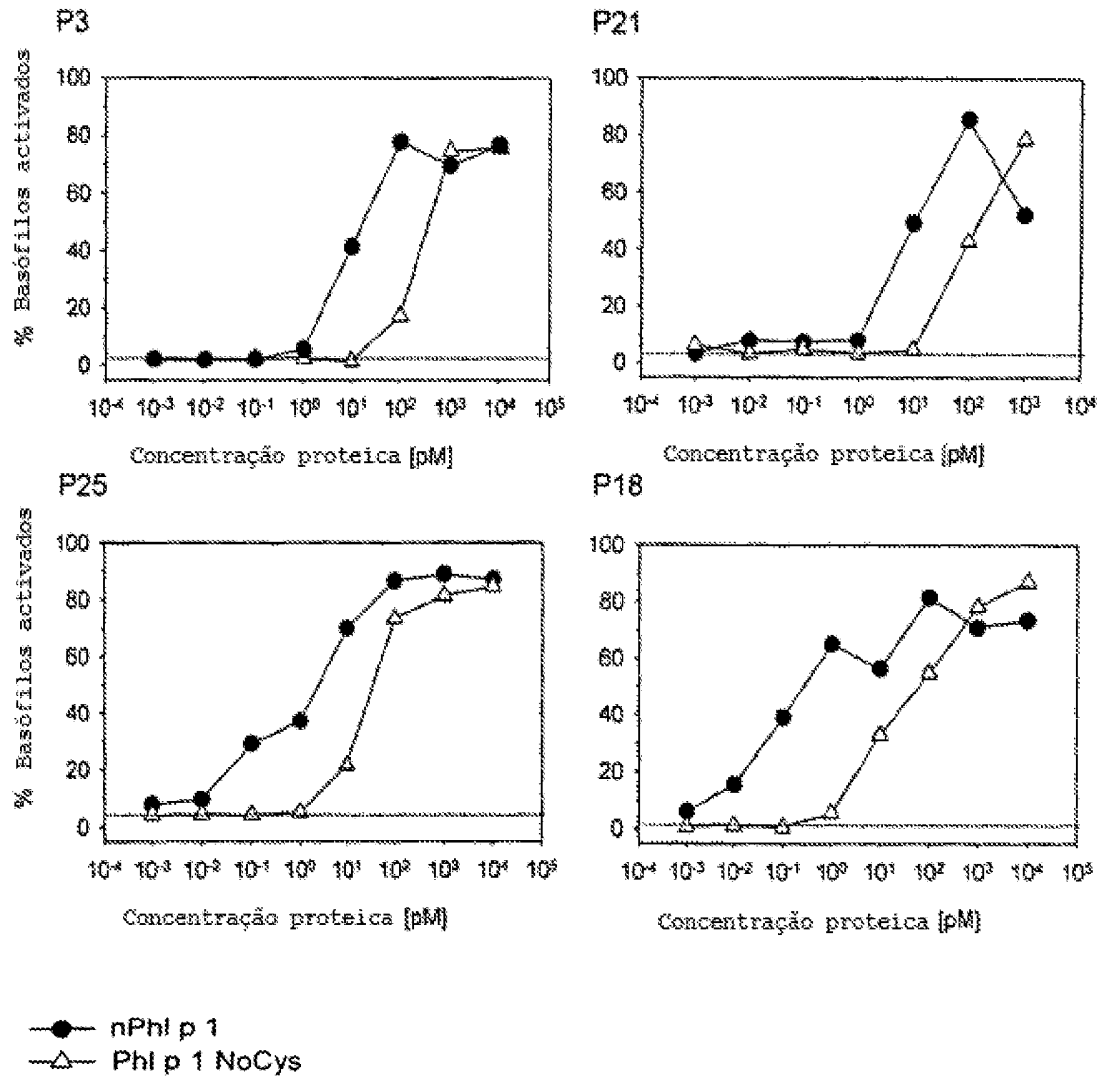
Figura 7:

