

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
14 de Febrero de 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 02/12503 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12N 15/29,
1/16, C07K 14/415, G01N 33/68, A61K 39/36, A61P
37/08

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES01/00287

(22) Fecha de presentación internacional:
19 de Julio de 2001 (19.07.2001)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200001919 28 de Julio de 2000 (28.07.2000) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**
[ES/ES]; Rectorado Avenida de Sénica, 2, E-28040 Madrid
(ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **RO-
DRIGUEZ GARCIA, Rosalia** [ES/ES]; Secc. Dptal.

Bioquímica y Biología Molecular, Facultad CC. Biológicas,
Universidad Complutense de Madrid, E-28015 Madrid
(ES). **VILLALBA DIAZ, Maria, Teresa** [ES/ES]; Secc.
Dptal. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad
CC. Biológicas, Universidad Complutense de Madrid,
E-28040 Madrid (ES). **MONSALVE CLEMENTE,
Rafael** [ES/ES]; Secc. Dptal. Bioquímica y Biología
Molecular, Facultad CC. Biológicas, Universidad Com-
plutense de Madrid, E-28040 Madrid (ES). **BATANERO
CREMADES, Eva** [ES/ES]; Secc. Dptal. Bioquímica y
Biología Molecular, Facultad CC. Biológicas, Universidad
Complutense de Madrid, E-28040 Madrid (ES).

(81) Estados designados (nacional): AU, CA, JP, US.

(84) Estados designados (regional): patente europea (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: PRODUCTION OF PICHIA PASTORIS YEAST AND SYSTEM FOR PURIFYING THE RECOMBINANT ALLER-
GEN OF OLEA EUROPAEA OLE E 1 FOR UTILIZATION IN THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF ALLERGIES

(54) Título: PRODUCCIÓN EN LA LEVADURA PICHIA PASTORIS Y SISTEMA DE PURIFICACIÓN DEL ALERGENO RE-
COMBINANTE DE OLEA EUROPAEA OLEE 1 PARA USO EN DIAGNOSIS Y TRATAMIENTO DE ALERGIAS

(57) Abstract: The invention relates to the production of *Pichia pastoris* yeast and a system for purifying the recombinant allergen of *Olea europaea* Ole e 1 for utilization in the diagnosis and treatment of allergies. The recombinant DNA coding for allergens Ole e 1 of olive tree pollen (*Olea europaea*), Syr v 1 from lilac pollen (*Syringa vulgaris*) and Lig v 1 of privet (*Ligustrum vulgare*) has been cloned and expressed. Said allergens have great structural similarity amongst them and with other pollen allergens of other Oleaceae. Recombinant proteins produced in the *Pichia pastoris* yeast are isolated with high yields, are correctly folded and exhibit immunological properties equivalent to those of natural allergens. Hence, they can be used in diagnosis protocol and immunotherapy.

(57) Resumen: Producción en la levadura *Pichia pastoris* y sistema de purificación del alérgeno recombinante de *Olea europaea* Olee 1 para uso en diagnóstico y tratamiento de alergias. Se ha clonado y expresado el DNA recombinante que codifica los alérgenos Ole e 1 de polen de olivo (*Olea europaea*), Syr v 1 de polen de lila (*Syringa vulgaris*) y Lig v 1 de polen de aligustre (*Ligustrum vulgare*). Estos alérgenos poseen una gran similitud estructural entre ellos y con otros alérgenos de polen de otras Oleaceas. Las proteínas recombinantes producidas en la levadura (*Pichia pastoris*) se aíslan con gran rendimiento, están correctamente plegadas y exhiben propiedades inmunológicas equivalentes a las de los alérgenos naturales por lo que pueden ser empleadas en protocolos de diagnóstico e inmunoterapia.



WO 02/12503 A1

TÍTULO

Producción en la levadura *Pichia pastoris* y sistema de purificación del alérgeno recombinante de *Olea europaea* Ole e 1 para uso en diagnóstico y tratamiento de alergias.

5

SECTOR DE LA TÉCNICA. OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención, según se expresa en el enunciado de esta memoria descriptiva, se refiere a uno de los alérgenos del polen de olivo (*Olea europaea*), la proteína Ole e 1, y a epítopos alérgénicos presentes en la proteína. La invención también hace referencia a los DNA recombinantes que codifican tanto a las proteínas completas como a fragmentos que incluyen uno o más epítopos de la molécula, y a moléculas homólogas de Ole e 1 con capacidad alérgénica en otras especies, como Lig v 1 de polen de aligustre (*Ligustrum vulgare*) y Syr v 1 de polen de lila (*Syringa vulgaris*). El objeto de la invención consiste, además, en la producción de las proteínas Ole e 1, Syr v 1 y Lig v 1 mediante tecnología recombinante en la levadura *Pichia pastoris*, que implica el uso de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO:1,2,3,4,5,6,7,8 o de otras secuencias nucleotídicas obtenidas por mutagénesis de las secuencias SEQ ID NO:1,2,3,4,5,6,7,8.

La invención proporciona un eficaz método de aislamiento para estas proteínas con un alto rendimiento.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR A LA INVENCION

La alergia tipo I es una enfermedad que afecta a más del 20% de la población de los países industrializados. Esta afección es ocasionada por los alérgenos, presentes tanto en organismos y productos biológicos -alimentos, ácaros, venenos de insectos, pólenes, hongos, epitelios de mamíferos-, como en materiales de síntesis. En la mayor parte de las fuentes biológicas alérgénicas, los alérgenos

son proteínas de masas moleculares comprendidas entre 5 y 70 kDa. Los síntomas que se derivan de la alergia, tales como rinitis, conjuntivitis, o asma, son provocados por la liberación de mediadores celulares, como la histamina, desde basófilos y mastocitos, células del sistema inmune. Dicha liberación viene inducida por el entrecruzamiento de anticuerpos IgEs unidos a los receptores de alta afinidad FcεRI, los cuales se encuentran a su vez anclados a basófilos y mastocitos. El entrecruzamiento de las IgE es provocado por la unión del correspondiente alérgeno, o un fragmento suyo, a través de un epítipo IgE (contenido en dicho alérgeno, o en su fragmento). La terapia que actualmente se viene utilizando para tratar la alergia implica la hiposensibilización del paciente mediante la administración por vía parental u oral de dosis adecuadas del propio alérgeno, o alérgoides relacionados. En la práctica totalidad de los casos se administra un extracto alérgénico obtenido, mediante una mínima manipulación, de la fuente biológica natural, lo que implica a una mezcla muy compleja de proteínas y otras sustancias, en la cual, el alérgeno -o alérgenos- puede representar una parte ínfima del producto total utilizado.

En efecto, en la actualidad, los protocolos utilizados para la diagnosis de casos de alergia y su posterior inmunoterapia implican el uso de extractos alérgénicos que frecuentemente no están caracterizados, ni siquiera estandarizados respecto a los alérgenos más importantes que pueden contener. A menudo, su administración no proporciona una diagnosis completa, sobre todo cuando la hipersensibilidad del paciente se refiere a alérgenos presentes en baja concentración en dichos extractos. Por otro lado, la inmunoterapia realizada con estas preparaciones es frecuentemente ineficaz y origina en ocasiones efectos secundarios indeseables que pueden llegar

a ser más graves que la propia afección alérgica que se pretende resolver. Una alternativa a la utilización de estos extractos es la preparación de mezclas de los alergenos más significativos, obtenidos por aislamiento de su fuente natural. Sin embargo, esta vía presenta dos importantes barreras. Por un lado, implica un buen conocimiento de los componentes alergénicos del material que provoca la alergia, al menos de todos sus alergenos principales, y este dato, frecuentemente, no esta disponible. Por otro lado, el proceso de aislamiento de los alergenos conocidos, a partir del material biológico, es a menudo difícil y no proporciona las cantidades necesarias o la calidad requerida para un posterior empleo, debido fundamentalmente a los bajos niveles en los cuales se encuentra. Todos estos problemas se acentúan cuando el material alergénico es el polen de una especie vegetal. La gran cantidad de pigmentos, carbohidratos, lípidos y componentes insolubles hacen muy difícil su manipulación. Ni que decir tiene que su disponibilidad es, además, muy reducida y de alto coste económico, debido a la dificultad de su recolección. Por todo lo expuesto, se hace necesario el diseño de procedimientos para la producción de alergenos a utilizar en los protocolos de diagnosis e inmunoterapia de la alergia. La producción de DNA recombinante se prevé como la forma más reproducible y eficaz de obtención de polipéptidos alergénicos bien definidos, no sólo para uso clínico, sino incluso para investigación.

La polinosis a olivo es una de las más importantes causas de alergia en países del área mediterránea, donde la aceituna es intensamente cultivada. En la actualidad, se conocen varios alergenos del polen de olivo, siendo Ole e 1 el que muestra una mayor incidencia entre los pacientes alérgicos a olivo ya que afecta a más del 70% de éstos. Ole e 1 es una glicoproteína constituida por 145 aminoácidos -

que corresponde a 16.3 kDa- y una fracción de carbohidrato de 1.5 kDa [Villalba, M, et al. Eur. J. Biochem. 216, 863-869 (1993)]. El DNA que codifica a Ole e 1 ha sido clonado, secuenciado y expresado en *E. coli*, por los inventores

5 [Villalba, M., et al. J. Biol. Chem. 269, 15217-15222, 1994], habiéndose determinado que se presenta en el polen con un alto grado de polimorfismo. Así mismo, se han caracterizado las propiedades antigénicas de la fracción glicosídica [Batanero, E., et al. J. Allergy Clin. Immunol.

10 97, 1264-71, 1996; Batanero, E., et al. J. Allergy Clin. Immunol. 103, 147-53, 1999], y su localización tisular [Martín-Orozco, E., et al. Int. Arch. Allergy Immunol. 104, 160-170, 1994]. Por otro lado, Las proteínas homólogas de Ole e 1 en polen de aligustre (*Ligustrum vulgare*), Lig v 1,

15 y en polen de lila (*Syringa vulgaris*), Syr v 1, se han aislado de su fuente natural, y han originado una reacción alérgica cruzada con Ole e 1, frente a los sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo. El cDNA específico que codifica estas proteínas ha sido clonado, secuenciado,

20 y expresado en *E. coli* [Batanero E., et al. Clin. Exp. Allergy 26, 1401-1410, 1996; Batanero E., et al. Eur. J. Biochem. 221, 187-193, 1994].

EXPLICACION DE LA INVENCION

25 La presente invención se refiere a la producción en la levadura *Pichia pastoris* y purificación del alérgeno recombinante de *Olea europaea* Ole e 1.

Por medio del procedimiento, objeto de la invención, se obtienen moléculas de DNA recombinante que codifican

30 polipéptidos que exhiben la antigenicidad de Ole e 1, un alérgeno de olivo (*Olea europaea*) y de otras plantas (lila y aligustre) que poseen alérgenos homólogos de Ole e 1, así como para polipéptidos que contengan al menos un epítipo de Ole e 1 en su estructura. La invención dispone de

secuencias polinucleotídicas de DNA que hibriden en condiciones restrictivas con las descritas antes -lo que implica un nivel de identidad de al menos un 60% entre sus secuencias de nucleótidos-, o bien sean derivadas de ellas por degeneración del código genético o mutagénesis.

El procedimiento de obtención del alérgeno recombinante de "Olea europaea Ole e 1", incluye vectores de expresión y células huésped que contengan una secuencia de nucleótidos como las descritas en SEQ N°1,2,3,4,5,6,7, codificantes de Ole e 1, proteínas homólogas o fragmentos suyos.

Mediante el procedimiento objeto de esta invención se obtienen polipéptidos que poseen la actividad antigénica del alérgeno Ole e 1 de olivo o de fragmentos suyos, así como de alérgenos homólogos de Ole e 1 -principalmente en especies relacionadas con el olivo, como son todas las *Oleaceae*- que, dada la similitud estructural, al menos un 60%, presenten reactividad alérgica cruzada con Ole e 1 o con una parte de él.

Estos polipéptidos pueden contener la secuencia antigénica unida a otros polipéptidos (por ejemplo como proteínas de fusión), o haber sido modificados química o enzimáticamente.

Los métodos de preparación de estos polipéptidos implican su producción recombinante a partir de las moléculas polinucleotídicas arriba mencionadas, en un sistema de cultivo de células eucarióticas que contienen como vehículo de esos DNA los vectores de expresión descritos. Una vez producida la molécula polipeptídica con actividad antigénica de Ole e 1 o epítomos suyos, ésta es aislada del medio extracelular del cultivo en forma soluble mediante cromatografías de penetrabilidad e intercambio iónico, según se describe detalladamente más adelante.

Los productos obtenidos mediante el procedimiento

objeto de la invención presentan la capacidad de unión de anticuerpos IgE del suero de pacientes alérgicos a olivo, sensibles a Ole e 1 o segmentos antigénicos suyos.

Hasta la fecha, no se ha descrito la preparación del
5 alergeno Ole e 1, con un rendimiento comparable al que se ofrece con esta invención. La obtención de proteína de su fuente natural proporciona rendimientos insuficientes y una estructura altamente polimórfica. Por otro lado, la expresión en *E. coli* del alergeno Ole e 1 (Villalba, M., et
10 al. J. Biol. Chem. 269, 15217-15222, 1994; Asturias, J.A., et al. J. Allergy Clin. Immunol. 100, 365-372, 1997], produce cantidades escasísimas de proteína y en condiciones de muy baja solubilidad debido, fundamentalmente, a un incorrecto plegamiento durante la síntesis proteica, con lo
15 que su uso posterior se hace prácticamente imposible. Con el procedimiento descrito en esta invención se producen niveles de proteína de un orden de magnitud superior: decenas de miligramos de proteína (alrededor de 60) por litro de cultivo.

20 Finalmente, con el procedimiento objeto de la invención, se dispondrá de Ole e 1 -un alergeno del polen de olivo de suma importancia clínica- inmunológicamente activo, además de fragmentos antigénicos de este alergeno, y de proteínas homólogas de él, que servirán para ser
25 incorporados en las pruebas "in vivo" e "in vitro" a realizar para la fiel diagnosis de la hipersensibilidad a este polen, y a otros pólenes relacionados filogenéticamente con él. También podrán ser empleados en las preparaciones de alergenos que se utilicen para llevar
30 a cabo la inmunoterapia correspondiente para el tratamiento de la alergia al polen de olivo.

Para el diagnóstico y la terapia de la alergia al polen de olivo se utilizan actualmente extractos proteicos obtenidos a partir del polen. Esto implica una escasa

reproducibilidad y un alto contenido en moléculas contaminantes, de origen proteico y no proteico, que pueden originar efectos secundarios adversos en los pacientes tratados. El disponer de moléculas homogéneas obtenidas por las técnicas del DNA recombinante, en cantidades ilimitadas, perfectamente cuantificables y estandarizadas, rebajará considerablemente todos los inconvenientes citados. Esta tecnología permite disponer de esas moléculas y además de péptidos o formas modificadas de las mismas que contienen al menos uno de los epítomos alergénicos.

El uso de Ole e 1 recombinante en diagnóstico in vivo, mediante pruebas cutáneas, o in vitro, mediante técnicas de inmunodetección (ELISA, RAST), permitirá precisar qué alergenos son los responsables de la sintomatología clínica de un individuo y reducir así el número de moléculas necesarias para su inmunoterapia. Se originará, por tanto, una inmunoterapia personalizada.

20

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

En el procedimiento de obtención de alergeno recombinante de "Olea europaea" Ole e 1, se utilizaron los alergenos Ole e 1, Syr v 1 y Lig v 1 purificados a partir de polen de olivo (*Olea europaea*) (Villalba, M., et al. Eur. J. Biochem.216, 863-869, 1993), de lila (*Syringa vulgaris*) (Batanero E.,et al. J. Biochem.221, 187-193, 1994) y de aligustre (*Ligustrum vulgare*) (Batanero E.,et al.Clin. Exp. Allergy 26, 1401-1410, 1996). Los pólenes fueron suministrados por la casa comercial Allergon AB. El conocimiento de la secuencia de aminoácidos de la zona amino y carboxilo terminal de Ole e 1 permitió el diseño de los oligonucleótidos con los que se abordó su clonación por PCR y expresión.

El procedimiento objeto de esta invención se realiza mediante las siguientes fases:

5 • Aislamiento de RNA total

Con este propósito se aisló el RNA total a partir del polen de olivo siguiendo el protocolo publicado por Ullrich A, et al. (Science 196, 1313-1318, 1977). En este aislamiento se partió de 0.5 g de polen que se homogeneizó
10 en un tampón 0.1 M de Tris-HCl, pH 7.5 que contenía tiocianato de guanidinio 4M y laurilsarcosinato sódico al 0.5 % y 2-mercaptoetanol 0.14 M mediante un homogeneizador Polytron. Se centrifugó esta suspensión a 5000 xg a 20 °C en una centrífuga Sorvall. Posteriormente se sometió al
15 sobrenadante a una centrifugación en gradiente de CsCl 5.7 M en 0.01 M EDTA a 40.000 rpm en un rotor SW 60 (Beckman) durante 12 horas. El mismo procedimiento se llevó a cabo para aislar otros RNAs de diferentes pólenes usados (maíz y abedul) y con los diferentes tejidos del olivo empleados
20 (tallo, hojas y frutos). Con estos últimos se introdujo una etapa inicial adicional en la que fueron macerados en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y homogéneo. A partir de 5 µg de RNA total se llevó a cabo la síntesis del DNA de doble cadena utilizando el "kit" de
25 síntesis de cDNA (Clontech).

• Clonación de Ole e 1 basado en técnicas de PCR

Como ya se ha mencionado anteriormente, los cebadores utilizados fueron diseñados teniendo en cuenta la secuencia
30 de la proteína obtenida por degradación de Edman. El método utilizado se basó en una reacción de PCR en dos etapas. En la primera de ellas, el cDNA específico de Ole e 1 que se ha usado como molde y los cebadores degenerados, OL1,

5' CARTTYCAYATZCARGGNCARGT3' y OL2,
5' ATCATTRTTNGGNGGRTACATNCC3', correspondientes a la
secuencia amino y carboxilo terminal de la proteína,
respectivamente, fueron disueltos en una mezcla de PCR
estándar (250µM de dNTPs, tampón estándar y 50 pmoles de
los cebadores). Después de una primera etapa de
desnaturalización a 95 °C durante 15 min, se llevaron a
cabo 30 ciclos que incluían cada uno de ellos una etapa de
desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 42 °C
durante 1 min 30 s y extensión a 72 °C durante 2 min en
presencia de *Taq* DNA polimerasa (U.S.Biochemical Corp.).
Después de cortar la banda de 408 pb, ésta fue nuevamente
amplificada usando 5 ciclos de desnaturalización a 94°C
(60s), hibridación a 47°C (60s) y extensión a 72°C (90s) y
20 ciclos de desnaturalización a 94°C (60s), hibridación
55°C (90 s) y extensión 72°C (90s). Después, y para
terminar este ciclo de amplificación, se incuban las
muestras a 72°C durante 10 minutos. Los oligonucleótidos
utilizados en esta reacción fueron OL3
5' CCGGGATCCGAARGAYGTNCCNCA 3' y OL4
5' CGGAATTCTCACATGTTGGGCGGGTA 3' El fragmento fue purificado
usando el Magic PCR Prep kit (Promega), fosforilado con la
T4 polinucleotido quinasa (U.S.Biochemical Corp.) e
insertado en el sitio de restricción *Sma*I de un plásmido
pUC18 previamente digerido y desfosforilado. Con esta
construcción pUC18/Olee1, se transformaron células
competentes DH5αF' y se seleccionaron los recombinantes y
se llevó a cabo la secuenciación de algunos de los clones
seleccionados, obteniéndose las secuencias dadas en SEQ ID
NO 1, SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3.

Siguiendo la misma estrategia se llevó a cabo el clonaje

del DNA que codifica las proteínas homólogas a Ole e 1, y también alergénicas, en otros miembros de la familia de las Oleaceas, como Syr v 1 de *Syringa vulgaris* y Lyg v 1 de *Lygustrum vulgare*. Se secuenciaron tres clones de Syr v 1 (secuencias dadas en SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6) y dos clones de Lyg v 1 (secuencias SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8). Las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por los clones correspondientes al DNA específico de Ole e 1 son SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10 y SEQ ID NO 11, los correspondientes a Syr v 1, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13 y SEQ ID NO 14 y los correspondientes a Lig v 1, SEQ ID NO 15 y SEQ ID NO 16.

Para la producción de las formas recombinantes de estas proteínas, la secuencia codificante de DNA fue ligada al plásmido de expresión pPIC9 (Invitrogen Corp.). Las células utilizadas fueron de la cepa GS115 de *Pichia pastoris*. La inducción se llevó a cabo por metanol al 0.5% durante cuatro días, creciendo las células a 30 °C. Las células se sedimentaron centrifugando a 5000 xg y los sobrenadantes se recogieron y una muestra de los mismos se aplicó en un gel de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS. Una banda de 20.5 kDa, única, fue detectada mediante tinción de los geles con Azul de Coomassie. La proteína es reconocida por el anticuerpo policlonal específico de Ole e 1 natural (dilución 1:5000), por varios anticuerpos monoclonales y por sueros de pacientes alérgicos a Ole e 1. La purificación de las proteínas se llevó a cabo mediante dos etapas, una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa y una de filtración en gel en Sephadex G-75, obteniéndose tras esta última el alérgeno recombinante a una concentración de 15 a 35 mg/ml y con un grado de pureza del 99%. Se llevaron a cabo con ellas estudios de caracterización estructural (espectros de dicroismo en el UV próximo y lejano y de fluorescencia) e inmunológica (con

sueros individuales de pacientes alérgicos y con 9 anticuerpos monoclonales)y en todos los casos las proteínas recombinantes se comportaron de manera equivalente a la del alérgeno natural.

5

Estos ejemplos son sólo ilustrativos y no establecen los límites en cuanto a condiciones, eficacia o aplicaciones de la invención que se definen en las correspondientes reivindicaciones.

10

REIVINDICACIONES

1. Moléculas de DNA recombinante caracterizadas por SEQ ID NO 1,2,3,4,5,6,7 y 8 que codifican polipéptidos con actividad alergénica que poseen al menos un epítipo alergénico común con el alergeno principal de *Olea europaea*.
5
2. Moléculas de DNA recombinante, según reivindicación 1, o modificaciones de las mismas, que codifican polipéptidos con, al menos, un epítipo de Ole e 1 en su estructura, unido a un polipéptido adicional, o modificado química o enzimáticamente.
10
3. Moléculas de DNA recombinante caracterizadas por presentar, al menos, un 60% de identidad con las descritas en 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 y SEQ ID NO 8, conteniendo una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad alergénica idéntica o reducida (hipoalergénica) con respecto a Ole e 1.
15
20
4. Polipéptidos recombinantes del alergeno Ole e 1 de *Olea europaea*, o fragmentos de dichos polipéptidos, según reivindicación 1, caracterizados por las secuencias dadas en SEQ ID NO 9,10,11, que presentan la antigenicidad de, al menos, un epítipo de Ole e 1.
25
5. Polipéptidos recombinantes del alergeno principal de *Syringa vulgaris*, o fragmentos de dichos polipéptidos, según reivindicación 1, caracterizados por las secuencias dadas en SEQ ID NO 12,13,14 que presentan la antigenicidad de, al menos, un epítipo de Ole e 1.
30

6. Polipéptidos recombinantes del alérgeno principal de *Ligustrum vulgare*, o fragmentos de dichos polipéptidos, según reivindicación 1, caracterizados por las secuencias dadas en SEQ ID NO 15 y 16 que presentan la antigenicidad de, al menos, un epítipo de Ole e 1.
7. Polipéptidos o fragmentos de dichos polipéptidos de polen de *Olea europaea*, *Syringa vulgaris* y *Ligustrum vulgare* con, al menos, un epítipo de Ole e 1 según reivindicaciones anteriores, que se produzcan recombinantes unidos a un polipéptido adicional.
8. Polipéptidos de polen de *Olea europaea*, *Syringa vulgaris* y *Ligustrum vulgare*, según reivindicaciones anteriores, que estén modificados química o enzimáticamente.
9. Un vector de expresión eucariota, y preferentemente pPIC9, que contenga las secuencias de nucleótidos mencionadas en las reivindicaciones anteriores y que permita su producción recombinante.
10. Un organismo hospedador eucariota, transformado con la construcción formada por el vector de expresión pPIC9 y las secuencias de DNA (SEQ N° 1,2,3,4,5,6,7,8) de las reivindicaciones 1,2 y 3, que sirvan para producir los polipéptidos indicados en las reivindicaciones 4,5,6 y 7.
11. Un método para producir las formas recombinantes correspondientes a las secuencias polipeptídicas mencionadas en la reivindicaciones 4,5,6 y 7, en el sistema eucariótico de levadura *Pichia pastoris* y preferentemente de la cepa GS15, caracterizado por una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa y una de filtración en gel en Sephadex G-75.

12. Utilización de las moléculas según reivindicaciones 1-9 en el diagnóstico "in vitro" de la alergia.

13. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1,2,3,4,5,6 y 7 para el diseño de vacunas destinadas a la inmunoterapia de la alergia.

14. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 4-7 para producir péptidos que contengan al menos un epítipo T capaces de actuar como vacunas.

15. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 4-7 para la producción de isoformas recombinantes hipoalergénicas que tengan disminuida o anulada su unión a IgE para el tratamiento de alergias.

DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

<110> Rodríguez, Rosalía; Villalba, Mayte; Monsalve, Rafael Ignacio y Batanero, Eva

<120> Producción en la levadura *Pichia pastoris* y purificación del alérgeno recombinante de *Olea europaea* Ole e 1 para uso en diagnóstico y tratamiento de alergias.

<160> 16

<210> 1

<211> 435

<212> DNA

<213> *Olea europaea*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(435)

<301> Villalba, M., Batanero, E., Monsalve, R.I., González de la Peña, M.A., Lahoz, C., Rodríguez, R.

<302> Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen

<303> J. Biological Chemistry

<304> 269

<305> 21

<306> 15217-15222

<307> 1994-05-27

<308> X76395

<309> 1993-11-26

<400> 1
gag gat gtt ccg caa cct cca gtt tct caa ttt cac att cag gga cag 48
Glu Asp Val Pro Gln Pro Pro Val Ser Gln Phe His Ile Gln Gly Gln
1 5 10 15
tat gtt tgt gat aca tgc cgt gct gga ttc att act gaa ctt agc gag 96
Tyr Val Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu
20 25 30
ttc atc cca ggt gcc agt tta cgc ctc caa tgc aaa gac aag gag aat 144
Phe Ile Pro Gly Ala Ser Leu Arg Leu Gln Cys Lys Asp Lys Glu Asn
35 40 45
gga gac gta aca ttt act gag gta ggt tac acg aga gca gaa gga ctc 192
Gly Asp Val Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala Glu Gly Leu
50 55 60
tac agc atg ctc gtg gaa cgt gat cac aag aat gag ttc tgt gaa atc 240
Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe Cys Glu Ile
65 70 75 80


```

                2
aca ctg att tca agt ggc aga aaa gat tgt aat gaa att cct act gaa 288
Thr Leu Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asp Cys Asn Glu Ile Pro Thr Glu
                85                90                95

gga tgg gta aaa cca tca tta aaa ttt ata ctc aac aca gta aat ggc 336
Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr Val Asn Gly
                100                105                110

acc aca cgc acc gta aat cct ctt gga ttt ttc aag aaa gaa gct ctt 384
Thr Thr Arg Thr Val Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys Glu Ala Leu
                115                120                125

cca aaa tgt gca caa gtc tat aat aag ttg gga atg tac ccg ccc aac 432
Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro Pro Asn
                130                135                140

atg taa
Met stop
145

```

438

<210> 2

<211> 435

<212> DNA

<213> *Olea europaea*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(435)

<301> Villalba, M., Batanero, E., Monsalve, R.I., González de la Peña, M.A.,
Lahoz, C., Rodríguez, R.

<302> Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree
pollen

<303> J. Biological Chemistry

<304> 269

<305> 21

<306> 15217-15222

<307> 1994-05-27

<308> X76397

<309> 1993-11-26

<400> 2

```

gag gac gtg ccg caa cct cca att tct caa ttt tac gtt caa gga caa 48
Glu Asp Val Pro Gln Pro Pro Ile Ser Gln Phe Tyr Val Gln Gly Gln
1 5 10 15

gtt tat tgc gac aca tgt cgt act cga ttc att act gaa ttt agc gag 96
Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Thr Arg Phe Ile Thr Glu Phe Ser Glu
20 25 30

ttc att cca ggt gcc ggt gta cgc ctc cag tgc aaa gat ggg gag aat 144
Phe Ile Pro Gly Ala Gly Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp Gly Glu Asn
35 40 45

```

```

          3
gga aaa ata aca ttt acc gag gta ggc tac aca aga gct gaa gga ctc 192
Gly Lys Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala Glu Gly Leu
   50          55          60

tat agc atg ctc att gag cgt gat cat aag aac gaa ttt tgc gaa atc 240
Tyr Ser Met Leu Ile Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe Cys Glu Ile
   65          70          75          80

aca ttg ctt tca agt agg aga aaa gat tgt gat gag att cct acg gaa 248
Thr Leu Leu Ser Ser Ser Arg Lys Asp Cys Asp Glu Ile Pro Thr Glu
          85          90          95

gga tgg gta aag cct tca gtg aaa ttt ata ctc aac acg gta aat ggt 336
Gly trp Val Lys Pro Ser Val Lys Phe Ile Leu Asn Thr Val Asn Gly
          100          105          110

act aca cgc acg ata aat cct ctt gga ttc ttc aag aaa gag gct ctt 384
Thr Thr Arg Thr Ile Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys Glu Ala Leu
          115          120          125

cca aaa tgt cca caa gtc ttt aat aag ctg ggc atg tac ccg ccc aac 432
Pro Lys Cys Pro Gln Val Phe Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro Pro Asn
          130          135          140

atg taa
Met stop
145

```

438

<210> 3

<211> 435

<212> DNA

<213> *Olea europaea*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(435)

<301> Villalba, M., Batanero, E., Monsalve, R.I., González de la Peña, M.A.,
Lahoz, C., Rodríguez, R.

<302> Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree
pollen

<303> J. Biological Chemistry

<304> 269

<305> 21

<306> 15217-15222

<307> 1994-05-27

<308> X76396

<309> 1993-11-26

<400> 3

```

gag gat gtg cca caa cca cca gtt tct caa ttc cac att caa gga caa 48
Glu Asp Val Pro Gln Pro Pro Val Ser Gln Phe His Ile Gln Gly Gln
   1          5          10          15

```

```

gtt tat tgt gac aca tgc cgt gct cga ttc att act gaa ctg agc gag 96
Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Arg Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu
          20          25          30

```

```

                                4
ttc ata cca ggt gcc agt gta cgc ctc cag tgc aaa gac gga gag aat 144
Phe Ile Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp Gly Glu Asn
                                35
                                40
                                45
ggg agc ata aca ttt act gag gta ggt tac acg aga gcg gaa gga ctc 192
Gly Ser Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala Glu Gly Leu
                                50
                                55
                                60
tat agc atg ctt att gaa cgc gat cac aag gat gag ttt tgc gaa atc 240
Tyr Ser Met Leu Ile Glu Arg Asp His Lys Asp Glu Phe Cys Glu Ile
                                65
                                70
                                75
aca cta att tca agt agc aga aaa gat tgt gat gaa atc ccc gtt gaa 288
Thr Leu Ile Ser Ser Ser Arg Lys Asp Cys Asp Glu Ile Pro Val Glu
                                85
                                90
                                95
gga tgg gta aaa cct tca ttg aaa ttt atg ctc aac aca gta aat ggt 336
Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Met Leu Asn Thr Val Asn Gly
                                100
                                105
                                110
act aca cgt acg ata aat cct ctt gga ttc ttc aag aaa gaa gct cta 384
Thr Thr Arg Thr Ile Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys Glu Ala Leu
                                115
                                120
                                125
cca aaa tgt cca caa gtc ttt aat aag ctg ggc atg tac ccg ccc aac 432
Pro Lys Cys Pro Gln Val Phe Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro Pro Asn
                                130
                                135
                                140
atg tga
Met stop
145

```

438

<210> 4

<211> 435

<212> DNA

<213> *Syringa vulgaris*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(435)

<301> Batanero, E., Villalba, M., López-Otín, C., Rodríguez, R.

<302> Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from
lilac pollen

<303> European journal of Biochemistry

<304> 221

<306> 187-193

<307> 1994-01-24

<308> X76541

<309> 1993-12-02

<400> 4

```

gag gac gtg ccc caa ccc cca att cct caa ttc cac att caa gga caa 48
Glu Asp Val Pro Gln Pro Pro Ile Pro Gln Phe His Ile Gln Gly Gln
1
5
10
gtt tat tgt gat aca tgt cgt gct aga ttc att aca gaa ctt agc gag 96
Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Arg Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu

```

```

                20                25                5                30
ttt atc cca ggt gct agc ata cgc ctc caa tgc aaa gac agg gag aat 144
Phe Ile Pro Gly Ala Ser Ile Arg Leu Gln Cys Lys Asp Arg Glu Asn
                35                40                45
ggt aaa ata aca ttt act gag ata ggt tac acg aga gca gaa gga ctc 192
Gly Lys Ile Thr Phe Thr Glu Ile Gly Tyr Thr Arg Ala Glu Gly Leu
                50                55                60
tac agc atg ctt gtt gaa ggt gat cac aag aac gag ttt tgc gaa atc 240
Tyr Ser Met Leu Val Glu Gly Asp His Lys Asn Glu Phe Cys Glu Ile
                65                70                75                80
aca ctg att tca agt ggc aga gaa gat tgt gat gaa att cct gtt gaa 248
Thr Leu Ile Ser Ser Gly Arg Glu Asp Cys Asp Glu Ile Pro Val Glu
                85                90                95
gga tgg gca aaa cca tca tta aaa ttt aaa ctt aat acg gta aat ggt 336
Gly Trp Ala Lys Pro Ser Leu Lys Phe Lys Leu Asn Thr Val Asn Gly
                100                105                110
acc aca cgc acg ata aat cct att gga ttc ttc aag aaa gaa gct ctt 384
Thr Thr Arg Thr Ile Asn Pro Ile Gly Phe Phe Lys Lys Glu Ala Leu
                115                120                125
cca aaa tgc aca caa gtc tat aat aag ttg ggt atg tac ccg ccc aac 432
Pro Lys Cys Thr Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro Pro Asn
                130                135                140
atg taa
Met stop
145

```

438

<210> 5

<211> 435

<212> DNA

<213> *Syringa vulgaris*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(435)

<301> Batanero, E., Villalba, M., López-Otín, C., Rodríguez, R.

<302> Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from
lilac pollen

<303> European journal of Biochemistry

<304> 221

<306> 187-193

<307> 1994-01-24

<308> X76539

<309> 1993-12-02

<400> 5

```

gag gac gtg ccg caa ccc cca gtt cct caa ttt cac att cag gga caa 48
Glu Asp Val Pro Gln Pro Pro Val Pro Gln Phe His Ile Gln Gly Gln
1                5                10                15

```

6

```

gtt tat tgt gac aca tgt cgt gct aga ttc att aca gaa ctt agc gag 96
Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Arg Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu
20 25 30
ttt atc cca ggt gct ggt ata cgc ctc caa tgc aaa gac ggg gag cat 144
Phe Ile Pro Gly Ala Gly Ile Arg Leu Gln Cys Lys Asp Gly Glu His
35 40 45
ggt aaa ata aca ttt act gag ata ggt tac acg aga gca gaa gga ctc 192
Gly Lys Ile Thr Phe Thr Glu Ile Gly Tyr Thr Arg Ala Glu Gly Leu
50 55 60
tac agc atg ctt gtt gaa ggt gat cac aag aac gag ttt tgc gaa atc 240
Tyr Ser Met Leu Val Glu Gly Asp His Lys Asn Glu Phe Cys Glu Ile
65 70 75 80
aca ttg ctt tca agt agc aga aaa gat tgt gaa gaa atc cct att gaa 248
Thr Leu Leu Ser Ser Ser Arg Lys Asp Cys Glu Glu Ile Pro Ile Glu
85 90 95
gga tgg gta aaa cca tca ttg aaa ttt ata cta aat aca gta aat ggt 336
Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr Val Asn Gly
100 105 110
acc aca cgc acg ata aat cct ctt gga ttc ttc aag aaa gaa gtt ctt 384
Thr Thr Arg Thr Ile Asn Pro Leu Gly Phe phe Lys Lys Glu Val Leu
115 120 125
cca aaa tgt cca caa gtc ttt aat aag tta ggc atg tac ccg ccc aac 432
Pro Lys Cys Pro Gln Val Phe Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro Pro Asn
130 135 140
atg taa
Met stop
145

```

438

<210> 6

<211> 435

<212> DNA

<213> Syringa vulgaris

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(435)

<301> Batanero, E., Villalba, M., López-Otín, C., Rodríguez, R.

<302> Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from
lilac pollen

<303> European journal of Biochemistry

<304> 221

<306> 187-193

<307> 1994-01-24

<308> X76540

<309> 1993-12-02

<400> 6

```

gag gac gtg cct caa ccc cca gtt cct caa ttt cac att cag gga caa 48
Glu Asp Val Pro Gln Pro Pro Val Pro Gln Phe His Ile Gln Gly Gln
1 5 10 15

```

7

```

gtt tat tgt gac acg tgt cgt gct aga ttc att aca gaa ctt agc gag 96
Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Arg Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu
          20          25          30
ttt atc cca ggt gcc agt ata cgc ctc caa tgc aaa gat ggg gag aat 144
Phe Ile Pro Gly Ala Ser Ile Arg Leu Gln Cys Lys Asp Gly Glu Asn
          35          40          45

ggc aaa ata aca ttt act gag ata ggt tac acg aga gca gaa gga ctc 192
Gly Lys Ile Thr Phe Thr Glu Ile Gly Tyr Thr Arg Ala Glu Gly Leu
          50          55          60

tac agc atg ctt gtg gaa ggt gat cac aag aac gag ttt tgc gaa atc 240
Tyr Ser Met Leu Val Glu Gly Asp His Lys Asn Glu Phe Cys Glu Ile
          65          70          75          80

aca ctg att tca agt ggc aga aaa gat tgt gat gaa att cct gtt gaa 248
Thr Leu Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asp Cys Asp Glu Ile Pro Val Glu
          85          90          95

gga tgg gtc aaa cca tca ttg aaa ttt aaa ctt aat acg gta aat ggt 336
Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Lys Leu Asn Thr Val Asn Gly
          100          105          110

acc aca cgc acg ata aat cct att gga ttc ttc aag aaa gaa gct ctt 384
Thr Thr Arg Thr Ile Asn Pro Ile Gly Phe phe Lys Lys Glu Ala Leu
          115          120          125

cca aaa tgc aca caa gtc tat aat aag ttg gga atg tac ccg ccc aac 432
Pro Lys Cys Thr Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro Pro Asn
          130          135          140

atg taa
Met stop
145

```

438

<210> 7

<211> 435

<212> DNA

<213> *Ligustrum vulgare*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(435)

<301> Batanero, E., González de la Peña, M.A., Villalba, M., Monsalve, R.I.,
Martín-Esteban, M., Rodríguez, R.

302> Isolation, cDNA cloning and expression of Lig v 1, the major allergen
from privet pollen

<303> Cinical and Experimental Allergy

<304> 26

<306> 1401-1410

<307> 1996-06-24

<308> X77787

<309> 1994-02-22

8

```

<400> 7
gag gat gtt ccg caa cct cca gtt tca caa ttc tac att cag gga caa 48
Glu Asp Val Pro Gln Pro Pro Val Ser Gln Phe Tyr Ile Gln Gly Gln
1      5      10      15
gtt tat tgc gac acg tgt cga gct cga ttc att act gaa ctt agc gag 96
Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Arg Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu
20      25
ttc atc cca ggt gcc ggt gta cgc ctc caa tgc aaa gac ggt gag aac 144
Phe Ile Pro Gly Ala Gly Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp Gly Glu Asn
35      40      45
ggg aaa gta aca ttt act gag gtc ggt tac acg aaa gca gaa gga ctc 192
Gly Lys Val Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Lys Ala Glu Gly Leu
50      55      60
tac aac atg ctc att gaa cga gat cac aag aat gag ttt tgt gaa atc 240
Tyr Asn Met Leu Ile Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe Cys Glu Ile
65      70      75      80
aca ctt att tca agt agc aga aaa gat tgt gat gaa att cct act gaa 288
Thr Leu Ile Ser Ser Ser Arg Lys Asp Cys Asp Glu Ile Pro Thr Glu
85      90      95
gga tgg gta aaa cca tca ttg aaa ttt gta ctc aat aca gta aat ggc 336
Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Val Leu Asn Thr Val Asn Gly
100      105      110
acc aca cgc acg ata aat cct ctt gga ttc ttg aag aaa gaa gtt ctt 384
Thr Thr Arg Thr Ile Asn Pro Leu Gly Phe Leu Lys Lys Glu Val Leu
115      120      125
cca aaa tgt cca caa gtc ttt aat aag tta gga atg tac ccg ccc aac 432
Pro Lys Cys Pro Gln Val Phe Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro Pro Asn
130      135      140
atg taa
Met stop
145

```

438

<210> 8

<211> 435

<212> DNA

<213> *Ligustrum vulgare*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(435)

<301> Batanero, E., González de la Peña, M.A., Villalba, M., Monsalve, R.I.,
Martín-Esteban, M., Rodríguez, R.

<302> Isolation, cDNA cloning and expression of Lig v 1, the major allergen
from privet pollen

<303> Cinical and Experimental Allergy

<304> 26

<306> 1401-1410

<307> 1996-06-24

<308> X77788

<309> 1994-02-22

<400> 8

gag gat gtc ccc caa ccc ccg gtt tct caa ttt tac att cag gga caa 48
 Glu Asp Val Pro Gln Pro Pro Val Ser Gln Phe Tyr Ile Gln Gly Gln
 1 5 10 15

gtg tat tgc gac aca tgt cgt gct cga ttc att act gaa ctc agc gag 96
 Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Arg Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu
 20 25 30

ttc atc cca ggt gct ggt gtt cgc ctt caa tgc aaa gac ggg gag aat 144
 Phe Ile Pro Gly Ala Gly Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp Gly Glu Asn
 35 40 45

gga aag ata aca ttt act gag gta ggt tac aca aga gcg gaa gga ctt 192
 Gly Lys Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala Glu Gly Leu
 50 55 60

tat agc atg ctc att gaa cgc gat cac aag aat gaa ttt tgc gaa atc 240
 Tyr Ser Met Leu Ile Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe Cys Glu Ile
 65 70 75 80

aca ttg ctt tcc agc agc aga aaa gat tgt gat gaa ata cct att gaa 288
 Thr Leu Leu Ser Ser Arg Lys Asp Cys Asp Glu Ile Pro Thr Glu
 85 90 95

gga tgg gta aaa cca tca ttg aaa ttt atg ctc aat act gta aat ggt 336
 Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Met Leu Asn Thr Val Asn Gly
 100 105 110

acc aca cgt aca ata aat cct ctt gga ttt ttc aag aaa gaa gct ctt 384
 Thr Thr Arg Thr Ile Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys Glu Ala Leu
 115 120 125

cca aaa tgt cca caa gtc ttt aat aag ttg gga atg tac ccg ccc aac 432
 Pro Lys Cys Pro Gln Val Phe Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro Pro Asn
 130 135 140

atg taa
 Met stop
 145

438

10

<210> 9
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> *Olea europaea*
 <301> Villalba, M., Batanero, E., Monsalve, R.I., González de la Peña, M.A.,
 Lahoz, C., Rodríguez, R.
 <302> Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree
 pollen
 <303> J. Biological Chemistry
 <304> 269
 <305> 21
 <306> 15217-15222
 <307> 1994-05-27
 <308> X76395
 <309> 1993-11-26
 <400> 9
 Glu Asp Val Pro Gln Pro Pro Val Ser Gln Phe His Ile Gln Gly Gln
 1 5 10 15
 Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu
 20 25 30
 Phe Ile Pro Gly Ala Ser Leu Arg Leu Gln Cys Lys Asp Lys Glu Asn
 35 40 45
 Gly Asp Val Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala Glu Gly Leu
 50 55 60
 Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe Cys Glu Ile
 65 70 75 80
 Thr Leu Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asp Cys Asn Glu Ile Pro Thr Glu
 85 90 95
 Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr Val Asn Gly
 100 105 110
 Thr Thr Arg Thr Val Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys Glu Ala Leu
 115 120 125
 Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro Pro Asn
 130 135 140
 Met
 145

<210> 10
 <211> 145
 <212> PRT

11

<213> *Olea europaea*<301> Villalba, M., Batanero, E., Monsalve, R.I., González de la Peña, M.A.,
Lahoz, C., Rodríguez, R.<302> Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree
pollen

<303> J. Biological Chemistry

<304> 269

<305> 21

<306> 15217-15222

<307> 1994-05-27

<308> X76397

<309> 1993-11-26

<400> 10

Glu₁ Asp Val Pro₅ Gln Pro Pro Ile Ser₁₀ Gln Phe Tyr Val Gln Gly₁₅ Gln
 Val Tyr Cys Asp₂₀ Thr Cys Arg Thr₂₅ Arg Phe Ile Thr Glu₃₀ Phe Ser Glu
 Phe Ile Pro₃₅ Gly Ala Gly Val₄₀ Arg Leu Gln Cys Lys Asp₄₅ Gly Glu Asn
 Thr₅₀ Phe Thr Glu Val Gly₅₅ Tyr Thr Arg Ala Glu₆₀ Gly Leu Tyr Ser Met
 Leu₆₅ Gly Lys Ile Ile₇₀ Glu Arg Asp His Lys Asn₇₅ Glu Phe Cys Glu Ile₈₀
 Thr Leu Leu Ser₈₅ Ser Arg Lys Asp₉₀ Cys Asp Glu Ile Pro Thr₉₅ Glu
 Gly Trp Val₁₀₀ Lys Pro Ser Val Lys₁₀₅ Phe Ile Leu Asn Thr₁₁₀ Val Asn Gly
 Thr Thr Arg₁₁₅ Thr Ile Asn Pro₁₂₀ Leu Gly Phe Phe Lys₁₂₅ Lys Glu Ala Leu
 Pro Lys₁₃₀ Cys Pro Gln Val₁₃₅ Phe Asn Lys Leu Gly Met₁₄₀ Tyr Pro Pro Asn
 Met
 145

<210> 11

<211> 145

<212> PRT

<213> *Olea europaea*<301> Villalba, M., Batanero, E., Monsalve, R.I., González de la Peña, M.A.,
Lahoz, C., Rodríguez, R.

12

<302> Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen

<303> J. Biological Chemistry

<304> 269

<305> 21

<306> 15217-15222

<307> 1994-05-27

<308> X76396

<309> 1993-11-26

<400> 11

```

Glu Asp Val Pro Gln Pro Pro Val Ser Gln Phe His Ile Gln Gly Gln
1      5      10     15
Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Arg Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu
      20     25     30
Phe Ile Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp Gly Glu Asn
      35     40     45
Gly Ser Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala Glu Gly Leu
      50     55     60
Tyr Ser Met Leu Ile Glu Arg Asp His Lys Asp Glu Phe Cys Glu Ile
65      70     75     80
Thr Leu Ile Ser Ser Ser Arg Lys Asp Cys Asp Glu Ile Pro Val Glu
      85     90     95
Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Met Leu Asn Thr Val Asn Gly
      100    105    110
Thr Thr Arg Thr Ile Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys Glu Ala Leu
      115    120    125
Pro Lys Cys Pro Gln Val Phe Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro Pro Asn
      130    135    140
Met
145

```

<210> 12

<211> 145

<212> PRT

<213> *Syringa vulgaris*

<301> Batanero, E., Villalba, M., López-Otín, C., Rodríguez, R.

<302> Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from lilac pollen

<303> European journal of Biochemistry

<304> 221

<306> 187-193

13

<307> 1994-01-24

<308> X76541

<309> 1993-12-02

<400> 12

Glu Asp Val Pro Gln Pro Pro Ile Pro Gln Phe His Ile Gln Gly Gln
 1 5 10 15

Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Arg Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu
 20 25 30

Phe Ile Pro Gly Ala Ser Ile Arg Leu Gln Cys Lys Asp Arg Glu Asn
 35 40 45

Gly Lys Ile Thr Phe Thr Glu Ile Gly Tyr Thr Arg Ala Glu Gly Leu
 50 55 60

Tyr Ser Met Leu Val Glu Gly Asp His Lys Asn Glu Phe Cys Glu Ile
 65 70 75 80

Thr Leu Ile Ser Ser Gly Arg Glu Asp Cys Asp Glu Ile Pro Val Glu
 85 90 95

Gly Trp Ala Lys Pro Ser Leu Lys Phe Lys Leu Asn Thr Val Asn Gly
 100 105 110

Thr Thr Arg Thr Ile Asn Pro Ile Gly Phe Phe Lys Lys Glu Ala Leu
 115 120 125

Pro Lys Cys Thr Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro Pro Asn
 130 135 140

Met
 145

<210> 13

<211> 145

<212> PRT

<213> *Syringa vulgaris*

<301> Batanero, E., Villalba, M., López-Otín, C., Rodríguez, R.

<302> Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from
 lilac pollen

<303> European journal of Biochemistry

<304> 221

<306> 187-193

<307> 1994-01-24

<308> X76539

<309> 1993-12-02

<400> 13

14

Glu Asp Val Pro Gln Pro Pro Val Pro Gln Phe His Ile Gln Gly Gln
 1 5 10 15
 Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Arg Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu
 20 25 30
 Phe Ile Pro Gly Ala Gly Ile Arg Leu Gln Cys Lys Asp Gly Glu His
 35 40 45
 Gly Lys Ile Thr Phe Thr Glu Ile Gly Tyr Thr Arg Ala Glu Gly Leu
 50 55 60
 Tyr Ser Met Leu Val Glu Gly Asp His Lys Asn Glu Phe Cys Glu Ile
 65 70 75 80
 Thr Leu Leu Ser Ser Ser Arg Lys Asp Cys Glu Glu Ile Pro Ile Glu
 85 90 95
 Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr Val Asn Gly
 100 105 110
 Thr Thr Arg Thr Ile Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys Glu Val Leu
 115 120 125
 Pro Lys Cys Pro Gln Val Phe Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro Pro Asn
 130 135 140
 Met
 145

<210> 14

<211> 145

<212> PRT

<213> *Syringa vulgaris*

<301> Batanero, E., Villalba, M., López-Otín, C., Rodríguez, R.

 <302> Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from
 lilac pollen

<303> European journal of Biochemistry

<304> 221

<306> 187-193

<307> 1994-01-24

<308> X76540

<309> 1993-12-02

<400> 14

Glu Asp Val Pro Gln Pro Pro Val Pro Gln Phe His Ile Gln Gly Gln
 1 5 10 15
 Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Arg Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu
 20 25 30
 Phe Ile Pro Gly Ala Ser Ile Arg Leu Gln Cys Lys Asp Gly Glu Asn

[illegible]

16

<210> 15

<211> 145

<212> PRT

<213> *Ligustrum vulgare*

<301> Batanero, E., González de la Peña, M.A., Villalba, M.,
Monsalve, R.I., Martín-Esteban, M., Rodríguez, R.

<302> Isolation, cDNA cloning and expression of Lig v 1, the
major allergen from privet pollen

<303> Clinical and Experimental Allergy

<304> 26

<306> 1401-1410

<307> 1996-06-24

<308> X77787

<309> 1994-02-22

<400> 15

Glu Asp Val Pro Gln Pro Pro Val Ser Gln Phe Tyr Ile Gln Gly Gln
1 5 10 15

Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Arg Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu
20 25 30

Phe Ile Pro Gly Ala Gly Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp Gly Glu Asn
35 40 45

Gly Lys Val Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Lys Ala Glu Gly Leu
50 55 60

Tyr Asn Met Leu Ile Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe Cys Glu Ile
65 70 75 80

Thr Leu Ile Ser Ser Ser Arg Lys Asp Cys Asp Glu Ile Pro Thr Glu
85 90 95

Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Val Leu Asn Thr Val Asn Gly
100 105 110

Thr Thr Arg Thr Ile Asn Pro Leu Gly Phe Leu Lys Lys Glu Val Leu
115 120 125

Pro Lys Cys Pro Gln Val Phe Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro Pro Asn
130 135 140

Met
145

<210> 16

<211> 145

<212> PRT

<213> *Ligustrum vulgare*

<301> Batanero, E., González de la Peña, M.A., Villalba, M.,
Monsalve, R.I., Martín-Esteban, M., Rodríguez, R.

<302> Isolation, cDNA cloning and expression of Lig v 1, the major allergen from privet pollen

<303> Cinical and Experimental Allergy

<304> 26

<306> 1401-1410

<307> 1996-06-24

<308> X77788

<309> 1994-02-22

<400> 16

```

Glu Asp Val Pro Gln Pro Pro Val Ser Gln Phe Tyr Ile Gln Gly Gln
1      5      10      15
Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Arg Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu
20      25      30
Phe Ile Pro Gly Ala Gly Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp Gly Glu Asn
35      40      45
Gly Lys Ile Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala Glu Gly Leu
50      55      60
Tyr Ser Met Leu Ile Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe Cys Glu Ile
65      70      75      80
Thr Leu Leu Ser Ser Ser Arg Lys Asp Cys Asp Glu Ile Pro Thr Glu
85      90      95
Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Met Leu Asn Thr Val Asn Gly
100     105     110
Thr Thr Arg Thr Ile Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys Glu Ala Leu
115     120     125
Pro Lys Cys Pro Gln Val Phe Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro Pro Asn
130     135     140
Met
145

```


INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 01/00287

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C12N 15/29, 1/16, C07K 14/415, G01N 33/68, A61K 39/36, A61P 37/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ C12N, C07K, G01N, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, PAJ, WPIL, HCAPLUS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VILLALBA, M. et al. "Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen". THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol. 269, n° 21, 27 May 1994, pages 15217-15222, figures 3,4	1-4, 7, 8, 12-15
X	BATANERO, E. et al. "Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from lilac pollen" EUR. J. BIOCHEM. Vol. 221. 1994, pages 187-193, figure 5	1-3, 5, 7, 8, 12-15
X	BATANERO, E. et al. "Isolation, cDNA cloning and expression of Lig v1, the mayor allergen from privet pollen". CLINICAL AND EXPREIMENTAL ALLERGY. Vol. 26. 1996, pages 1401-1410, figure 4	1-3, 6-8, 12-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 September 2001 (26.09.01)

Date of mailing of the international search report

19 October 2001 (19.10.01)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 01/00287

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HUECAS, S. et al. "Pruduction and detailed characterization of biologically active olive pollen allergen Ole e 1 secreted by the yeast <i>Pichia pastoris</i> ". EUR. J. BIOCHEM. Vol. 261, April 1999, pages 539-545, whole document	9-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 01/00287

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Inventi3n 1: Reivindicaci3n 4 y (1-3, 7-15) parcialmente. P3ptidos y DNA recombinantes de *Olea europaea*, su obtenci3n en la levadura *Pichia pastoris* y su utilizaci3n.

Inventi3n 2: Reivindicaci3n 5 y (1-3, 7-15) parcialmente. P3ptidos y DNA recombinantes de *Syringa vulgaris*, su obtenci3n en la levadura *Pichia pastoris* y su utilizaci3n.

Inventi3n 3: Reivindicaci3n 6 y (1-3, 7-15) parcialmente. P3ptidos y DNA recombinantes de *Ligustrum vulgare*, su obtenci3n en la levadura *Pichia pastoris* y su utilizaci3n.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 01/00287

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C12N 15/29, 1/16, C07K 14/415, G01N 33/68, A61K 39/36, A61P 37/08

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ C12N, C07K, G01N, A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, PAJ, WPIL, HCAPLUS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	VILLALBA, M. et al. "Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen". THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol. 269, n° 21, 27 de mayo de 1994, páginas 15217-15222, figuras 3, 4.	1-4, 7, 8, 12-15
X	BATANERO, E. et al. "Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from lilac pollen" EUR. J. BIOCHEM. Vol. 221. 1994, páginas 187-193, figura 5.	1-3, 5, 7, 8, 12-15
X	BATANERO, E. et al. "Isolation, cDNA cloning and expression of Lig v1, the mayor allergen from privet pollen". CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY. Vol. 26. 1996, páginas 1401-1410, figura 4.	1-3, 6-8, 12-15

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 26 septiembre 2001 (26.09.2001)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

19 OCT 2001

19. 10. 01

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.
C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
n° de fax +34 91 3495304

Funcionario autorizado
María Novoa Sanjurjo

n° de teléfono +34 91 349 55 52

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 01/00287

Recuadro I Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 1 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).

Recuadro II Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

Invención 1: Reivindicación 4 y (1-3, 7-15) parcialmente. Péptidos y DNA recombinantes de *Olea europaea*, su obtención en la levadura *Pichia pastoris* y su utilización.

Invención 2: Reivindicación 5 y (1-3, 7-15) parcialmente. Péptidos y DNA recombinantes de *Syringa vulgaris*, su obtención en la levadura *Pichia pastoris* y su utilización.

Invención 3: Reivindicación 6 y (1-3, 7-15) parcialmente. Péptidos y DNA recombinantes de *Ligustrum vulgare*, su obtención en la levadura *Pichia pastoris* y su utilización.

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☒ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la reserva ☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una reserva por parte del solicitante.

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	HUECAS, S. et al. "Pruduction and detailed characterization of biologically active olive pollen allergen Ole e 1 secreted by the yeast <i>Pichia pastoris</i> ". EUR. J. BIOCHEM. Vol. 261, abril 1999, páginas 539-545, todo el documento.	9-11