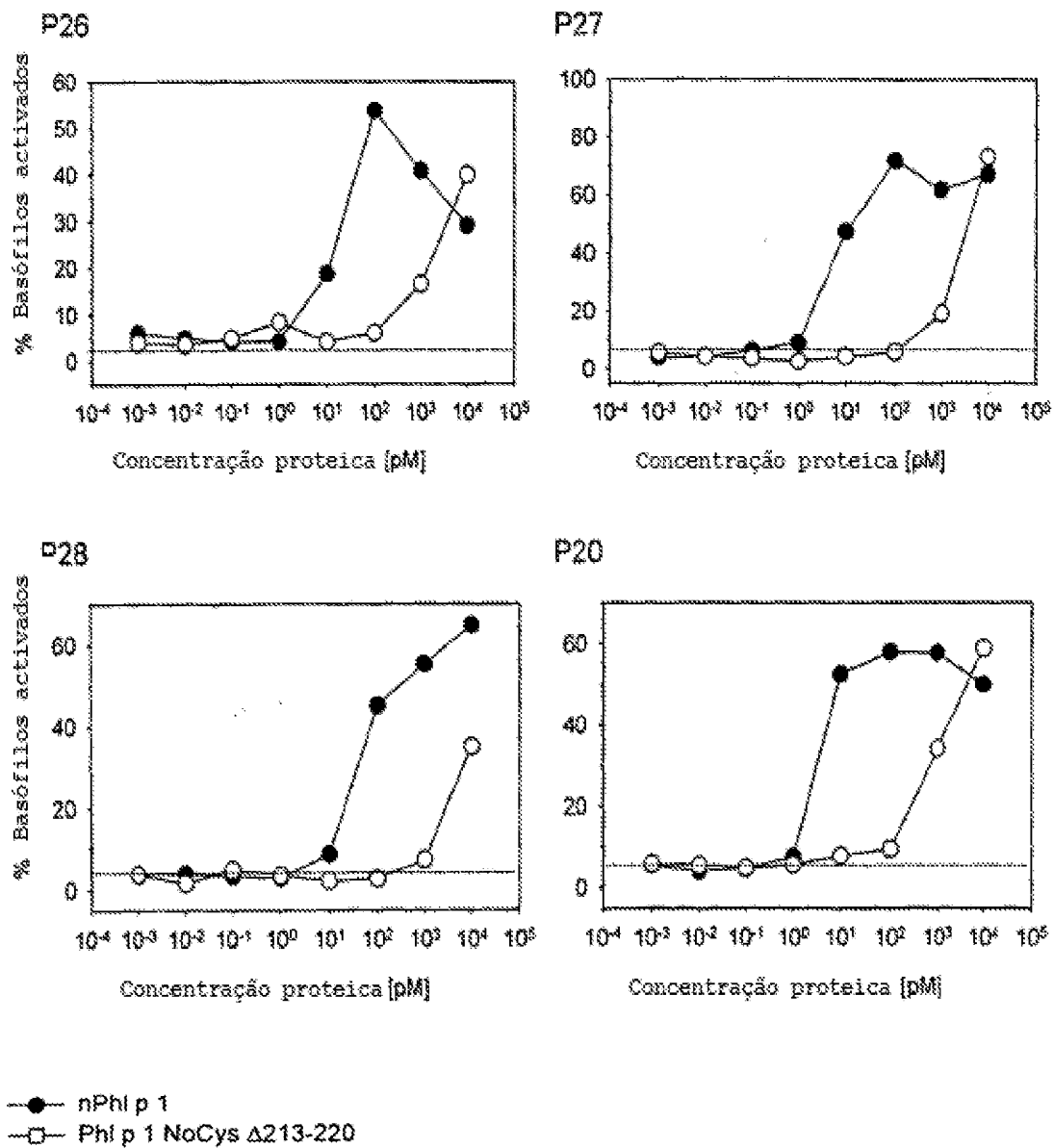
Figura 8:

Figura 9: