



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 034**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/35 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **96933862 .3**

96 Fecha de presentación : **23.09.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **0873135**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.10.1998**

54

Título: **Alérgenos de cacahuete y métodos.**

30

Prioridad: **29.12.1995 US 9455 P**
04.03.1996 US 610424

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2010

73

Titular/es: **The University of Arkansas**
2404 North University Avenue
Little Rock, Arkansas 72207-3608, US

72

Inventor/es: **Burks, A., Wesley, Jr.;**
Helm, Ricki, M.;
Cockrell, Gael;
Stanley, J., Steven y
Bannon, Gary, A.

74

Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 344 034 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Alérgenos de cacahuete y métodos.

5 Los cacahuetes están considerados como una de las comidas más alergénicas. La alergia del cacahuete, es un problema importante para la salud por la severidad de la reacción alérgica, la sensibilidad crónica de la alergia y la ubicuidad de los productos del cacahuete. Los individuos sensibles a los cacahuetes podrían experimentar síntomas que alcanzan desde una urticaria media a severa, y una anafilaxia¹ sistémica. En la anafilaxia fatal inducida por el alimento, los cacahuetes son la comida más frecuentemente implicada como causa de la reacción^{2, 3}. La sensibilidad a los cacahuetes a menudo aparece pronto en la vida y al contrario que en otras alergias a comidas, y tiende a persistir indefinidamente⁴.

15 Para dilucidar el mecanismo exacto de las reacciones Ig-E, la identificación y purificación de los precisos alérgenos son necesarios. Información significativa ha sido acumulada en alérgenos caracterizados desde una amplia variedad de fuentes, incluyendo polen, ácaro de polvo, caspa de animales e insectos⁵. En comparación, la caracterización de alérgenos para incluso los alérgenos de comida común, es menos definida. A pesar de la significativa prevalencia de la hipersensibilidad de las reacciones al cacahuete y abundantes muertes al año, la identificación de los antígenos clínicamente relevantes y su entendimiento de la inmunobiología de la hipersensibilidad al cacahuete está solo empezando.

20 Los anticuerpos monoclonales son cada vez más utilizado para definir y caracterizar los epítopos alergénicos de muchos alérgenos. Múltiples alérgenos incluidos los alérgenos de ácaros del polvo, Der f I,⁶ y el alérgeno polen de gramíneas, LolpI,⁷ han sido estudiado por el uso de anticuerpos monoclonales. Anticuerpos monoclonales murinos a estos alérgenos han demostrado ser bastante eficaz en la definición de sus epítopos alergénicos.

25 WO94 20614 describe los ácidos nucleicos que codifican las Der p VII y Der f alérgenos VII y el predice las secuencias de ácido amino. Péptidos con Der p VII y VII Der F actividad puede ser utilizado en el tratamiento o diagnóstico.

30 En este informe, hemos investigado la especificidad epítipo de Ara h II, el ⁸ de un alérgeno importante de cacahuete, mediante el uso de los anticuerpos monoclonales como sondas para el mapeo de los posibles factores determinantes antigénicos. Hemos producido y caracterizado un panel de anticuerpos monoclonales específicos de Ara h II. Los anticuerpos monoclonales h ARA II nos ha permitido definir por lo menos dos sitios antigénicos de Ara h II. Ensayos de inhibición se utilizaron para determinar los sitios de unión de IgE en Ara h II.

35 La invención se define en las reivindicaciones anexas.

Métodos

Pacientes con respuesta positiva al desafío del cacahuete.

40 Para la aprobación de este estudio fue obtenido por el Comité Consultivo Humanos de la Universidad de Arkansas de Ciencias Médicas. Doce pacientes con dermatitis atópica y una respuesta positiva inmediata de la piel al pinchazo de prueba al cacahuete había una respuesta positiva a double-blind placebo-controlado al desafío alimentario (DBPCFC) o una historia convincente de anafilaxia de cacahuete (la reacción alérgica potencialmente mortal, es decir, con edema laríngeo, sibilancias severas, y/o hipotensión). Los detalles del procedimiento del desafío y la interpretación han sido previamente discutida.⁹ Cinco mililitros de la sangre venosa se extrajo de cada paciente y se permite que coagule, y el suero se recogió. Un volumen igual de suero de cada donante se mezcló para preparar una piscina de anticuerpo de cacahuete IgE específico.

50 *Extracto crudo de cacahuete*

De tres lotes comerciales de cacahuetes de los corredores del Sureste (*Arachis hypogaea*), de grado medio, a partir de cultivos de 1979 (North Carolina State University) se utilizaron en este estudio. Los cacahuetes fueron almacenados en el congelador a -18°C hasta que se eran tostados. Los tres lotes se combinaron en proporciones iguales y se mezclan antes del desengrasado. El proceso de desengrase (desgrasado con hexano después del tueste de 13 a 16 minutos a 163°C a 177°C) se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Clyde Young (North Carolina State University). El cacahuete crudo fue extraído en 1 mol/L de NaCl, 20 mmol/L de sodio de fosfato (pH 7,0)1 y 8 mol/L de urea durante 4 horas a 4°C. El extracto fue aclarado por centrifugación a 20.000 g durante 60 minutos a 4°C. La determinación de proteínas totales se realizó por el método de ácido bicinonínico (Pierce Laboratorios, Rockville, Illinois).

60 *Anticuerpos Monoclonales*

Líneas celulares de ratón hibridomas fueron preparadas por selección estándar después de que la fusión celular de polietilenglicol mediada se llevó a cabo como ya se ha descrito. Las células del ratón/mieloma ¹⁰ SP²/0-AG¹⁴ se fundieron con esplenocitos inmunes a ratones hembra BALB/c hiperinmunizados con Ara h II. Las células sobrenadantes de hibridoma fueron examinados por ELISA y secante Western, y las líneas celulares fueron clonados por dilución limitante. Los anticuerpos secretados por las líneas de células monoclonales enhibridomas se isotipan de acuerdo con las instrucciones que se proporcionan (Tipo de exámen; Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.). Líquidos ascíticos

ES 2 344 034 T3

producidos en ratones BALB/c se purificó con la proteína G Superose, como se indica por el fabricante (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Los anticuerpos monoclonales fueron purificados en ensayos de inhibición de ELISA y ELISA.

ELISA para IgE

5 Una biotina-avidina ELISA fue desarrollada para cuantificar los anticuerpos anti-IgE de la proteína de cacahuete con las modificaciones de un ensayo descrito anteriormente¹¹. Las 2 filas superiores de una placa de microtitulación de 96 pocillos (Gibco, Santa Clara, California) fueron recubiertos con película con 100 μ l cada una de cantidades iguales (1 μ g/ml) de anticuerpos humanos IgE anticuerpos monoclonales, 7.12 y 4.15 (amablemente proporcionada por el Dr. Andrew Saxon). El resto de la placa fue cubierta con la proteína de cacahuete en una concentración de 1 μ g/ml en el recubrimiento de tampón (0,1 mol/L de carbonato de sodio, bicarbonato, pH 9,6). La placa se incubó a 37°C durante 1 hora y luego se lava cinco veces con enjuague tampón (solución salina amortiguadora de fosfato, pH 7,4, con 0,05% de Tween 20, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) inmediatamente, y entre las incubaciones posteriores. Un segundo patrón de referencia de IgE se añadió a las 2 filas superiores para generar una curva de la IgE, que van desde 0,05 hasta 15 25 ng/ml.

El grupo de muestras de suero y suero del paciente se diluyó (1: 20 vol/vol) y se vació en pocillos individuales en la parte inferior de la placa. Después de incubar durante 1 hora a 37°C y lavar, biotinar, se añadió a todos los pocillos anti-IgE humana de cabra purificada por afinidad (KPL, Gaithersburg, Maryland) (1: 1000 vol/vol albúmina de suero bovino). Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C y se lavó, y 100 μ l. de peroxidasa de rábano conjugado con avidina (Vector Laboratories, Burlingame, California) se añadió durante 5 minutos. Después del lavado, las placas fueron desarrolladas por la adición de un tampón de citrato que contiene 0-fenilendiamina (Sigma Chemical Co.). La reacción se detuvo por la adición de 100 μ l. 2N de ácido clorhídrico a cada pocillo, y se leyó la absorbancia a 490 nm (Bio-Rad modelo del lector de microplacas 450; Bio-Rad Laboratorios de Diagnóstico Grupo, Hercules, California). La curva estándar se representa en una escala log-logit por medio de la regresión lineal simple análisis, y los valores para el suero en común y las muestras individuales se lee de la curva.^{8,9}

La inhibición de ELISA

30 La inhibición de ELISA fue desarrollado para examinar la especificidad local de los anticuerpos monoclonales generados a Ara h II. Un centenar de microlitros de proteína Ara II h (1 mg/ml) fue añadido a cada pozo de una placa de microtitulación de 96 pocillos (Gibco) en revestimiento protector (tampón carbonato, pH 9,6) durante 1 hora a 37°C. A continuación, 100 μ l de diferentes concentraciones (hasta 1000-doble exceso) de cada uno de los anticuerpos monoclonales fue añadido a cada pocillo durante 1 hora a 37°C. Después de lavar, una concentración estándar de la preparación biotinilada de anticuerpo monoclonal se añadió durante 1 hora a 37°C. El ensayo se desarrolló mediante la adición del sustrato avidina como en el ELISA arriba.

Una inhibición de ELISA similar se realiza con el conjunto de IgE de suero positivo al cacahuete en lugar del anticuerpo monoclonal biotinilado para determinar la capacidad de cada anticuerpo monoclonal para bloquear un aglutinante específico de IgE.

Resultados

Hibridomas específicos para Ara h II

45 La fusión de células entre las células de bazo obtenidas de hembras BALB/c ratones inmunizados con Ara h II y el ratón mieloma, las células resultaron una serie de hibridomas específicos para Ara h II. Siete anticuerpos monoclonales productoras de líneas fueron elegidas para un estudio posterior. En estudios preliminares las siete líneas que secretan células de hibridomas tenían anticuerpos que delimitan Ara h II, determinados por ELISA e análisis de inmunotransferencia.^{12, 13} Sobre la base de diferentes estudios de unión, cuatro de los hibridomas se utilizaron para su posterior análisis. Según lo determinado por isotipo ELISA específico de inmunoglobulina, las cuatro líneas celulares secretadoras de hibridoma se tipificaron como IgG₁.

ELISA con anticuerpos monoclonales como fase sólida

55 De cuatro preparados de anticuerpos monoclonales (4996D6, 4996C3, 5048B3, y 4996D5) fueron utilizados como anticuerpos de captura en un ELISA con Ara h II como el antígeno. Suero de pacientes individuales, que había respuestas reto positivas al cacahuete, se utilizó para determinar la cantidad de IgE unida a cada fracción de cacahuete capturado por el Ara h II-específica anticuerpo monoclonal (Tabla 1). Un conjunto de suero de referencia positivo al cacahuete se utilizó como suero de control para aglutinación 100%. Siete pacientes que tuvieron respuestas positivas DBPCFC al cacahuete, se eligieron. Los siete pacientes tenían cantidades significativas de IgE específico anti-cacahuete para el antígeno de cacahuete presentado por cada uno de los cuatro anticuerpos monoclonales comparados a los sueros de control (el paciente 8, sin sensibilidad al cacahuete que tenía valores elevados valores de IgE en suero, el paciente 9 sin sensibilidad al cacahuete que tenía valores normales de IgE en suero). Curvas de valoración se realizaron para demostrar que cantidades limitadas de antígeno vinculante no eran responsables de anticuerpos similares vinculantes. No hubo diferencias significativas en los niveles de anticuerpos-anticacahuete IgE específicos para antígenos de cacahuete presentes en cada anticuerpo monoclonal. La mayoría de los pacientes tenían su valor más alto de unión de

IgE para el antígeno de cacahuete presente por cualquiera de 4996D6 o 4996C3, mientras que ningún paciente tuvo su porcentaje más alto de unión de la IgE para el antígeno de cacahuete presentado por anticuerpo monoclonal 4996D5.

Especificidad antigénica de Alimentos de anticuerpos monoclonales para Ara h II

5 Para determinar si los anticuerpos monoclonales ARA h II se unen sólo al antígenos de cacahuete, un método de ELISA fue desarrollado con el cacahuete específico IgE de pacientes que tuvieron respuestas positivas DBPCFC al cacahuete. Los cuatro anticuerpos monoclonales que se caracterizaron totalmente están vinculados únicamente antígeno de cacahuete (Tabla 2). En la prueba ELISA no tuvo lugar aglutinación a soja, habas, o a ovalbúmina.
10 Cuando la mezcla de suero normal se utiliza en la prueba ELISA, ningún IgE no específico de cacahuete o cualquier de ARA h II o crudo de cacahuete pudo ser detectado.

En los Estados Unidos, tres variedades de cacahuete son de consumo habitual: Virginia, Spanish, y Runner. En un ELISA, se intentó determinar si había diferencias en la unión al anticuerpo monoclonal de las tres variedades de cacahuete. Sólo había una pequeña variación con la capacidad del cacahuete-específico IgE para unirse a la captura del antígeno de cacahuete (dato no mostrado).
15

Especificidad de emplazamiento de cuatro anticuerpos monoclonales

20 La inhibición de ELISA se utilizó para determinar la especificidad del sitio de los cuatro anticuerpos monoclonales para Ara h II (Tabla 3). Según lo determinado por el análisis de inhibición de ELISA, hay al menos dos epítomes diferentes en Ara h II, que podría ser reconocido por varios anticuerpos monoclonales (epítomo 1-4996C3, epítomo 2-4996D6, 5048B3, 4996D5). Siete diferentes anticuerpos monoclonales generados a Ara h I, un 63,5 kd alérgeno de cacahuete,⁹ fueron utilizadas para inhibir la unión de la cuatro anticuerpos monoclonales ARA h II a la proteína ARA h II. Ninguno de los anticuerpos monoclonales Ara h I inhibieron cualquier enlace de los anticuerpos monoclonales ARA h II.
25

La especificidad de sitio de cacahuete-específico IgE humano

30 Resultados de ensayos de inhibición con anticuerpos monoclonales para inhibir la unión de la IgE del grupo de muestras de IgE (de los pacientes con hipersensibilidad al cacahuete) a Ara h II se muestran en la Tabla 4. Los anticuerpos monoclonales 4996C3 y 4996D5 inhibieron la especificad-cacahuete IgE hasta aproximadamente el 25%. Los anticuerpos monoclonales 4996D6 y 5048B3 no inhibieron la unión específica-cacahuete IgE. Estos dos sitios de inhibición se corresponden con los dos diferentes epítomos IgE reconocidos por los anticuerpos monoclonales en los experimentos de inhibición.
35

Discusión

40 La vía de administración de alérgenos, la dosificación, frecuencia de la exposición y los factores genéticos, todos determinan el tipo de y la gravedad de una respuesta de la persona alérgica.¹⁴ Para la fecha, no tiene características distintas, lo que permitiría distinguir los alérgenos, como antígenos únicos, han sido identificados.¹⁴ En contraste, sólo tres de los alimentos en los Estados Unidos (leche, huevos y cacahuets) representan aproximadamente el 80% de respuestas positivas a los desafíos de los alimentos en los niños.¹⁵

45 Aunque la sensibilidad clínica para la mayoría de los alimentos suele ser perdida a medida que el paciente envejece, la sensibilidad clínica al cacahuete rara vez es perdida. Por esta razón, es importante examinar los alérgenos de cacahuete para determinar si tienen características distintas que causa la persistencia de las reacciones clínicas.

50 Dos alérgenos principales de cacahuete, Ara h I y Ara h II, recientemente han sido identificados y caracterizados.^{8,9} Ara h I tiene dos bandas principales, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio con un molecular medio de peso de 63,5 kd y un punto isoeléctrico de 4,55. Ara h II tiene un peso molecular medio de 17 kd y un punto isoeléctrico de 5,2. La secuencia individual de Ara h I y Ara h II indica que son probablemente isoalérgenos.⁸ Otros alérgenos del cacahuete se han identificado incluyendo el cacahuete¹⁶ y concanavalina y A-reactiva glicoproteína.¹⁷
55

En este estudio de cuatro anticuerpos monoclonales para Ara h II fueron ampliamente caracterizados. Los cuatro anticuerpos monoclonales producidos a Ara h II, cuando se utiliza como anticuerpos de captura en un ELISA, presentó antígenos que IgE de pacientes con las respuestas al reto positivas al cacahuete. No se detectaron diferencias significativas en la unión de la IgE de cualquiera de pacientes al alérgeno presentado por los anticuerpos monoclonales individuales. En distintos experimentos de ELISA, los cuatro anticuerpos monoclonales generados a Ara h II no se unen a los alérgenos de leguminosas y otros no se unen a una variedad de cacahuete preferentemente.
60

Para determinar la especificidad del epítomo de estos anticuerpos monoclonales, se realizaron pruebas ELISA de inhibición. Como mínimo dos epítomos IgG diferentes y distintos podrían ser identificados en los experimentos con el alérgeno, Ara h II. En los experimentos relacionados hechos con suero acumulado de pacientes con respuestas positivas a DBPCFC de cacahuete, se identificaron dos epítomos IgE similares. Los resultados de este estudio son comparables a los de anticuerpos monoclonales para Der f I¹⁸ en los que se identificaron cinco emplazamientos antigénicos no
65

superpuestos y tres epítomos aglutinantes de IgE. En nuestros estudios anteriores con anticuerpos monoclonales Ara h I,¹⁹ fueron reconocidos cuatro sitios diferentes de antígenos, y tres de estos sitios fueron epítomos aglutinantes de IgE.

En los experimentos relacionados con otros alérgenos, una variedad de sólido en ensayos de inhibición de la fase se han utilizado para bloquear la respuesta de IgE policlonal contra el alérgeno que se estudió.⁶ La interpretación del nivel de la inhibición que deben ser considerada significativa ha variado de 15% al 80%.⁶ Los anticuerpos monoclonales ARA h II inhibe la respuesta de IgE policlonal hasta en un 25%.

La caracterización de estos anticuerpos monoclonales ARA h II permitirá futuros estudios para definir mejor la exacta secuencia de aminoácidos que es responsable de la unión de la IgE. Además, estos anticuerpos monoclonales deben purificar el alérgeno ARA h II mucho más sencillo y más eficiente. La inmovinofinidad de purificación de alérgenos, como la completada con los alérgenos de cucaracha 6 y con el alérgeno de cacahuete Ara h I,¹⁹ ha producido una técnica para purificar el alérgenos de un material heterogéneo de una fuente de crudo.

Los estudios futuros sobre la estructura antigénica y alergénica de los alérgenos pueden utilizarse tanto en las técnicas de anticuerpos monoclonales, como para la tecnología del ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales se utilizará para asignar estos epítomos y identificar los clones de ADNc específicas para los alérgenos. Juntos, la tecnología de ADN recombinante y la producción de anticuerpos monoclonales se utilizará para examinar el papel de T células epítomos específicas en la inducción y la regulación de las respuestas alergénicas.²⁰

Referencias

1. **Yunginger J.W., Jones RT.** A review of peanut chemistry: implications for the standardization of peanut extracts. In: Schaeffer M, Sisk C, Brede HL, eds. Proceedings of the Fourth International Paul Ehrlich Seminar on the Regulatory Control and Standardization of Allergenic Extracts, October 16-17, 1985; Bethesda, Md. Stuttgart: *Gustav Fischer Verlag*, 1987;251-64.
2. **Yunginger JW, Sweeney KG, Sturner WQ, et al.** Fatal food-induced anaphylaxis. *JAMA* 1988;260:1450-2.
3. **Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP.** Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med* 1992; 327:380-4.
4. **Hoffman DR, Haddad ZH.** Diagnosis of IgE-mediated reaction to food antigens by radioimmunoassay. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL* 1974;54:165-73.
5. **Chapman MD.** Purification of allergens. *Curr Opin Immunol* 1989;1:647-53.
6. **Chapman MD.** Monoclonal antibodies as structural probes for mite, cat, and cockroach allergens. *J Immunol* 1987; 139:1479-84.
7. **Mourad W, Mecheri S, Peltre G, David B, Hebert J.** Study of the epitope structure of purified Dac g I and Lol p I, the major allergens of *Dactylis glomerata* and *Lolium perenne* pollens, using monoclonal antibodies. *J Immunol* 1988;141:3486-91.
8. **Burks AW, Williams LW, Connaughton C, Cockrell G, O'Brien TJ, Helm RM.** Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL* 1992;90:962-9.
9. **Burks AW, Williams LW, Helm RM, Connaughton CA, Cockrell G, O'Brien TJ.** Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL* 1991;88:172-9.
10. **Rouse DA, Morris SL, Karpas AB, Probst PG, Chaparas SD.** Production, characterization, and species specificity of monoclonal antibodies to *Mycobacterium avium* complex protein antigens. *Infect Immun* 1990;58:1445-99.
11. **Burks AW, Sampson HA, Buckley RH.** Anaphylactic reactions following gammaglobulin administration in patients with hypogammaglobulinemia; detection of IgE antibodies to IgA. *N Engl J Med* 1986;314:560-4.
12. **Sutton R, Wrigley CW, Baldo BA.** Detection of IgE and IgG binding proteins after electrophoresis transfer from polyacrylamide gels. *J Immunol Methods* 1982;52:83-6.
13. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350-4.
14. **Marsh DG.** Allergens and the genetics of allergy. In: Sela M. ed. The antigens. New York: *Academic Press*. 1975;3:271-359.

15. **Sampson HA, McCaskill CC.** Food hypersensitivity in atopic dermatitis: evaluation of 113 patients. *J Pediatr* 1985; 107:669-75.
16. **Sachs MI, Jones RT, Yunginger JW.** Isolation and partial characterization of a major peanut allergen. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL* 1981;67:27-34.
17. **Barnett D, Howden, MEH, Bonham B, Burley RW.** Aspects of legume allergy research. *proc Sydney Allergy Group* 1985; 4:104-18.
18. **Chapman MD, Heyman PW, Platts-Mills TAE.** Epitope mapping of two major inhalant allergens, Der p I and Der f I, from mites of the genus *Dermatophagoides*. *J Immunol* 1987;139:1479-84.
19. **Burks AW, Cockrell G, Connaughton C, Helm RM.** Epitope specificity and immunoaffinity purification of the major peanut allergen, Ara h I. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL* 1994;93:743-50.
20. **O'Hehir RE, Young DB, Kay AB, Lamb JR.** Cloned human T lymphocytes reactive with *Dermatophagoides farinae* (house dust mite): a comparison of T- and B-cell antigen recognition. *Immunology* 1987;62:635-40.
- 20 *Aislamiento, identificación y caracterización de clones codificadores de antígenos responsables de la hipersensibilidad del cacahuete*

La alergia al cacahuete es un problema de salud debido a la frecuencia, la gravedad potencial, y la cronicidad de la sensibilidad alérgica. Las reacciones de hipersensibilidad de cacahuete a menudo tienden a ser muy graves, a veces se traducen en episodios de la anafilaxia fatal [1,2]. A pesar de la importante prevalencia de reacciones de hipersensibilidad de cacahuete y varias muertes anuales, la identificación de los antígenos clínicamente relevantes y una comprensión de la inmunobiología de cacahuete hipersensibilidad están empezando [3]. La identificación y purificación de alérgenos es esencial para la inmunología de los estudios necesarios para comprender su papel en estimular la formación de anticuerpos IgE. Debido a la prevalencia y la gravedad de reacciones de hipersensibilidad de cacahuete en niños y adultos, junto con la reciente identificación de dos grandes alérgenos de cacahuete que están implicados en este proceso [3,4], nos propusimos clonar y caracterizar el alérgeno de cacahuete Ara h I. El suero de IgE de pacientes con reacciones de hipersensibilidad de cacahuete documentado y una biblioteca de ADNc de cacahuete se utilizaron para identificar los clones que codifican los alérgenos de cacahuete. Uno de los principales alérgenos de cacahuete, Ara h I, fue seleccionado de estos clones usando Ara h I-oligonucleótidos específicos y la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa. Uso de oligonucleótidos (TC) AA (AG) AG (TC) AA (TC) GTNAT (TCA), GA (TC) CA derivada de análisis de la secuencia amino ácido de la Ara h I (63.5 kD) alérgenos de cacahuete como un primer y un 27 oligo-nucleótidos de largo tramo como el segundo iniciador, una parte del ARNm que codifica esta proteína se amplificó a partir de cDNA de cacahuete. Para determinar si este clon (5Ala) representó el Ara h I entero, se utilizó un inserto etiquetado 22P de este clon como una sonda de hibridación de una transferencia de Northern conteniendo poli cacahuete A + ARN. Este inserto hibridazo en un solo tamaño de ARNm de aproximadamente 2,3 kb. El inserto no contenía 1.360 bases de incluida la cola de poli A. La secuencia que comienza en la posición 985 y se extiende a través de la posición de 1032 codifica la secuencia de aminoácidos idéntica a la que se determina a partir del péptido I de Ara h I. El análisis de la secuencia de ADN del inserto clonado reveló que el alérgeno Ara h I tiene una homología significativa con la familia de proteínas vicilina de almacenamiento de semillas encontradas en la mayoría de las plantas superiores [5,6]. Hubo 64% de homología lo largo de más de 1.000 bases cuando se comparó la secuencia del clon 5Ala con las habas y guisantes vicilins. El análisis de inmunoblot IgE se realizó con el suero de IgE de pacientes con hipersensibilidad al cacahuete y para la proteína Ara h I expresada con del clon de 5Ala en células de *Escherichia coli* XL1-Blue para abordar la cuestión de la frecuencia recombinante Ara h que fue reconocido por estos individuos. De los 11 sueros de los pacientes a prueba de esta manera, 8 (73%) tenían IgE que reconoce el Ara h recombinante I (Tabla 5). Hemos demostrado que el gen clonado Ara h es capaz de producir un producto de proteína en las células procariotas que es reconocido por la IgE en suero de un gran número de individuos con hipersensibilidad de cacahuete documentado. Estos resultados son significativos ya que indican que algunos de los epítomos alérgicos responsables de esta reacción son lineales en las secuencias de aminoácidos que no incluyen un componente de hidrato de carbono. Estos resultados pueden proporcionar la base para mejorar el diagnóstico y el tratamiento de las personas con hipersensibilidad a los alimentos. Con la producción de la proteína recombinante de cacahuete ahora será posible abordar la fisiopatología y los mecanismos inmunológicos relacionados con las reacciones de hipersensibilidad específica y de alimentos en general con hipersensibilidad al cacahuete.

60 Referencias

1. **Yunginger JW, Squillace DL, Jones RT, Helm RM:** Fatal anaphylactic reactions induced by peanuts. *Allergy Proc* 1989;10:249-253.
- 65 2. **Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP:** Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J. Med* 1992;327:380-384.

ES 2 344 034 T3

3. **Burks AW, Williams LW, Helm RM, Connaughton C, Cockrell G, O'Brien TJ:** Identification of a major peanut Allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:172-179.

5 4. **Burks AW, Williams LW, Connaughton C, Cockrell G, O'Brien T, Helm RM:** Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, utilizing the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:962-969.

10 5. **Chee PP, Slightom JL:** Molecular biology of legume vicilin-type seed storage protein genes. *Subcell Bioch* 1991; 17:31-52.

6. **Dure L:** An unstable domain in the vicilin genes of higher plants. *N Biol* 1990;2:487-493.

15

TABLA 1

IgE específica de cacahuete al antígeno presentado por cuatro anticuerpos monoclonales

20

Paciente	Anticuerpos de captura			
	4996D6	4996C3	5048B3	4996D5
1	95 %	80 %	80 %	91 %
2	94 %	66 %	72 %	90 %
25 3	96 %	114 %	87 %	96 %
4	98 %	116 %	76 %	96 %
5	97 %	74 %	130 %	107 %
30 6	94 %	63 %	76 %	86 %
7	109 %	123 %	104 %	116 %
8	0 %	0 %	0 %	0 %
35 9	0 %	0 %	0 %	0 %

40

TABLA 2

IgE específica vinculante para las leguminosas capturadas por anticuerpos monoclonales Ara h II

45

		Anticuerpos de captura			
		4996D6	4996C3	5048B3	4996D5
Grupo de muestras de suero	Ara h II (17 kd)	0.451	0.565	0.235	0.381
	Cacahuete crudo	0.137	0.409	0.161	0.170
	Soja	0.053	0.055	0.055	0.015
	Habas	0.033	0.026	0.029	0.025
	Ovoalbúmina	0.028	0.029	0.029	0.035
Suero normal	Ara h II (17 kd)	0.024	0.031	0.038	0.033
	Cacahuete crudo	0.017	0.027	0.028	0.024

65

Los valores son expresados en unidades de densidad óptica.

El grupo de muestras de suero son de pacientes con respuesta positiva a la agresión del cacahuete

ES 2 344 034 T3

TABLA 3

Inhibición de ELISA para cuatro anticuerpos monoclonales para Ara h II

Biotinylated mAb	Inhibidor de anticuerpos				
	4996C3	499606	5048B3	4996D5	Alt 1
4996C3	99 %	8 %	6 %	3 %	1 %
4996D6	0 %	53 %	31 %	18 %	9 %
5048B3	30 %	83 %	100 %	100 %	3 %
4996D5	1 %	44 %	56 %	64 %	8 %

Sitio específico de cuatro anticuerpos monoclonales ARA h II según lo determinado por el análisis de la inhibición de ELISA. Los valores se expresan como porcentaje de inhibición. *mAb*, anticuerpos monoclonales

TABLA 4

Anti-cacahuete individual IgE específica vinculante a Ara h II

Disolución de suero	Disolución de suero					
	1:320	1:100	1:80	1:40	1:20	1:5
4996D6	0 %	0 %	0 %	0 %	3 %	5 %
4996C3	14 %	10 %	10 %	12 %	10 %	24 %
5048B3	0 %	5 %	5 %	5 %	7 %	11 %
4996D5	0 %	10 %	10 %	22 %	23 %	25 %

La especificidad de cuatro anticuerpos monoclonales ARA h II inhibidores de IgE específico anti-cacahuete (grupo de suero de pacientes con hipersensibilidad al cacahuete) unión a Ara h II. Los valores se expresan como por ciento de los IgE específico anti-cacahuete vinculante a Ara h II sin anticuerpo monoclonal.

TABLA 5

Reconocimiento de la proteína Ara h I por el IgE del suero del paciente de pacientes con hipersensibilidad al cacahuete

Paciente	Ara h I recombinante	Ara h I nativo
AC	+	+
BE	-	+
TL	+	+
AS	-	+
KS	+	+
KF	+	+
CS	-	+
SM	+	+
TM	+	+
TH	+	+
JH	+	+

La proteína recombinante o nativa Ara h I fue electroforizada por desnaturalización de geles de poliacrilamida, borrado a la nitrocelulosa, y luego probada con la IgE en suero de pacientes con hipersensibilidad al cacahuete donde se anotó la presencia (+) o ausencia (-) de IgE en suero de Ara h I recombinante o nativa.

Mapeo de Epitopes de la célula B en Ara h I, una Proteína Vicilin Leguminosa y una Mayor Hipersensibilidad Alérgica al Cacahuete

La alergia al cacahuete es un problema de salud debido a la posible gravedad de la reacción alérgica y la dificultad en el diagnóstico certero de esta enfermedad. El suero de IgE en pacientes con hipersensibilidad documentada de reacciones cacahuete y péptidos que se utilizan para identificar la mayor unión de epítomos con el principal alérgeno del cacahuete, Ara h I. Al menos veintitrés diferentes IgE epítomos lineales vinculantes, que se encuentran en toda la longitud de la proteína Ara h I, fueron identificados. Dos de los péptidos que parecían ser epítomos IgE inmunodominantes vinculantes fueron reconocidos por el suero de > 90% de los pacientes examinados. Ningún péptido fue reconocido por más del 50% en la sensibilidad al cacahuete en la población examinada. El análisis mutacional de los epítomos inmunodominantes reveló que solo los cambios de aminoácidos en estos péptidos tuvieron efectos dramáticos sobre características de unión de IgE. Con la identificación de los epítomos de unión de la IgE en la proteína Ara h I y la determinación de los aminoácidos dentro de estos epítomos importantes a la inmunoglobulina vinculante ahora será posible hacer frente a los mecanismos fisiopatológicos e inmunológicos en relación con reacciones de hipersensibilidad de cacahuete específica y alimentos en general.

Introducción

Aproximadamente el 8% de los niños y 1-2% de los adultos tienen algún tipo de alergia a los alimentos (1). El cacahuete, pescado, frutos secos, y mariscos causan la mayoría de las reacciones de hipersensibilidad alimentaria en adultos, mientras que el cacahuete, leche, huevos y causa más del 80% de las reacciones de hipersensibilidad a los alimentos en los niños (2). A diferencia de las reacciones de hipersensibilidad a los alimentos como la leche y los huevos, las reacciones de hipersensibilidad de cacahuete suelen persistir en la edad adulta y para toda la vida (3). Además, la hipersensibilidad de las reacciones a los cacahuetes, tienden a ser más severas que las de los alérgenos alimentarios. Las reacciones alérgicas a los cacahuetes, pueden producir síntomas que van desde la urticaria hasta anafilaxia en los pacientes con hipersensibilidad de cacahuete. Varios informes (4,5) han detallado un fatal desenlace y cerca de las reacciones anafilácticas fatales que ocurren en adolescentes y adultos ocurre después de la ingestión de cacahuetes o de los productos de cacahuete. El diagnóstico de los individuos con hipersensibilidad de cacahuete es a menudo complicado por la presencia de crossreacting anticuerpos frente a otras leguminosas (6). En la actualidad, el único tratamiento eficaz para pacientes con hipersensibilidad de cacahuete es evitar los productos alimentarios que contengan el alérgeno. Esto es cada vez más difícil debido a la inclusión de cacahuetes y productos de cacahuete como extensores de proteínas en muchos alimentos diferentes.

Reacciones de hipersensibilidad alimentaria se presentan poco después del contacto de un alérgeno específico IgE con su correspondiente anticuerpo que están vinculados a las células mastocíticas. El alérgeno-específico IgE cuando se entrecruza con el respectivo alérgeno activa el mástil de las células para la liberación de histamina, heparina y otros mediadores responsables de los síntomas clínicos observados. Así los epítomos IgE de los alérgenos juegan un papel

importante en el proceso de la enfermedad. Su caracterización proporcionará una mejor comprensión de la respuesta inmune humana involucrada en las reacciones de hipersensibilidad a los alimentos. Si la mejora de diagnóstico y las capacidades terapéuticas se desarrollaran ello será importante para determinar la estructura primaria y la frecuencia de el reconocimiento de los epítomos IgE contenida en el alérgeno.

Varios estudios han demostrado que la parte más alergénica del cacahuete es la fracción de proteínas del cotiledón (7). Un alérgeno mayor encontrado en el cotiledón es la proteína de cacahuete, Ara h I (8). Esta proteína es reconocida por 90% de pacientes sensibles al cacahuete, por lo que se establece como un alérgeno importante (8). La mayoría de la detección IgE del alérgeno Ara h I en el suero parece ser debido a epítomos de esta proteína que es lineal en las secuencias de aminoácidos que no contienen cantidades significativas de hidratos de carbono (8,9). El alérgeno Ara h I pertenece a la familia vicilin de las proteínas de almacenamiento de las semillas (9). Resultados previos han demostrado la similitud entre el nivel de IgE a la proteína recombinante Ara I h, y la forma nativa de este alérgeno, cuando el suero del paciente individual fue probado (9). Estos resultados indican que la recombinante proteína podría ser considerada para su uso en los enfoques de diagnóstico y alcance inmunoterapéuticos a la hipersensibilidad de cacahuete.

Debido a la prevalencia y gravedad de las reacciones de hipersensibilidad de cacahuete en niños y adultos, junto con la naturaleza difícil del diagnóstico de esta alergia a los alimentos, nos pusimos en marcha para localizar y caracterizar los epítomos IgE importante del alérgeno Ara h I. En esta comunicación, el informe de la estructura primaria del IgE Ara h I vinculante a epítomos reconocidos por individuos hipersensibles al cacahuete. Dos epítomos que unía suero IgE específico de cacahuete en > 90% de los pacientes examinados fueron identificados. Los aminoácidos importantes para la detección de cacahuete IgE específica de estos epítomos se determina entonces con el propósito de utilizarlos en diagnósticos futuros e aproximaciones inmunoterapéuticos a esta enfermedad.

Materiales y métodos

Los pacientes. El suero de quince pacientes con reacciones de hipersensibilidad documentados de cacahuete (media de edad de 25 años) fue utilizado para identificar el Ara h I IgE uniendo los epitopes. Cada uno de estos individuos tenían un resultado inmediato a pruebas cutáneas de cacahuete y un positivo doble ciego, controlado por un placebo, agresión por alimentos (DBPCFC) o un convincente historial de anafilaxia de cacahuete (edema laríngeo, sibilancias severas, y/o hipotensión). Una persona con niveles elevados de IgE en suero (que no tienen IgE específica de cacahuete o hipersensibilidad de cacahuete) fue utilizado como control en estos estudios. En algunos casos, una mezcla de suero se realizó mediante la mezcla de partes alícuotas de la igualdad de IgE en suero de cada uno de los 15 pacientes con hipersensibilidad al cacahuete. Este grupo de muestras fueron utilizadas en experimentos de análisis de inmunotransferencia para determinar las características de unión de la IgE de la de la población. Al menos cinco ml de sangre venosa se obtuvieron de cada paciente y se permitió que coagulase, y el suero se recogido. Todos los estudios fueron aprobados por el Comité de Uso Humano de Asesoramiento en la Universidad de Arkansas para Ciencias Médicas.

Análisis por ordenador de la secuencia de Ara h I. El análisis de la secuencia del gen de Ara h I (9) y secuencias peptídicas se realizó en la Universidad de Arkansas de Ciencias Médicas por la computadora Vax utilizando el paquete de software de análisis de ADN de Wisconsin. Las regiones predichas antigénicas de la proteína Ara h I se basan en algoritmos desarrollados por Jameson y Wolf (10) que se refiere a la antigenicidad de hidrofiliidad, estructura secundaria, flexibilidad, y la probabilidad de superficie.

Síntesis de péptidos. Los péptidos fueron sintetizados en una membrana de celulosa que contienen grupos libres hidroxilo que utilizan Fmoc-aminoácidos de acuerdo con las instrucciones de fabricación (Genosys Biotecnologías, The Woodlands, TX). La síntesis de cada péptido fue iniciada por esterificación de un Fmocaminoácido de la membrana de celulosa. Después de lavado, todas las funciones residuales del aminoácido de la hoja fueron bloqueadas por acetilación para que no sea reactiva en los siguientes pasos. Cada Fmoc-aminoácido adicional es esterificado a la anterior por este mismo proceso. Después de la adición del último aminoácido pasado en el péptido, las cadenas laterales de los aminoácidos fueron de-protegidas usando una mezcla de diclorometano/ácido trifluoroacético/triisobutilsilano (1/1/0.05), seguido por el tratamiento con diclorometano y el lavado con metanol. Las membranas que contienen péptidos sintetizados fueron inmediatamente investigadas con el suero IgE o almacenados -20°C hasta que necesario.

Ensayo de unión de la IgE. Membranas de celulosa que contienen péptidos sintetizados se incubaron con el suero del grupo de muestras o suero individuales de pacientes con hipersensibilidad de cacahuete diluida (1: 5) en una solución de TBS y 1% de albúmina de suero bovino durante al menos 12 horas a 4°C o 2 horas a temperatura ambiente. La detección del anticuerpo primario fue con anticuerpos anti-IgE etiquetados ¹²⁵I (Sanofi Pasteur Diagnostics, Chaska, MN).

Resultados

Existen Múltiples Regiones IgE Unidas en Toda la proteína Ara h I. La secuencia de proteína de Ara h I se analizó mediante un programa de computadora para modelar y predecir la estructura secundaria de la antigenicidad basada en los parámetros de hidrofiliidad, la estructura secundaria, la flexibilidad, y la probabilidad de superficie. Once regiones antigénicas, cada una con múltiples sitios antigénicos, fue previsto por este análisis a lo largo de toda la longitud de la molécula (Fig. 1).

Setenta y siete péptidos que representan a toda la longitud de la proteína Ara h I se sintetizaron y se probaron con suero del grupo de muestras para determinar la unión de la IgE a las regiones antigénicas predichas, o cualquier otra región de la proteína. Cada péptido era de 15 aminoácidos de longitud y compensa desde el péptido anterior a ocho aminoácidos. Estos péptidos se investigaron con un grupo de muestras de suero IgE de 15 pacientes con hipersensibilidad de cacahuete documentados o con suero IgE de un paciente sin control a la comida alérgica. En la Figura 2A muestra 12 regiones de unión de IgE a lo largo de toda la longitud de la proteína Ara h I reconocida por esta población de pacientes hipersensibles al cacahuete. El suero de IgE del control del paciente no reconoció a cualquiera de los péptidos sintetizados (datos no mostrados). En general, hubo una buena concordancia entre la predicción regiones antigénicas (Fig. 2B, áreas de caja P1-P11) y las que se determinaron (Fig. 2B, a la sombra áreas D1-D12) por IgE actual vinculante. Sin embargo, hubo dos regiones antigénicas predichas (AA221-230; AA263-278) que no fueron reconocidas por el suero IgE individuos hipersensibles al cacahuete. Además, hubo numerosas regiones de unión de la IgE encontradas en la proteína Ara h I entre los aminoácidos 450-600 (Fig. 2A).

Con el fin de determinar la secuencia de aminoácidos de los sitios de unión de la IgE, pequeños péptidos que abarca cada uno de las más grandes regiones de IgE identificadas en la Figura 2 se sintetizaron. Mediante la síntesis de péptidos más pequeños (10 aminoácidos de longitud) que se compensaron entre sí por solo dos aminoácidos que fue posible identificar a cada IgE epítomos de unión individual dentro de la mayor unión de las regiones IgE de la molécula Ara h I molécula. La Figura 3 muestra un inmunoblot representativo y la respectiva secuencia de aminoácidos de la región de unión D2-D3 (AA82-133). Cuatro epítomos (Fig. 3, números 4-7) Se identificaron en esta región. Dibujos similares se realizaron para continuar las regiones de unión de IgE para identificar el núcleo de las secuencias de aminoácidos para cada epítomo IgE. La Tabla 6 resume los 23 epítomos IgE (péptidos 1-23) y sus respectivas posiciones en la molécula Ara h I. Los aminoácidos más comunes encontrados fueron residuos ácidos (D, E) y básicos (K, R) que comprende el 40% de todos los aminoácidos que se encuentran en los epítomos. Además, el tema obviamente no fue compartida la secuencia del amino por los epítomos.

Identificación de común de epítomos Ara h I reconocidos por la IgE en suero de pacientes con hipersensibilidad al cacahuete. Cada conjunto de veintitrés péptidos fue probado con el suero de IgE de 10 personas para determinar cual de los veinte y tres epítomos fueron reconocidos por la IgE en suero de pacientes con hipersensibilidad de cacahuete. El suero de cinco los individuos seleccionados al azar de las 15 grupo de muestras de suero del paciente y otros cinco sueros pacientes hipersensibles al cacahuete que no están representados en el grupo de suero fueron usados para identificar los epítomos comunes. La Figura 4 muestra los resultados de la unión de IgE resultados de las 10 tiras de inmunoblot (A-J) que contienen estos péptidos incubados en suero de pacientes individuales. Todos los sueros de pacientes examinados (10/10) reconocieron epítomos múltiples. El número promedio de los epítomos reconocidos fue 6/sueros pacientes, que van de un suero, que sólo reconoce 2 epítomos a otro suero de paciente que reconoce 12 epítomos. Los resultados se resumen en la Tabla 7. Curiosamente, el epítomo 17 fue reconocido por todos los sueros de los pacientes a prueba (10/10) y epítomo 4 fue reconocido por el 90% (9/10) de los sueros de los pacientes a prueba. Ningún otro epítomo fue reconocido por más del 50% de los sueros de los pacientes prueba.

Características de la unión de IgE con epítomos mutados Ara h I. Los aminoácidos esenciales para la unión de IgE en epítomos 4 y 17 se determinaron mediante la síntesis de péptidos duplicados con el único aminoácido cambia en cada posición. Los aminoácidos fueron cambiados o bien por residuos de una alanina o glicina ya que estos aminoácidos tienen grupos pequeños R. Estos péptidos fueron probados con el grupo de muestras de suero IgE de 15 pacientes con hipersensibilidad al cacahuete para determinar si el cambio afecto a la IgE específica vinculante de cacahuete. Los resultados se muestran en la Figura 5. Es evidente que una sola sustitución de un aminoácido tiene efectos dramáticos sobre las características de la unión de la IgE al péptido. La sustitución de cualquier aminoácido en la región 91-96, de epítomo 4 resultó casi la pérdida completa de la unión de la IgE a este epítomo. En epítomo 17, la sustitución de tirosina residual en la posición 500 o la sustitución del ácido glutámico residual en la posición 506 también dio lugar a espectaculares disminución de la unión de la IgE.

La secuencia significativa homóloga entre epítomos 4 y 17 y las proteínas de almacenamiento de las semillas de otras plantas podrían explicar la presencia de anticuerpos de reacción cruzada con otras leguminosas, lo que complica el diagnóstico. Para evaluar la prevalencia de las secuencias de aminoácidos, de epítomo 4 y 17 en las proteínas de almacenamiento de semillas, la secuencia completa del amino ácido Ara h I fue utilizada por primera vez para seleccionar todas las proteínas vegetales que compartían una secuencia homóloga con el vicilin de cacahuete. Había 93 entradas seleccionadas en esta base, en representación de secuencias de aminoácidos depositadas en la base de datos de proteínas de una variedad de las proteínas de almacenamiento de semillas. La secuencia de aminoácidos para el epítomo 17 estaba presente en muchas de estas proteínas con la secuencia idéntica que va desde 20-60%. Curiosamente, incluso en aquellas proteínas con sólo el 20% de identidad de tirosina en la posición 500 y el residuo de ácido glutámico en la posición 506, casi siempre se conservada (Cuadro 8). La secuencia de aminoácidos para el epítomo 4 estaba presente en un menor número de estas proteínas con la identidad de secuencia entre 20-30%. En todos los casos, al menos, uno de los aminoácidos en las posiciones 91-96 eran diferentes de los vicilin de cacahuete (Cuadro 8).

Discusión

El desarrollo de una respuesta de IgE a un alérgeno implica una serie de interacciones entre las células T y B las células. Las células B teniendo un antígeno adecuado receptor interactúan con la proliferación de T células alérgénicas específicas las cuales lidera un cambio de isotipo y la generación de antígenos específicos IgE. El antígeno IgE

específica se une a la superficie los receptores de los mastocitos, basófilos, macrófagos y otras CPA permite al sistema inmunitario para responder a la siguiente encuentro con el antígeno específico (epítipo de células B). Debido a que el antígeno específico IgE juega un papel crítico en la etiología de las enfermedades alérgicas, la determinación de alérgenos específicos, el epítipo IgE de unión es un importante primer paso hacia una mejor comprensión de este complejo proceso de la enfermedad.

Las vicilinas son proteínas de almacenamiento de semillas en la mayoría de las plantas superiores (11). Una comparación de las secuencias de los aminoácidos vicilin de diferentes fuentes vegetales revela que existe una considerable homología de secuencia entre los dos tercios carboxilo de todas estas moléculas. La principal diferencia entre las vicilinas se encuentra en el extremo amino terminal de estas de proteínas donde una parte de la secuencia detecta (11). En los estudios de comparación de las secuencias (9) con otras leguminosas, el vicilin de cacahuete, Ara h I se ajusta a esta regla general con la mayor similitud siendo encontrada en el carboxilo las dos terceras partes de esta molécula.

En el presente estudio hemos determinado que hay varios sitios antigénicos previstos para el alérgeno Ara h I. En general, como se ha encontrado con otros alérgenos (12,13), hubo un buen acuerdo entre los residuos predicho por el análisis informático y las células B epítipos determinadas por el análisis experimental de los péptidos superpuestos. Esta fuerte correlación entre los previstos y determinados epítipos se debe probablemente a la capacidad del modelo de computadora para predecir qué regiones de la molécula están expuestas en la superficie del alérgeno, haciéndolas accesibles a las interacciones de inmunoglobulina. Hay por lo menos 23 diferentes sitios de reconocimiento de IgE en los principales alérgenos de maní Ara h I. Estos sitios se distribuyen en toda la proteína. La identificación de epítipos múltiples en un único alérgeno no es nueva. Los alérgenos de leche de vaca (14), bacalao (15), avellanas, (16), soja (17) y camarones (18), han demostrado que contienen múltiples epítipos de unión de la IgE. La observación de que la mayoría de estas proteínas tienen múltiples sitios de unión de IgE probablemente refleja la naturaleza policlonal de la respuesta inmune a ellos y puede ser un paso necesario en el establecimiento de una proteína como un alérgeno.

La elucidación de la unión principal epítipos IgE en Ara h también nos puede permitir comprender mejor los mecanismos inmunopatogenicos que participan en la hipersensibilidad de cacahuete. Resultados recientes sugieren que existe un uso preferencial de cadena pesada variable en la síntesis de IgE y un cambio directo de la producción de IgM a la síntesis de IgE (19). Esto sugiere que los epítipos responsables del antígeno específico de la producción de anticuerpos IgE pueden diferir de los que promueven los antígenos específicos anticuerpos IgG. La inmunoterapia logra que la utilización de los péptidos que representan epítipos IgG puede ser capaz de cambiar el equilibrio de antígeno específico de la producción de anticuerpos IgE frente a la IgG. En estos momentos estamos identificando cual de la unión de los epítipos IgE también se unen los IgG para determinar si esto sería una estrategia viable para los pacientes con hipersensibilidad al cacahuete.

Dos de los péptidos Ara h I parecen ser epítipos IgE inmunodominantes vinculantes que son reconocidos por > 90% de los sueros de los pacientes a prueba. Curiosamente, el epítipo 17 que se encuentra en el extremo carboxilo de la proteína (AA 498-507), se encuentra en una región que comparte una secuencia homóloga significativa con vicilinas de otras leguminosas. Los aminoácidos importantes para unión de la IgE también parecen estar conservados en esta región y puede explicar la posible reacción de anticuerpos a otras leguminosas que se pueden encontrar en el suero de pacientes con un DBPCFC positiva a los cacahuets. El epítipo 4, ubicado en la porción terminal amino (AA 89-98) de la proteína, parece ser único para este vicilina de cacahuete y no comparte la secuencia homóloga importante con vicilinas de otras leguminosas. Además, los aminoácidos importantes de IgE en esta región, no se conservan. Estos resultados nos permiten desarrollar herramientas de diagnóstico más sensibles y específicas y llevar el diseño de nuevos agentes terapéuticos para modificar la respuesta alérgica a los cacahuets.

La única opción terapéutica disponible en la actualidad para la prevención de una reacción de hipersensibilidad a los alimentos es evitar la ingestión de alimentos. Lamentablemente, para un alimento repartido en todas partes como es el cacahuete, la posibilidad de una ingestión inadvertida es grande. Una opción terapéutica que se emplea ampliamente para los pacientes con reacciones alérgicas a aeroalérgenos y venenos de diversas picaduras de insecto es la inmunoterapia de desensibilización. La inmunoterapia alérgica consiste en inyecciones de cantidades crecientes de los alérgenos a los que un paciente tiene hipersensibilidad inmediata de tipo I (20,21). Los alérgenos son generalmente, para la inmunoterapia, extraídas de fuentes naturales y representan una mezcla de varias proteínas diferentes, a muchas de las cuales el paciente no es alérgico. Estos no componentes no-alérgicos pueden inducir una respuesta IgE en pacientes hiposensibilizados (22) lo que complica su uso como una herramienta terapéutica. Una de las importantes mejoras en la inmunoterapia con alérgenos ha sido el uso de extractos alérgicos estandarizados que ha sido posible gracias a la utilización de alérgenos recombinantes (23,24). Mientras que el mecanismo absoluto de la inmunoterapia es desconocido, un aumento de la actividad de los anticuerpos IgG o IgG4, una disminución de los niveles de los alérgenos-específicos y una disminución en la actividad de los basófilos han sido implicadas (25-28) en la medida de esta respuesta. Debido a que la inmunoterapia con alérgenos se ha demostrado eficaz para el tratamiento de algunas alergias, el tratamiento de inmunoterapia con cacahuete está siendo estudiado como una posible opción (29). Nuestro trabajo muestra los epítipos IgE de un importante alérgeno de cacahuete que pueden permitir el uso de epítipos inmunodominantes en este enfoque. Una posible ventaja de utilizar péptidos sobre todo con el alérgeno es la reducción de peligro de anafilaxia. La degranulación de los mastocitos requiere que el entrecruzamiento de los anticuerpos tipo IIE de alta afinidad a los receptores de FcεR I (30). Los péptidos que contienen epítipos simples IgE serían incapaces de unirse a más de un anticuerpo IgE y por lo tanto incapaz de enlace cruzado la IgE. Actualmente estamos explorando esta posibilidad en estudios *in vitro* y en modelos *in vivo*.

Referencias

1. **Jansen J.J.**, A.F.M. **Kardinaal**, G. **Huijber**, B.J. **Vleig-Boerstra**, B.P. **Martens**, and T. **Ockhuizen**. 1994. Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J. Allergy Clin. Immunol.* 93:446-456.
- 5 2. **Sampson H.A.** 1988. The role of food allergy and mediator release in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 81:635-645.
3. **Bock S.A.**, and F.M. **Atkins**. 1989. The natural history of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 83:900-904.
- 10 4. **Sampson H.A.**, I. **Mendelson**, and J.P. **Rosen**. 1992. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N. Engl. J. Med.* 327:380-384.
- 15 5. **Yunginger**, J.W., K.G. **Sweeney**, W.Q. **Sturner**, L.A. **Giannandrea**, J.D. **Teigland**, M. **Bray**, P.A. **Benson**, J.A. **York**, L. **Biedrzycki**, D.L. **Squillace**, *et al.* 1988. Fatal food-induced anaphylaxis. *JAMA*, 260:1450-1452.
6. **Bernhisel-Broadbent**, J., S. **Taylor**, and H.A. **Sampson**. 1989. Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. II. Laboratory correlates *J. Allergy Clin. Immunol.* 84: 701-709.
- 20 7. **Taylor**, S.L., W.W. **Busse**, M.I. **Sachs**, J.L. **Parker**, and J.W. **Yunginger**. 1981. Peanut oil is not allergenic to peanut sensitive individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 68:372-375.
8. **Burks A.W.**, L.W. **Williams**, R.M. **Helm**, C. **Connaughton**, G. **Cockrell**, T. **O'Brien**. 1991. Identification of a major peanut allergen Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* 88:172-179.
- 25 9. **Burks A.W.**, G. **Cockrell**, J.S. **Stanley**, R.M. **Helm**, G.A. **Bannon**. 1995. Recombinant peanut allergen Ara h I expression and IgE binding in patients with peanut hypersensitivity. *J. Clin. Invest.* 96:1715-1721.
- 30 10. **Jameson**, B.A., and H. **Wolf**. 1988. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput. Appl. Biosci.* 4:181-186.
11. **Gibbs**, P.E., K.B. **Strongin**, and A. **McPherson**. 1989. Evolution of legume seed storage proteins a domain common to legumins and vicilins is duplicated in vicilins. *Mol. Biol. Evol.* 6:614-623.
- 35 12. Van **Kampen**, V., W.M. **Becker**, Z. **Chen**, H.P. **Rihs**, G. **Mazur**, M. **Raulf**, V. **Liebers**, S. **Isringhausen-Bley**, and X. **Baur**. 1994. Analysis of B-cell epitopes in the N-terminal region of Chi t I component III using monoclonal antibodies. *Molecular Immunol.*, 31:1133-1140.
- 40 13. **Breiteneder**, H., F. **Ferreira**, A. **Reikerstorfer**, M. **Duchene**, R. **Valenta**, K. **Hoffman-Sommergruber**, C. **Ebner**, M. **Breitenbach**, D. **Kraft**, O. **Scheiner**. 1992. Complementary DNA cloning and expression in Escherichia coli of Aln g I, the major allergen in pollen of alder (*Alnus glutinosa*). *J. Allergy Clin. Immunol.*, 90: 909-917.
- 45 14. **Ball G.**, M.J. **Shelton**, B.J. **Walsh**, D.J. **Hill**, C.S. **Hosking**, and M.E. **Howden**. 1994. A major continuous allergenic epitope of bovine beta-lactoglobulin recognized by human IgE binding. *Clinical and Experimental Allergy*. 24: 758-764.
15. **Aas**, K. and S. **Elsayed**. 1975. Physico-chemical properties and specific activity of a purified allergen (codfish). *Developments in Biological Standardization*. 29:90-98.
- 50 16. **Elsayed**, S., E. **Holen**, and T. **Dybendal**. 1989. Synthetic allergenic epitopes from the aminoterminal regions of the major allergens of hazel and birch pollen. *Int'l. Archives of Allergy & Applied Immunology*, 89:410-415.
17. **Herian**, A.M., S.L. **Taylor**, and R.K. **Bush**. 1990. Identification of soybean allergens by immunoblotting with sera from soy-allergic adults. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 92:193-198.
- 55 18. **Shanti**, K.N., B.M. **Martin**, S. **Nagpal**, D.D. **Metcalf**, and P.V. **Rao**. 1993. Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. *J. of Immunology*. 151:5354-5363.
- 60 19. Van der **Stoep**, N., W. **Korver**, and T. **Logtenberg**. 1994. *In vivo* and *in vitro* IgE isotype switching in human B lymphocytes: evidence for a predominantly direct IgM to IgE class switch program. *European J. of Immunol.*, 24:1307-1311.
20. **Reisman**, R.E. 1994. Fifteen years of hymenoptera venom immunotherapy:changing concepts and lessons. *Allergy Proceedings*, 15:61-63.
- 65 21. **Fitzsimons**, T., and L.C. **Grammer**. 1990. Immunotherapy-definition and mechanism. *Allergy Proc.*, 11:156.

22. **Birkner, T., H. Rumpold, E. Jarolim, H. Ebner, M. Breitenbach, O. Scheiner, and D. Kraft.** Evaluation of immunotherapy-induced changes in specific IgE, IgG, and IgG-subclasses in birch pollen allergic patients by means of immunoblotting. Correlation with clinical response. *Allergy*, 45:418-426.
- 5 23. **Scheiner, O.** 1992. Recombinant allergens: biological, immunological and practical aspects. *Int Arch Allergy Immunol.*, 98:93-96.
24. **Gordon, B.R.**, 1995. Future immunotherapy: what lies ahead *Otolaryngol Head Neck Surg.*, 113:603-605.
- 10 25. **Sparholt, S.H., O.T. Olsen, and C. Schou.** 1992. The allergen specific B-cell response during immunotherapy. *Clinical and Experimental Allergy*, 22:648-653.
26. **Gieni, R. S., X. Yang, and K.T. Hayglass.** 1993. Allergen-specific modulation of cytokine synthesis patterns and IgE responses *in vivo* with chemically modified allergen. *The Journal of Immunol.*, 150:302-310.
- 15 27. **Secrist, H., C.J. Chelen, Y. Wen, J.D. Marshall, and D.T. Umetsu.** 1993. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J. Exp. Med.*, 178: 2123-2130.
28. **Garcia, N.M., N.R. Lynch, M.C. Di Prisco, and R.I. Lopez.** 1995. Nonspecific changes in immunotherapy with house dust extract. *J Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 5: 18-24.
- 20 29. **Oppenheimer, J.J., H.S. Nelson, S.A. Bock, F. Christensen, and D.Y. Leung.** 1992. Treatment of peanut allergy with rush immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 90:151-152.
- 25 30. **Fung-Leung, W.P., J. DeSousa-Hitzler, A. Ishaque, L. Zhou, J. Pang, K. Ngo, J.A. Panakos, E. Chourmouzis, F.T. Liu, and C.Y. Lau.** 1996. Transgenic mice expressing the human high-affinity immunoglobulin (Ig) E receptor alpha chain respond to human IgE in mast cell degranulation and in allergic reactions. *J. of Exp. Med.*, 183:49-56.

30 Agradecimientos

Leyendas de las figuras

35 Figura 1. *Hay varios sitios predichos antigénicos prevista en el alérgeno Ara h I.* La secuencia de aminoácidos de la proteína Ara h I fue analizada para posibles sitios antigénicos del algoritmo Jameson y Wolf (1988). Estas predicciones se basan en un modelo que relaciona la antigenicidad y la hidrofiliidad, la estructura secundaria, la flexibilidad, y la superficie probabilidad. Hubo 11 (1-11) regiones predichas que contenían varios sitios antigénicos (octógonos) a lo largo de todo la de longitud de la molécula. Los residuos de aminoácidos (pequeñas cantidades) son representados como alfa-helicoidal (curva sinusoidal), Betasheet (ver los dientes de sierra), y la bobina (curva sinusoidal plana) conformaciones. Beta se convierte denotada por las inversiones de la cadena.

45 Figura 2. *Múltiples regiones IgE identificadas en el alérgeno Ara h I.* Fig. 2A; superior del panel: el mapeo del epitopo se realizó en el alérgeno Ara h I mediante la síntesis de la proteína completa en 15 aminoácidos de largo superposición de péptidos que se compensaron entre sí por 8 aminoácidos. Estos péptidos fueron probados con un grupo de IgE en suero de 15 pacientes con hipersensibilidad de cacahuete documentados. La posición de los péptidos de la proteína Ara h I fueron indicadas en la parte izquierda de este panel. Fig. 2B Bajo Control: La secuencia de aminoácidos de la proteína Ara h I se muestra en el panel inferior. Los números corresponden a las cajas regiones antigénicas predichas (P1-P11). El tramado de cajas (D1-D12) corresponden a las regiones de unión de la IgE que se muestra en la Figura 2A.

55 Figura 3. *Núcleos de epítomos IgE identificados en el alérgeno Ara h I.* Panel A: el mapeo completo del epitopo se realizó en las regiones de unión de IgE identificado en la figura. 2 de la síntesis de 10 aminoácidos péptidos a lo largo del desplazamiento de cada uno de otros dos aminoácidos. Estos péptidos fueron probados con un grupo de IgE en suero de 15 pacientes con documentada hipersensibilidad de cacahuete. Los datos mostrados representan las regiones D2 y una parte de D3 que abarca de los residuos de aminoácidos 82-133. Los números correspondientes a los péptidos se muestra en Tabla 6. Grupo B: La secuencia de aminoácidos (residuos 82-133) de Ara h I, que fue probado en el Panel A es mostrada. Las áreas sombreadas de los cuadros corresponden a péptidos de unión de IgE en el Panel A.

60 Figura 4. *Epítomos Ara h I comúnmente reconocidos.* Los núcleos de los epítomos IgE fueron sintetizados (10 aminoácidos ácidos de largo) y luego fueron probados individualmente con la IgE en suero de 10 pacientes con hipersensibilidad de cacahuete documentada. El panel superior representa el lugar donde cada uno de los péptidos Ara h I (1-23) fueron colocados en la membrana. Los paneles A-J muestran los péptidos que son unidos al suero de IgE de los pacientes con hipersensibilidad de cacahuete. El panel de control fue probado con sueros de un paciente con IgE elevada, pero que no tiene hipersensibilidad de cacahuete.

ES 2 344 034 T3

Figura 5. *Aminoácidos involucrados en la unión de la IgE*. Los epítomos 4 y 17 fueron sintetizados con una glicina (G) o alanina (A) sustituido por uno de los aminoácidos en cada uno de estos péptidos y luego se probó con un grupo de IgE en suero de 15 pacientes con hipersensibilidad de cacahuete documentado. Las cartas en la parte superior de cada panel indica el código de letras del amino ácido para el residuo normalmente en esa posición y el aminoácido que fue sustituido por ello. Los números indicar la posición de cada residuo en el Ara h I de la proteína.

TABLA 6

Epítomos Ara h I IgE vinculantes

10

15

20

25

30

35

40

45

50

<u>Péptido</u>	<u>Secuencia AA</u>	<u>Posición Ara h I</u>
1	<u>AKSSPYQKKT</u>	25-34
2	<u>QEPDDLKQKA</u>	48-57
3	<u>LEYDPRLVYD</u>	65-74
4	<u>GERTRGRQPG</u>	89-98
5	<u>PGDYDDDRRQ</u>	97-105
6	<u>PRREEGGRWG</u>	107-116
7	<u>REEREEDWRQP</u>	123-132
8	<u>EDWRRPSHQQ</u>	134-143
9	<u>QPRKIRPEGR</u>	143-152
10	<u>TPGQFEDFFP</u>	294-303
11	<u>SYLQEFSRNT</u>	311-320
12	<u>FNAEFNEIRR</u>	325-334
13	<u>EQEERGQRRW</u>	344-353
14	<u>DITNPINLRE</u>	393-402
15	<u>NNFGKLFVK</u>	409-418
16	<u>GTGNLELVAV</u>	461-470
17	<u>RRYTARLKEG</u>	498-507
18	<u>ELHLLGFGIN</u>	525-534
19	<u>HRIFLAGDKD</u>	539-548
20	<u>IDQIEKQAKD</u>	551-560
21	<u>KDLAFPGSGE</u>	559-568
22	<u>KESHFVSARP</u>	578-587
23	<u>PEKESPEKED</u>	597-606

Las partes subrayadas de cada péptido son las más pequeñas secuencias de unión de la IgE, determinado por el análisis de tal como se describe en la figura. 3.

55

60

65

ES 2 344 034 T3

TABLA 7

IgE de unión de núcleos de epítomos Ara h I mediante suero de individuos hipersensibles al cacahuete

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	Epitopos / Paciente
A				X	X									X			X	X		X				6
B	X	X		X	X										X		X							6
C	X	X	X	X	X	X		X			X	X	X	X	X							X		12
D	X			X	X								X	X	X									6
E			X	X			X	X	X	X	X						X			X	X	X		11
F		X		X					X								X							4
G	X	X	X										X			X	X							6
H		X		X													X							3
I				X			X	X									X	X	X	X			X	8
J			X				X	X			X						X			X		X		7
	4	5	3	9	4	1	0	3	4	2	1	3	3	1	3	1	10	2	1	4	1	3	1	Pacnt/Epitopos

Los pacientes están indicados en letras (A-J) a la derecha de la tabla. Los péptidos Ara h I están indicados en números (1-23) a lo largo de la tabla. El número de epítomos reconocidos por cada paciente (epítomos/paciente) se muestra en la parte derecha de la tabla. El número de pacientes que reconocieron cada epítomo (pacientes/epítomos) es mostrado en la parte superior de la tabla. Una X indica que un péptido vincula a IgE.

TABLA 8

Comparación de aminoácidos de epítomos 4 y 17 Ara h I con regiones similares en las proteínas de almacenamiento de semillas

	EPITOPO 4		EPITOPO 17
<u>Ara h I</u>	GER <u>TR</u> GR <u>Q</u> PG	Ara h I	RRY <u>T</u> AR <u>L</u> KE <u>G</u>
<u>Soja</u>	F <u>P</u> R <u>P</u> Q <u>P</u> R <u>Q</u> EE	<u>Soja</u>	<u>R</u> K <u>Y</u> R <u>A</u> E <u>L</u> S <u>E</u> Q
<u>Cacao</u>	- <u>E</u> Q <u>C</u> E <u>Q</u> R <u>C</u> E <u>R</u>	<u>Haba Blanca</u>	<u>R</u> R <u>Y</u> A <u>A</u> T <u>L</u> S <u>E</u> G
<u>Guisante</u>	EE <u>H</u> EE <u>E</u> K <u>Q</u> K <u>Y</u>	<u>Guisante</u>	Q <u>R</u> Y <u>E</u> A <u>R</u> L <u>A</u> D <u>G</u>
<u>Maiz</u>	W <u>E</u> D <u>D</u> N <u>H</u> H <u>H</u> H <u>H</u>	<u>Haba</u>	Q <u>N</u> Y <u>K</u> A <u>K</u> L <u>S</u> P <u>G</u>

Los péptidos que representan a los epítomos 4 y 17 Ara h I se compararon con regiones similares de otras proteínas de almacenamiento de semillas. Los residuos de aminoácidos importantes para unión de la IgE se indican como letras en negrita subrayadas. Aquellos aminoácidos que son idénticos a la secuencia de Ara h I están subrayados.

El principal alérgeno de cacahuete Ara h 2 es una semilla de almacenamiento de proteínas con múltiples epítomos de unión de IgE

5 Introducción

Las reacciones de hipersensibilidad inmediata a los alimentos se producen en aproximadamente el 4% de los niños y el 1% de los adultos y están mediadas por la producción de anticuerpos IgE frente a las glicoproteínas que son abundantes en los alimentos. Los cacahuets son uno de los principales causantes de graves reacciones alérgicas en niños y adultos. La hipersensibilidad a los cacahuets, a menudo comienza en la infancia y continúa durante toda la vida. Esto está en contraste con otras alergias a los alimentos infantiles, como la leche y los huevos que, en general se resuelven espontáneamente con la edad. Además, la alergia al cacahuete es más probable que cause anafilaxia fatal que cualquier otro alimento alérgico. En la actualidad, el evitar la ingesta de alimentos es el único medio eficaz de hacer frente a la alergia alimentaria, pero el uso de cacahuets y productos secundarios de cacahuete como suplementos en muchos alimentos diferentes hace que el consumo accidental casi inevitable. De ahí, la prevalencia y la naturaleza crónica de la alergia al cacahuete, la posible gravedad de la reacción alérgica, y el uso generalizado del cacahuete en los alimentos de consumo por lo que exige mejorar los métodos de gestión de hipersensibilidad de cacahuete.

Las reacciones de hipersensibilidad alimentaria se presentan poco después del contacto de un alérgeno específico con sus correspondientes anticuerpos IgE que están vinculados a las células mastocíticas. El entrecruzamiento del alérgeno-específico IgE con el alérgeno respectivo activa de los mastocitos para la liberación de histamina, heparina y otros mediadores responsables de los síntomas clínicos observados. Así, los epítomos IgE vinculantes de los alérgenos juegan un papel importante en el proceso de la enfermedad. Su caracterización proporcionará una mejor comprensión de la respuesta inmune humano involucrado en las reacciones de hipersensibilidad a los alimentos. Si mejorara el diagnóstico y las capacidades terapéuticas se desarrollaría una importante determinación de la estructura primaria de los principales alérgenos, los sitios de unión de la IgE de estos alérgenos, y la frecuencia de reconocimiento de los epítomos unión de la IgE que se identifican.

Varios estudios han demostrado que la parte más alérgica del cacahuete es la fracción de proteínas del cotiledón. Dos glicoproteínas muy abundantes en el cotiledón son los alérgenos de cacahuete, Ara h 1 y Ara h 2. Estas proteínas son reconocidas por el suero IgE en > 90% de los pacientes sensibles al cacahuete, estableciéndose así como los alérgenos importantes. La mayoría de reconocimiento de los alérgenos Ara h 1 y h Ara 2 de la IgE en suero parece deberse a epítomos dentro de estas proteínas que son secuencias lineales de aminoácidos que no contienen cantidades significativas de hidratos de carbono. El gen que codifica el Ara h 1 alérgico ha sido clonado, secuenciado, e identificado como una proteína de almacenamiento de semillas pertenecientes a la familia de proteínas vicilin de almacenamiento de las leguminosas.

El alérgeno importante de cacahuete, Ara h 2, ha sido clonado y la secuencia de nucleótidos determinada. La secuencia de aminoácidos derivada se ha utilizado para la construcción de péptidos sintéticos y realiza un examen detallado de los epítomos lineales de unión de la IgE de esta proteína.

Procedimiento experimental

Pacientes. Del suero de 15 pacientes con hipersensibilidad de cacahuete documentada (edad media de 25 años) se utilizó para identificar los alérgenos de cacahuete. Cada uno de estos individuos tenían un ensayo intradérmico inmediato positivo al cacahuete y bien una amenaza alimentaria doble-ciego, placebo controlado, positiva o un historial convincente de la anafilaxia de cacahuete (edema laríngeo, grave sibilancias y/o hipotensión). Los detalles del procedimiento de agresión y la interpretación han sido discutidos previamente. Una persona con niveles elevados de IgE en suero (que no tienen la IgE específica de cacahuete o hipersensibilidad de cacahuete), fue utilizada como control en estos estudios. Al menos cinco ml de sangre venosa se obtuvieron de cada paciente y se dejó coagular, y se recogió el suero. Todos los estudios fueron aprobados por el Comité de Uso Humano Consultiva de la Universidad de Arkansas para Ciencias Médicas.

Aislamiento y análisis de la secuencia de aminoácidos de alérgeno de cacahuete Ara h 2. El Ara h 2 se purificó cerca de la homogeneidad a partir de la totalidad de extractos de cacahuete, conforme a los métodos de Burks *et al.* El Ara h 2 purificada fue electroforesizada al 12,5% de acrilamida mini-geles (Bio-Rad. Hércules, CA) en buffer Tris glicina. Los geles se tiñeron con 0,1% de Coomassie azul en el 10% de ácido acético, metanol al 50% y 40% de agua durante 3 horas sin dejar de agitar. Fracciones de gel que contiene Ara h II fueron enviados a la W.M. Keck Foundation (Laboratorio de Biotecnología de Recursos, Universidad de Yale, New Haven CT) para la secuencia de aminoácido. La secuencia de aminoácidos de la intacta Ara h 2 y péptidos trípticos de esta proteína se llevó a cabo en un Applied Biosystems con un secuenciador on-line HPLC columna que se eluye con concentraciones crecientes de acetonitrilo.

Aislamiento de ARN de cacahuete y geles (ARN) Northern. De tres lotes comerciales de la cosecha de 1979, de especies de grado medio de cacahuete, *Arachis hypogaea* (Florunner) se obtuvieron de la Universidad Estatal de Carolina del Norte para este estudio. La totalidad de ARN fue aislado de un gramo de este material de acuerdo a los procedimientos descritos por Larsen. Poly A + ARN fue aislado, utilizando un kit de purificación suministrado por la investigación en colaboración (Bedford MA) según las instrucciones de fabricación. Poly A + ARN fue sometido

ES 2 344 034 T3

a electroforesis en 1,2% de formaldehído de geles de agarosa, transferidos a la nitrocelulosa, e hibridado con 32P-etiquetadas con sondas marcadas de acuerdo a los métodos de Bannon *et al.*

5 *Análisis por ordenador de la secuencia Ara h II.* El análisis de la secuencia del gen Ara h 2 se realizó en la Universidad de de Arkansas para las Ciencias Médicas de equipo Vax utilizando el paquete de software de análisis de ADN de Wisconsin. Los epítomos Ara h 2 predichos se basan en un algoritmo desarrollado por Jameson y Wolf (1988) que relaciona la antigenicidad con hidrofiliidad, estructura secundaria, flexibilidad, y probabilidad de superficie.

10 *Construcción y cribado de biblioteca de expresión de ADNc.* El cacahuete poly A + ARN fue utilizado para sintetizar la doble cadena de ADNc de acuerdo con los métodos de Watson y Jackson y Huynh *et al.* El ADNc fue tratado con EcoRI metilasa y luego ligado con EcoRI y enlazadores XhoI. El ADN fue ligado con EcoRI corte XhoI, brazos fago Lambda ZAP XR tratados con fosfatasa (Stratagene, La Jolla, CA) e *in vitro* envasados. La biblioteca fue del 95% recombinante para llevar a tamaños de plaquita > 400 pb. La biblioteca se selecciona mediante un grupo de anticuerpos IgE, que consiste en un volumen igual de suero de cada paciente con hipersensibilidad de cacahuete. La
15 detección del anticuerpo primario fue marcada con I¹²⁵ anti-IgE de anticuerpos de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sanofi, Chaska, MN).

20 *Amplificación por PCR de la secuencia ARNm de Ara h 2.* Utilizando los oligonucleótidos CA (AG) CA (AG) TGGGA (AG) TT (AG) CA (AG), GG (N) GA (TC) AG derivadas de análisis de la secuencia amino ácido del alérgeno de cacahuete Ara h 2 como una imprimación y de una imprimación larga de 23 nucleótidos los cuales hibridiza al vector Bluescript, el ADNc que codifica Ara h 2 fue amplificado a partir de los clones de IgE positivo. Las reacciones se llevaron a cabo en un tampón que contiene 3 mM de MgCl₂, 500 mM de KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0. Cada ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa consistió en 1 min a 94°C, seguido de 2 min a 42°C, y tres minutos a 72°C. Treinta ciclos fueron realizados con ambos cebadores presentes en todos los ciclos. De esta reacción, un clon
25 lleva un inserto de aproximadamente 700 bp fue identificado.

30 *ADN secuencial y análisis.* La secuenciación de ADN se realizó de acuerdo a los métodos de Sanger *et al* y utilizando ya sea iniciadores de oligonucleótidos etiquetados en el extremo ³²P o en un secuenciador automático de ADN modelo ABI 377 mediante nucleótidos fluorescentes marcados. La mayoría de las áreas de la clonación fueron secuenciadas por lo menos dos veces y en algunos casos, en ambas direcciones para garantizar una secuencia de nucleótidos que precisa para el gen Ara h 2.

35 *Síntesis de péptido.* Los péptidos individuales fueron sintetizados en una membrana de celulosa derivatizada utilizando Fmoc amino ésteres de ácido activo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Genosys Biotechnologies, Woodlands, TX). Ácidos derivados de Fmocamino se disuelve en 1-metil-2 pirrolidona y carga en los puntos marcados en la membrana. Las reacciones de acoplamiento fueron seguidas por acetilación con una solución de 4% (v/v) de anhídrido acético en N, N-dimetilformamida (DMF). Después de acetilación, los grupos Fmoc fueron retirados por incubación de la membrana en un 20% (v/v) piperdina en DMF. La membrana se tiñe con azul de bromofenol para identificar la ubicación de los grupos amino libres. Los ciclos de acoplamiento, de bloqueo, y la desprotección se repite
40 hasta que la longitud de los péptidos es deseada para ser sintetizados. Después de la adición de los últimos aminoácidos en el péptido, las cadenas laterales de los aminoácidos fueron desprotegidas utilizando una solución que contiene una mezcla de 1/1/0.5 de diclorometano/ácido trifluoroacético/triisobutilsilano. Las membranas fueron investigadas inmediatamente o almacenadas a 20°C hasta que se necesiten.

45 *Ensayo de unión de la IgE.* Las membranas de celulosa que contienen péptidos sintetizados se lavaron con solución salina Tris-buffered (TBS) y se incubaron con solución de bloqueo durante la noche a temperatura ambiente. Después de bloqueo, las membranas fueron incubadas con suero de pacientes con hipersensibilidad de cacahuete diluida (1:5) en una solución de TBS y 1% de albúmina de suero bovino o durante al menos 12 horas a 4°C o 2 horas a temperatura ambiente. La detección del anticuerpo primario fue con anticuerpos antiIgE etiquetados ¹²⁵I (Sanofi, Chaska, MN).
50

Resultados

55 *Aislamiento y la determinación de la secuencia parcial de amino ácido de la proteína Ara h 2.* El extremo amino terminal de la proteína Ara h 2 purificada, o los péptidos resultantes de la digestión de tripsina de esta proteína, se utilizaron para la determinación de la secuencia de aminoácidos. Es posible determinar los primeros 17 residuos de péptido I y los primeros 13 residuos del péptido II del péptido más importante de cada fracción. La secuencia de aminoácidos que representa el extremo amino de la proteína Ara h 2 (péptido I) y un fragmento de péptido tríptico (péptido II) se observa en la Tabla 9. Estos resultados confirman y amplían el anterior análisis de la secuencia amino
60 ácido de la proteína Ara h 2.

65 *Identificación y caracterización de clones que codifican alérgeno de cacahuete Ara h 2.* El ARN aislado de las especies de cacahuete, *Arachis hypogaea* (Florunner) se utilizó para construir una biblioteca de expresión para detección con IgE de suero de pacientes con hipersensibilidad de cacahuete. Numerosos clones de unión de la IgE fueron aislados de esta biblioteca después del examen 106 clones con la IgE en suero de un grupo de pacientes con reactividad mayor a los alérgenos de cacahuete por transferencia Western. Dado que el número de placas que reaccionan con la IgE en suero era demasiado grande para estudiar en detalle nosotros seleccionamos al azar una pequeña parte de los clones positivos para su posterior análisis.

ES 2 344 034 T3

Para identificar cuál de los clones que codifican el alérgeno Ara h 2, una sonda de hibridación fue construida utilizando oligonucleótidos desarrollados a partir de la secuencia de aminoácidos Ara h 2 y la tecnología de PCR. La secuencia de oligonucleótidos CA (AG) CA (AG) TGGGA (AG) TT (AG) CA (AG), GG (N) GA (TC) AG derivada del extremo amino terminal del alérgeno Ara h 2 de cacahuete (péptido I). Utilizando este oligonucleótido, un clon ADNc 700 ~ bp fue identificado. La secuencia de ADN reveló que el clon seleccionado llevado a un inserto de base 741 el cual incluyó a una base 21 de poli A la cola y una base de 240 3' no daba la codificación de la región. Este inserto contiene un gran marco de lectura abierto a partir de un codón ACG y termina con un codón de parada TAA, en la posición de nucleótido 480 (fig. 6). El tamaño calculado de la proteína codificada por este marco de lectura abierta fue de ~ 17,5 kD, que está en buen acuerdo con el peso molecular de Ara h 2 que se ha determinado experimentalmente. La secuencia de aminoácidos que se determina a partir del extremo amino terminal y un péptido triptico de Ara h 2 purificado (Cuadro 9) se encuentran en este clon. La región de codificación adicional en el extremo amino terminal de este clon representa probablemente una señal de péptido que se escinde del alérgeno maduro Ara h 2.

Para determinar el tamaño de ARNm de este clon identificado, el inserto etiquetado ³²P- fue utilizado como una sonda de hibridación de una transferencia Northern con poly de cacahuete(A) + ARN. El prospecto de este híbrido a un -0.7-ARNm kb. Dado que el tamaño de la clonación de inserción y el tamaño de los ARNm se encontraban en buen acuerdo, acoplados ambos, tanto en el calculado y determinado tamaño de la proteína Ara h 2 y la identidad de la secuencia de aminoácidos determinada con la que se determina a partir de la clonación, llegamos a la conclusión de que un clon específico Ara h 2 clon había sido aislado.

El alérgeno de cacahuete Ara h 2 es una proteína similar a una semilla de almacenamiento, conglutina. Una búsqueda en la base de datos GenBank reveló una importante homología de secuencia amino ácido entre la proteína Ara h 2 y una clase de proteínas de almacenamiento de semillas llamadas conglutininas. Hubo ~ 32% de igualdad con la proteína Ara h 2 y una conglutina delta de la semilla de altramu. Estos resultados indican que el alérgeno Ara h 2 pertenece a una conglutina como la familia de proteínas de almacenamiento de semillas.

Múltiples epítomos vinculante IgE para el Ara h 2 de la proteína. La secuencia de proteínas el Ara h 2 fue analizada por potencial de epítomos antigénicos por algoritmos diseñados para determinar qué parte(s) de esta proteína podría ser responsable para la unión del anticuerpo. Había cuatro regiones antigénicas posibles para predecir en este análisis a lo largo de toda la longitud de la molécula (Fig. 7).

Diecinueve péptidos que representan la secuencia de aminoácidos derivados de la proteína Ara h 2 fue sintetizada para determinar si las regiones antigénicas predichas, o cualquier otras regiones, fueron reconocidas por la IgE en suero. Cada péptido fue de 15 aminoácidos de largo y se vio compensado por el péptido anterior por ocho aminoácidos. De esta manera, la largo de toda la proteína Ara h 2 podría ser estudiada en grandes fragmentos superpuestos. Estos péptidos fueron probados con una mezcla de sueros de 12 pacientes con hipersensibilidad de cacahuete documentados o suero de un paciente de control que no presenta hipersensibilidad de cacahuete. El suero de IgE del control del paciente, no reconoció a ninguno de los péptidos sintetizados (datos no mostrados). En cambio, en la figura 8 muestra que hay cinco regiones de unión de la IgE a lo largo de toda la longitud de la proteína Ara h 2 que son reconocidas por esta población de pacientes con hipersensibilidad de cacahuete. Estas regiones de unión de la IgE fueron residuos de aminoácido 17-38, 41-62, 57-78, 113-134 y 129-154.

A fin de determinar exactamente la secuencia de aminoácidos de los epítomos vinculantes IgE, pequeños péptidos (10 aminoácidos largos compensado por dos aminoácidos), que representa la mayor unión de regiones vinculantes IgE que fueron sintetizados. De esta manera fue posible identificar epítomos de unión de IgE individuales dentro de las mayores regiones de unión de IgE de la molécula de Ara h 2 (Fig. 9). Los diez epítomos IgE que fueron identificados de este modo se muestran en la Tabla 10. El tamaño de los epítomos osciló entre 6-10 aminoácidos de longitud. Tres epítomos (aa17-26, aa23-32, AA29-38), que en parte se superponen entre sí, fueron encontrados en la región de los residuos de aminoácidos 17-38. Dos epítomos (AA41-50, aa5160) fueron encontrados en región 41-62. Dos epítomos (AA59-68, aa67-76) también se encontraron en la región de 57-78. Por último, tres epítomos (aa117-126, aa129-138, aa145-154) se encontraron en regiones superpuestas representadas por los residuos de aminoácidos 113-134 y 129-154. El sesenta y tres por ciento de los aminoácidos representados en los epítomos fueron polares o apolares sin carga residuos. No hubo obvio motivo de la secuencia amino ácido que fue compartida por todos los epítomos, con la excepción de los epítomos 6 y 7, los cuales contenían la secuencia DPYSPS.

En un esfuerzo para determinar cual, si en su caso, de los diez epítomos fueron reconocidos por la mayoría de los pacientes con hipersensibilidad de cacahuete en cada serie de diez péptidos probados individualmente con el suero de IgE de 10 pacientes diferentes. Cinco los pacientes fueron seleccionados al azar entre el grupo de 12 pacientes para identificar los epítomos comunes y cinco pacientes fueron seleccionados de fuera de este grupo. Una inmunotransferencia que contiene estos péptidos fue incubada con el suero del paciente de una persona. El resto de los pacientes fueron evaluados en la misma forma y la intensidad de la unión de la IgE a cada punto se determinó en función de que la IgE total del paciente vinculante para estos diez epítomos (Fig. 10) Todos los sueros de los pacientes prueba (10/10) reconoce epítomos múltiples (Cuadro 11). El número promedio de los epítomos reconocidos era de 4-5/pacientes que van desde dos sueros que reconocen sólo 3 epítomos y un suero de paciente que reconoce hasta 7 epítomos. Curiosamente, epítomos de 3, 6, y 7 fueron reconocidos por todos los pacientes examinados (10/10). Ningún epítomo fue reconocido por más del 50% de los pacientes a prueba.

Discusión

Los cacahuets son unos de los alérgenos alimentarios más comunes en niños y adultos. Además, la hipersensibilidad de cacahuete es menos probable que se resuelva espontáneamente y es más probable que resulte en la anafilaxia fatal. Debido a la importancia de la reacción alérgica y el uso cada vez mayor de cacahuete como extensores de proteínas en los alimentos procesados, el riesgo para la sensibilidad de cacahuete individual es cada vez mayor.

Varios estudios en los últimos años han examinado la naturaleza y la localización de los alérgenos múltiples en cacahuets. Taylor *et al.* demostró que la parte alérgica de cacahuete estaba en la porción de proteína del cotiledón. Nuestro laboratorio recientemente identificó dos alérgenos principales de los extractos de cacahuete, designado Ara h 1 y Ara h 2. Más del 90% de nuestros pacientes que fueron positivo a la agresión de cacahuete, tenía un IgE específica a estas proteínas. El alérgeno Ara h 1 ha sido identificado como una proteína de almacenamiento de semillas con una homología significativa con la vicilinas, una familia de proteínas comúnmente encontrada en muchas plantas superiores. La secuencia de nucleótidos identificadas de Ara h 2 en este informe tiene una homología de secuencia significativa con otra clase de semillas de almacenamiento llamadas proteínas conglutinas. Es interesante observar que dos de los principales alérgenos de cacahuete identificados hasta el momento son las proteínas de almacenamiento de semillas que tienen una homología de secuencia significativa con las proteínas de otras plantas. Esto puede explicar la reacción cruzada con anticuerpos de otras leguminosas que se encuentran en el suero de pacientes que manifiestan síntomas clínicos a un solo miembro de la familia de las leguminosas.

En el presente estudio hemos determinado que hay varios sitios antigénicos predichos para el alérgeno Ara h 2. Como se ha encontrado otro alérgeno de cacahuete Ara h 1, y otros alérgenos en general, hubo un buen acuerdo entre los residuos previstos por ordenador y análisis de epítomos células B determinado por el análisis experimental de los péptidos superpuestos. Esta fuerte correlación entre los epítomos predichos y determinados se debe probablemente a la capacidad del modelo de computadora para predecir qué regiones de la molécula son accesibles a las interacciones de las inmunoglobulinas. De hecho, modelos 3 - D estructurales de la proteína Ara h 1 indican que la mayoría de los péptidos identificados por modelos de computadora y de análisis experimental como epítomos IgE se encuentran en la superficie de la molécula (observación no publicada).

Hay por lo menos 10 IgE sitios de reconocidos distribuidos en todo el alérgeno principal de cacahuete Ara h 2. La identificación de epítomos múltiples en un único alérgeno no es nueva, hay informes de que múltiples epítomos IgE vinculantes sobre los alérgenos de muchos alimentos causan reacciones de hipersensibilidad inmediata. La observación de que la mayoría de estas proteínas tienen múltiples sitios de unión de IgE, probablemente refleja el carácter policlonal de la respuesta inmune a ellos y puede ser un paso necesario en el establecimiento de una proteína como un alérgeno.

La evidencia reciente sugiere que existe una variable de uso preferente de la cadena pesada de la síntesis de IgE y un mecanismo directo de la producción de IgM a la síntesis de IgE. Esto sugeriría que epítomos responsables de la producción de antígeno-específico de IgE podrían ser diferentes de los que promueven el antígeno-específico anticuerpo IgG y que puede haber alguna estructura similar entre los péptidos para la obtención de la producción de anticuerpos IgE. Sin embargo, no había motivo de secuencia evidente que era compartida por la IgE de los 23 diferentes epítomos de unión del alérgeno Ara h 1 de cacahuete. En el presente estudio, dos epítomos comparten un péptido hexamérica (DPYSPS). Es importante señalar que estos péptidos son reconocidos por la IgE en suero de todos los pacientes a prueba hipersensibles al cacahuete en este estudio. Además, la IgE en suero que reconoce estos péptidos representa la mayoría de IgE específica Ara h 2 que se encuentra en estos pacientes. Si hay alguna similitud estructural entre los epítomos de unión de Ara h 2 IgE queda por determinar.

La elucidación de los principales epítomos IgE de unión de Ara h 2 nos permiten diseñar mejores opciones para la prevención de la anafilaxia como consecuencia de la hipersensibilidad de cacahuete. La única opción terapéutica disponible en la actualidad para la prevención de una reacción de hipersensibilidad a los alimentos es evitar los mismos. Lamentablemente, para un alimento que se encuentra en todas partes, como el cacahuete, la posibilidad de una ingestión inadvertida es grande. Una opción terapéutica que se emplea ampliamente para los pacientes con reacciones alérgicas a aeroalérgenos y venenos de diversas picaduras de insecto es la inmunoterapia alérgica de desensibilización. La inmunoterapia alérgica consiste en inyecciones de cantidades crecientes de alérgenos a los que un paciente tiene tipo I de hipersensibilidad inmediata. Mientras el mecanismo absoluto de inmunoterapia es desconocido, un aumento de la actividad de los anticuerpos IgG o IgG4, una disminución en los niveles del alérgeno-específico IgE, y una disminución en la actividad de los basófilos han sido implicados en la medida de la respuesta. Debido a que la inmunoterapia con alérgenos se ha demostrado eficaz para el tratamiento de algunas alergias, el tratamiento con inmunoterapia de cacahuete está siendo estudiado como una posible opción. Nuestro trabajo muestra los epítomos IgE de un importante alérgeno de cacahuete que puede permitir el uso de epítomos inmunodominantes en este enfoque.

Otro enfoque potencial inmunoterapéutico que recientemente ha atraído mucho la atención es el uso de vacunas de ADN. En este enfoque se coloca una región promotora 5' del ADNc que codifica el alérgeno y luego se introduce en un animal a través de inyección intramuscular o aplicación intradérmica. Los primeros trabajos con un alérgeno del ácaro del polvo, Der p 1, indica que este enfoque puede tanto prevenir el desarrollo de una respuesta inmune a una proteína específica y amortiguar el respuesta a una proteína la cual el animal ya ha sido sensibilizados. Actualmente estamos explorando esta posibilidad con el alérgeno Ara h 2.

Leyendas de las figuras

Figura 6. *Secuencia de nucleótidos de un Clon de ADNc de ARA h II*. La secuencia de nucleótidos se muestra en la primera línea. La segunda línea es la secuencia derivada de aminoácidos. Residuos de ácido amino en negrita son las áreas que corresponden al determinar la secuencia de aminoácidos del péptido I y II de Ara h II (cuadro 9). Los números de la derecha de la figura indican la secuencia de nucleótidos. *Un Clon ARA h II híbrida con un 700 b al ARNm de cacahuete*. El ARN del cacahuete poli A + fue aislado por especies de *Arachis hypogaea* (Florunner) y 10 ug fue electroforesizado en formaldehído desnaturalizando geles de agarosa. El inserto de un clon ARA h II fue purificado, etiquetado con alfa-³²P-dCTP, y utilizado como sonda de hibridación de transferencia Northern para el análisis de este gel. Los tamaños de las especies conocidas de ARN se expresan en kilobases por el lado derecho de la figura.

Figura 7. *Múltiples Sitios Antigenicos Predichos presentes en el Alérgeno Ara h 2*. La secuencia de aminoácidos de la proteína Ara h 2 fue analizada para posibles epítopes antigénicos por el algoritmo de Jameson y Wolf (1988). Estas predicciones se basan en un modelo que relaciona a la antigenicidad con hidrofiliicidad, la estructura secundaria, la flexibilidad, y la probabilidad de superficie. Hubo 4 regiones predichas (1-4) que contenía varios sitios antigénicos (octógonos) a lo largo de toda la longitud de la molécula. Los residuos de aminoácidos (pequeñas cantidades) son representados como alfa-helicoidal (sinusoidal de la curva), beta-hoja (ver la curva de los dientes), y la bobina (curva sinusoidal plana) conformaciones. Beta se convierte identificada por la cadena de inversiones.

Figura 8. *Múltiples sitios IgE identificados en el alérgeno Ara h 2*. El análisis de epitopo se realizó en el alérgeno Ara h 2 mediante la síntesis de péptidos de 15 aminoácidos de ácido largo, que se compensan entre sí por 8 aminoácidos para la molécula de proteína completa. Estos péptidos, representados como puntos 119, fueron investigados con una mezcla de suero compuesta de 15 pacientes con hipersensibilidad de cacahuete documentada.

Figura 9. *Núcleos de epítomos IgE identificados en el alérgeno Ara h 2*. El análisis de epítomos se realizó en los sitios de unión de la IgE identificado en la figura 8 por la síntesis de 10 aminoácidos de largos péptidos compensado por dos aminoácidos. Estos péptidos fueron probados con el grupo de suero de 18 pacientes. La figura 9A es el análisis de péptidos de Ara h II amino residuos de ácido 49-70. Figura 9B identifica la secuencia de aminoácidos de esta región.

Figura 10.

De los 10 pacientes, cinco fueron seleccionados al azar del grupo de suero de 18 pacientes y cinco pacientes con hipersensibilidad al cacahuete no fueron incluidos en el grupo. El paciente K representa un control no-sensible de cacahuete (negativo).

Caracterización de un Alérgeno Principal de Cacahuete: Análisis Mutacional del Ara h 1 vinculante a los epítomos IgE

Reacciones de hipersensibilidad inmediata a los alimentos se producen en aproximadamente 6-8% de los niños pequeños y el 1% de los adultos. Estas reacciones están medidas por la producción de anticuerpos IgE frente a glucoproteínas que se encuentran en los alimentos. Los cacahuetes son una causa importante de graves reacciones alérgicas en adultos y niños. Ara h 1, un alérgeno de cacahuete importante, ha sido ampliamente caracterizado y se ha demostrado que contienen 23 epítomos lineales unión de la IgE. Nos propusimos determinar los aminoácidos esenciales para su vinculación y para determinar la localización de estos epítomos en 3-D estructura tridimensional de la molécula de Ara h 1. Para lograr esto, el análisis mutacional de cada epítopo se realizó mediante la síntesis de péptidos de 10 aminoácidos de largo con aminoácidos individuales cambiado en cada posición de la alanina, seguido por la determinación de la capacidad de unión de IgE de cada epítopo mutado en relación con la cepa de referencia. Se determinó que los cambios en los aminoácidos situados en las posiciones, 4, 5 y 6 del epítopo tienen una mayor influencia en los residuos situados en cada extremo. Además, la sustitución del más apolar, residuos cargados, resultaron en la pérdida de la IgE. Más importante aún, 21/23 epítomos podría ser mutado a un IgE de unión no vinculante por un solo aminoácido de sustitución. El 3-D Modelo tridimensional de la proteína Ara h 1 indica que la mayoría de los epítomos de unión de la IgE se encuentran en la superficie de la molécula. Actualmente, estamos determinando el efecto de las sustituciones de aminoácidos que conducen a la pérdida de la IgE vinculante que tendrá en la estructura terciaria de la proteína.

ES 2 344 034 T3

TABLA 9

Secuencia de aminoácido de los péptidos Ara h II

5	Peptido		Secuencia de Aminoácido
		I	X-Q-Q-W-E-L-Q-G-D-R-R-R-Q-S-Q-L-E- R
10		II	A-N-L-R-P-C-E-O-H-L-M-Q-K
15	La secuencia del aminoácido del aminoácido terminal (I) y un péptido triptico derivado (II) de la proteína Ara h 2 fue determinado. La secuencia es mostrada como una letra en el código del aminoácido.		

TABLA 10

Epítomos Ige de unión de Ara h 2

Péptido AA Secuencia Posición Ara h 2

25	1	HASARQQWEL	17-26
	2	QWELQGDRRC	23-32
	3	DRRCQSQLER	29-38
	4	LRPCEQHLMQ	41-50
30	5	KIQRDEDSYE	51-60
	6	YERDPYSPSQ	59-68
	7	SQDPYSPSPY	67-76
	8	DRLQGRQQEQ	117-126
35	9	KRELRNLPQQ	129-138
	10	QRCDLDVESG	145-154

TABLA 11

IgE de unión a Epítomos Ara h 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Epítomos/Pt
45	A		X			X	X	X			4
	B	X		X	X	X	X				5
	C	X		X	X	X	X				5
	D			X		X	X	X			4
50	E		X			X	X				4
	F	X		X	X	X	X	X		X	7
	G			X		X	X				3
55	H			X	X	X	X	X			6
	I			X		X	X				3
	<u>J</u>	<u>X</u>		<u>X</u>		<u>X</u>	<u>X</u>		<u>X</u>		<u>5</u>
60	Pcts/Epitopo	4	1	10	4	1	10	10	4	1	1

Los pacientes están indicados por letras (A-J) a la izquierda de la tabla. Los péptidos Ara h 2 están indicados por un número (1-10) a través de la parte superior de la tabla. El número de epítomos reconocidos por cada paciente (epítomos/paciente) es mostrado a la derecha de la tabla. El número de pacientes que reconocieron cada epítopo se muestra a través de la parte inferior de la tabla. Una X indica que el péptido se une a IgE.

La clonación, la cartografía de epitopo, y el análisis mutacional de Ara h 2, un principal alérgeno de cacahuete

Un alérgeno importante de cacahuete, Ara h 2, es reconocido por la IgE sérica del 90% de los pacientes con hipersensibilidad de cacahuete. La caracterización bioquímica de este alérgeno indica que es una glicoproteína de - 17,5 kDa. Usando una secuencia de datos de aminoácido N-terminal de Ara h 2 purificado, los oligonucleótidos fueron sintetizados y utilizados para identificar un clon (700 pb) de una biblioteca de ADNc de cacahuete. Este clon fue capaz de codificar una proteína de 17,5 kDa con homología a la familia de conglutina de proteínas de almacenamiento de semillas. Los principales epítomos lineales IgE de unión de este alérgeno fueron mapeados usando la superposición de péptidos sintetizados en una membrana de celulosa activada y la IgE en suero combinado a partir del 15 pacientes sensibles al cacahuete. Diez Epítomos de unión de la IgE fueron identificados, distribuidos en toda la longitud de la proteína Ara h 2. El tamaño de los epítomos osciló 610 aminoácidos de longitud. El sesenta y tres por ciento de los aminoácidos representados en los epítomos fueron residuos sin carga polar o apolares. En un esfuerzo para determinar que, en su caso, de los diez epítomos fueron reconocidos por la mayoría de los pacientes con hipersensibilidad de cacahuete, cada conjunto de diez péptidos fue probado individualmente con la IgE en suero de 10 pacientes diferentes. Todos los sueros de los pacientes a prueba reconocieron epítomos múltiples. Tres epítomos (AA29-38, AA59-68, y 67-76) fueron reconocidos por todos los pacientes de prueba. El análisis mutacional de estos epítomos inmunodominantes indica que solo el aminoácido o simple cambia el resultado en la pérdida de la unión de la IgE. Ambos epítomos contenidos en la región AA59-76 contiene la secuencia de aminoácido DPYSPS aparece ser necesario para IgE. Estos resultados pueden permitir el diseño de la mejora de enfoques de diagnósticos y terapéuticos a la hipersensibilidad de cacahuete.

Ara h 3, un alérgeno de cacahuete identificado mediante el uso del suero del paciente sensible al cacahuete adsorbido con proteínas de soja

Los cacahuetes y la soja son miembros de la familia de las leguminosas y comparten varias fracciones comunes antigénicas. Los pacientes alérgicos a uno de estos alimentos tienen anticuerpos IgE en suero los cuales inmunológicamente tienen una reacción cruzada con otras leguminosas. Sin embargo, la ingestión de otras leguminosas en general, no provoca una reacción alérgica, lo que sugiere que la reacción cruzada de los anticuerpos hacia la soja fue eliminada del suero de los pacientes clínicamente alérgicos a los cacahuetes. Los sueros adsorbidos se utilizaron para identificar la específica IgE de unión del inmunoblot de cacahuete. Varias proteínas de cacahuete que varían en tamaño de 5 kDa a 49 kDa, fueron identificadas. Una proteína identificada - 14 kDa de este modo se purifica y se preparó para el análisis secuencial del aminoácido. La secuencia terminal del aminoácido determinó los 23 primeros aminoácidos de esta proteína. Una búsqueda en la base de datos de proteínas Genbank con este péptido reveló que había 61% de identidad con un gen de soja para la subunidad G3 glicina. Un oligonucleótido degenerado principal fue realizado a partir de estos datos para su uso en relación con el vector de cebadores para amplificar los clones que codifican esta proteína de una biblioteca de la DNA de cacahuete. La secuenciación del ADN de estos clones también reveló - 70% de homología con el gen de soja para la subunidad de glicina G3. Estos datos indican que mientras que hay una homología significativa entre las glicinas de cacahuete y la soja debe haber epítomos específicos de cacahuete responsables de la unión de la soja adsorbida de IgE en suero. La caracterización de este alérgeno incluirá la determinación de los epítomos de unión IgE y las pruebas de la relevancia clínica de esta proteína en la hipersensibilidad de cacahuete. Si esta estrategia tiene éxito, no sólo identificará las proteínas que une IgE, sino también a los alérgenos y epítomos importante en el proceso de la enfermedad.

Cartografía de los epítomos de célula B en Ara h I y Ara h II de proteínas de almacenamiento de leguminosas y principales alérgenos implicados en la hipersensibilidad de cacahuete

Aproximadamente el 8% de los niños y 1-2% de los adultos sufren de algún tipo de alergia alimentaria. Las reacciones a los cacahuetes son más propensas que otras alergias a alimentos para dar lugar a la anafilaxia fatal o casi fatal en pacientes sensibilizados. El Ara h I (Mm = 63,5 kD) y Ara h II (Mm = 17 kD) son proteínas de cacahuete reconocidas por la IgE sérica del 90% de los pacientes sensibles al cacahuete, estableciéndose así como los alérgenos clínicamente importantes. La superposición de péptidos que representan la totalidad de las moléculas de Ara h I y Ara h II fueron construidas y desarrolladas por el análisis de inmunoblot IgE para determinar qué partes de estos alérgenos son responsables de unión de la IgE. Utilizando un grupo (n = 15) de los pacientes con hipersensibilidad de cacahuete, 23 epítomos de unión de la IgE fueron identificados en Ara h I y 6 epítomos fueron identificados en Ara h II. Incluso hubo múltiples epítomos identificados en cada alérgeno, dos epítomos en Ara h I y un epítomo en Ara h II fueron reconocidos por el 90% de cada uno de sueros de los pacientes analizados (n = 10). Los aminoácidos importantes para la unión de la IgE en estos epítomos inmunodominantes se determinaron por el análisis mutacional. La identificación de los principales epítomos vinculados Ara h I y Ara h II pueden conducir a la mejora del diagnóstico de hipersensibilidad de cacahuete y eventualmente a un mejor régimen terapéutico para esta enfermedad. APOYADO EN PARTE POR EL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD, CLARISSA SOSIN ALERGIA RESEARCH FOUNDATION, Y AUTORIDAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ARKANSAS.

Introducción

Aproximadamente un 1-2% de la población de EE.UU. sufre de algunas de las alergias alimentarias. El cacahuete, pescado, frutos secos, y marisco son los principales de la mayoría de las reacciones de hipersensibilidad alimentaria en adultos, mientras que el cacahuete, leche, huevos, causa de más del 80% de las reacciones de hipersensibilidad

a los alimentos en los niños. A diferencia de las reacciones de hipersensibilidad a los alimentos de la leche y los huevos, las reacciones de hipersensibilidad de cacahuete suelen persistir en la edad adulta y para toda la vida. Además, las reacciones de hipersensibilidad de cacahuete tienden a ser más severas que las de los alérgenos alimentarios, a veces con resultado de muerte. Varios informes han detallado de las fatales y próximas reacciones anafilácticas que ocurren en adolescentes y adultos. En la actualidad, la no ingesta es el único medio eficaz de hacer frente a la alergia alimentaria, pero el uso de cacahuets y productos secundarios como suplementos en muchos alimentos diferentes hace que el consumo accidental sea casi inevitable.

Dos alérgenos principales implicados en la hipersensibilidad de cacahuete son las proteínas de cacahuete, Ara h I y Ara h II. Estas proteínas son reconocidas por el 90% de los pacientes positivos de cacahuete, estableciendo así como los alérgenos clínicamente importantes. Ambas proteínas son las proteínas de almacenamiento de semillas. El Ara h I comparte homología de secuencia significativa con las proteínas de vicilina de otras plantas mientras que Ara h II es una conglutina como la proteína.

Las reacciones de hipersensibilidad alimentaria se presentan poco después del contacto de un alérgeno específico con su correspondiente anticuerpo IgE que está vinculado a las células mastocíticas. La IgE, cuando forma complejos con el antígeno, se activan las células mastocíticas a la liberación de histamina, de heparina y otras sustancias que son responsables de los síntomas clínicos observados. Así pues, los epítomos IgE vinculantes a los alérgenos, juegan un papel importante en el proceso de la enfermedad y su elucidación conducirá a una mejor comprensión de la respuesta inmune humana involucrada en las reacciones de hipersensibilidad a los alimentos y la mejora de diagnósticos y terapéuticos capacidades.

Figuras 1 y 7. *Múltiples Sitios Antigénicos Predichos en los Alérgenos Ara h I y Ara h II*

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas Ara h I y Ara h II fueron analizadas para determinar posibles epítomos antigénicos. Estas predicciones se basan en un modelo que relaciona la antigenicidad con hidrofiliidad, estructura secundaria, flexibilidad y de probabilidad de superficie. Hubo 11 (1-11) regiones predichas que contenían múltiples sitios antigénicos (octógonos) a lo largo de la longitud total de la proteína Ara h I y 4 (1-4) regiones predichas de la proteína Ara h II. Los residuos de aminoácidos (pequeños números) son representados como alfa-helicoidal (curva sinusoidal), hoja de Beta (ver los dientes de sierra), y serpentín (curva plana sinusoidal). Se hacen notar espiras Beta por inversiones de la cadena.

Las figuras 2A, 2B y 8. *Múltiples Regiones Vinculantes IgE Identificadas en los Alérgenos Ara h I y Ara h II*

Paneles superiores: la cartografía de epítomo se realizó en los alérgenos Ara h I y Ara h II mediante la síntesis de cada uno de estas proteínas en 15 aminoácidos superponiendo péptidos que siempre que se compensaron entre sí por 8 aminoácidos. Estos péptidos fueron probados con un grupo de IgE en suero de 15 pacientes con hipersensibilidad de cacahuete documentada. La posición de los péptidos en las proteínas Ara h I y Ara h II se indican en la parte izquierda de cada panel.

Paneles inferiores: Las secuencias de aminoácidos de las proteínas Ara h I y Ara h II se muestran en la parte inferior de los paneles. Las cajas numeradas corresponden a las regiones antigénicas predichas (P1-P11, P1-P4). Las cajas de incubación (D1-D12, D1-4) corresponden a las regiones de unión de la IgE que se muestra en los paneles superiores.

Las figuras 3 y 9. *Núcleos de epítomos IgE Vinculantes Identificados en los Alérgenos Ara h I y Ara h II*

La cartografía detallada del epítomo se realizó en las regiones de unión de IgE identificadas en la figura 2 y 8 mediante la síntesis de 10 aminoácidos largo péptidos que se compensan entre sí por dos aminoácidos. Estos péptidos fueron probados con un grupo de IgE en suero de 15 pacientes con hipersensibilidad de cacahuete documentada. Los datos mostrados representan las regiones D2 y una parte de D3 de Ara h I y D2 región de Ara h II. Los números corresponden a péptidos, como se muestra en el cuadro 12. Las secuencias de aminoácidos de Ara h I y Ara h II, que fueron probados en los paneles superiores son mostradas. Las áreas sombreadas de las cajas corresponden a péptidos de unión de IgE.

Figuras 4 y 10

Epítomos Comúnmente Reconocidos Ara h I

Los núcleos de epítomos IgE vinculantes fueron sintetizados (10 aminoácidos) y luego se investigaron individualmente con suero de IgE de 10 pacientes con hipersensibilidad de cacahuete documentada. Los paneles superiores representan donde cada uno de los péptidos Ara h I (1-23) y Ara h II (1-6) se colocaron en la membrana. Los paneles A-J muestran los péptidos de la envoltura de IgE en suero de cada paciente. Los paneles de control fueron probados con el suero de un paciente con IgE elevada, pero que no tiene hipersensibilidad al cacahuete.

Figuras 5 y 11

Aminoácidos que Participan en la Unión de IgE

5 Los epítomos 4 y 17 de Ara h I y epítomo 3 de Ara h II fueron sintetizados con una glicina (G) o de alanina (A) de residuo sustituido por uno de los aminoácidos en cada uno de estos péptidos y luego probó con un grupo de IgE en suero de 15 pacientes con hipersensibilidad de cacahuete documentado. Las cartas en la parte superior de cada panel indica la carta de Código de aminoácidos para los residuos normalmente en esa posición y el aminoácido que fue sustituido por ello. Los números indican la posición de cada residuo en las proteínas Ara h I y Ara h II.

10

Resumen

15 Los principales alérgenos de cacahuete Ara h I y Ara h II se han clonado, secuenciado, e identificado como las proteínas de semillas de almacenamiento.

Los epítomos de células-B de Ara h I y 6 epítomos de células-B de Ara h II fueron mapeados utilizando péptidos sintéticos probados con el suero de IgE en de una población con pacientes hipersensibles al cacahuete.

20 El epítomo # 4 (AA89-98) y # 17 (AA498-507) de Ara h I y epítomo # 3 (AA59-66) de Ara h II fueron reconocidos en un 90% de pacientes a prueba hipersensibles al cacahuete.

25 Los aminoácidos importantes para unión de la IgE de los epítomos inmunodominante de Ara h I y II de Ara h fueron determinados.

La figura 12 es la misma que la figura 16 con péptidos I, II, III, correspondientes a los péptidos en el cuadro 14 que se pusieron de relieve por cajas rectangulares.

30 Cuadro 16 es una secuencia parcial de Ara h I (clon 5A1a).

Cuadro 17 es una secuencia de Ara h I Alpha (clon p17).

Cuadro 18 es la secuencia h ARA II (clon Ara h II p38).

35 Cuadro 19 es la secuencia Ara h I Beta (p41b clon).

Cuadro 20 es la traducción de ARA h II p38 a Ara h II p38.

40 De conformidad con la presente invención, se contempla que el descubrimiento o la identificación de determinados péptidos o epítomos los cuales unen IgE y causan una respuesta de IgE por una persona con una alergia o sensibilidad a la que una determinada proteína puede ser utilizada para producir una vacuna de ADN para la terapia de inmunización con la esperanza de reducir la respuesta de IgE y con ello eliminar o reducir los efectos negativos de la alergia o sensibilidad. Por ejemplo, una proteína, el péptido, o epítomo puede ser producido y se inyecta en un paciente como una vacuna de ADN que se espera que tenga un efecto de modulación inmunológica de respuesta de IgE y estimular una respuesta diferente, como IgG, IgM, IgA, etc y, por tanto regular a la baja la síntesis de IgE contra el alérgeno específico.

45 Asimismo, de conformidad con la presente invención, los péptidos similares, epítomos y proteínas IgE de unión de otros legumbres, hierbas, semillas oleaginosas y similares, por ejemplo, la soja o el trigo, pueden ser aisladas e identificadas, mutadas de modo que no únan la IgE, y utilizado en una vacuna de ADN mutado para la terapia de inmunización.

55

60

65

ES 2 344 034 T3

TABLA 12

Epitopos vinculantes IgE Ara h I

<u>Péptido</u>	<u>AA Secuencia</u>	<u>Posición Ara h I</u>
1	<u>AKSSPYQKKT</u>	25-34
2	<u>QEPDDLKQKA</u>	48-57
3	<u>LEYDPRLVYD</u>	65-74
4	<u>GERTRGRQPG</u>	89-98
5	<u>PGDYDDDRRQ</u>	97-105
6	<u>PRREEGGRWG</u>	107-116
7	<u>REREEDWRQP</u>	123-132
8	<u>EDWRRPSHQQ</u>	134-143
9	<u>QPRKIRPEGR</u>	143-152
10	<u>TPGQFEDFFP</u>	294-303
11	<u>SYLQEF SRNT</u>	311-320
12	<u>FNAEFNEIRR</u>	325-334
13	<u>EQEERGQRRW</u>	344-353
14	<u>DITNPINLRE</u>	393-402
15	<u>NNFGKLF EVK</u>	409-418
16	<u>GTGNLELVAV</u>	461-470
17	<u>RRYTARLKEG</u>	498-507
18	<u>ELHLLGFGIN</u>	525-534
19	<u>HRIFLAGDKD</u>	539-548
20	<u>IDQIEKQAKD</u>	551-560
21	<u>KDLAFPGSGE</u>	559-568
22	<u>KESHFVSARP</u>	578-587
23	<u>PEKESPEKED</u>	597-606

Epitopos vinculantes IgE Ara h II

<u>Péptido</u>	<u>AA Secuencia</u>	<u>Posición Ara h II</u>
1	<u>LLAAHASARQ</u>	14-23
2	<u>QGDRRCQSQL</u>	27-36
3	<u>YERDPYSPSQ</u>	60-69
4	<u>AGSSQHQERC</u>	81-90
5	<u>CNELNEFENN</u>	91-100
6	<u>QRCDLDVESG</u>	105-159

* Las partes subrayadas de cada péptido son las secuencias más pequeñas de IgE de unión que se determinaron por el análisis descrito en la figura 9.

TABLA 13

Epitopos Ara h I

IgE vinculantes al núcleo de epitopos Ara h I mediante el suero de pacientes hipersensibles al cacahuete

Pacientes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	Epitopos/ pacientes
A				X	X									X			X	X		X				6
B	X	X		X	X										X		X							6
C	X	X	X	X	X	X			X			X	X		X		X					X		12
D	X			X	X								X		X		X							6
E			X	X				X	X	X	X	X					X			X	X	X		11
F		X		X						X							X							4
G	X	X	X										X			X	X							6
H		X		X													X							3
I				X				X	X								X	X	X	X		X		8
J				X				X	X		X						X			X		X		7
Pacientes/ Epitopo	4	5	4	9	4	1	0	3	4	2	1	3	3	1	3	1	10	2	1	4	1	3	1	

Epitopos Ara h II

IgE vinculantes al núcleo de epitopos Ara h II mediante el suero de pacientes hipersensibles al cacahuete

Pacientes	1	2	3	4	5	6	Epitopos/ pacientes
A			X				1
B			X		X		2
C			X			X	2
D			X			X	2
E			X	X	X		3
F			X				1
G			X				1
H			X	X	X		3
I			X			X	2
J			X		X	X	3
Pacientes/ Epitopo	0	0	10	2	4	4	

Los pacientes están indicados por letras (A-J) a la izquierda de la tabla. Los péptidos Ara h 2 están indicados por un número (1-10) a través de la parte superior de la tabla. El número de epítomos reconocidos por cada paciente (epítomos/paciente) es mostrado a la derecha de la tabla. El número de pacientes que reconocieron cada epítomo se muestra a través de la parte inferior de la tabla. Una X indica que el péptido se une a IgE.

TABLA 14

IDENTIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE AMINO ACIDO NATIVO EN LA SECUENCIA DEL AMINO ACIDO DEDUCIDO DEL CLON ARA H 2 P38

LA SIGUIENTE SECUENCIA DEL AMINO ACIDO FUE TRADUCIDO DEL ARA H GEN P39 (SECUENCIA NUCLEOTIDA) AISLADO DE NUESTRA LIBRERIA DE ADNc

TRADUCCIÓN DEL GEN: arah2p38

1 L TILVALALF LLAHASARQ QNELOGDRRC OSQLEKANLR PCEQHLMOKI peptido 45
 51 QRDEDSYERD PYSPSQDPYS PSPYDRGAG SSQHQRCCN ELNEFENNQR
 101 CMCEALQOIM ENQSDRLQGR QDEQDFKREL RNLFPQCCGLR APQRCDLDVE
 151 SGGRDRY

TABLA 15

La siguiente información fue obtenida por medidas fisico-químicas y usadas para confirmar la secuencia de aminoácido deducida del clon Ara h 2 p38

SECUENCIA N-TERMINAL 17.5 kd: secuencia gen 19-48

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
GLY	GLN	GLN	TRP	GLU	LEU	GLN	GLY	ASP	ARG	ARG	ARG	GLN
	Q	Q	W	E	L	Q	G	D	R	R	R	Q
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
SER	GLN	LEU	GLU	ARG	ALA	ASN	LEU	X	PRO	X	GLU	
S	Q	L	E	R	A	N	L	R	P	C	E	
26	27	28	29	30								
GLN	X	LEU	MET	X								
Q	H	K	M									

PEPTIDO 20: identificado en secuencia de gen 121-128

1	2	3	4	5	6	7	8
GLN	GLN	GLU	GLN	GLN	PHE	LYS	ARG
Q	Q	E	Q	Q	F	K	R

PEPTIDO 37: identificado en secuencia de gen 60-76

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ASP	PRO	TYR	SER	PRO	SER	GLN	ASP	PRO	TYR	SER	PRO	SER
D	P	Y	S	P	S	Q	D	P	Y	S	P	S
14	15	16	17									
PRO	TYR	ASP	ARG									
P	Y	D	R									

PEPTIDO 45: identificado en secuencia de gen 37-49

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ALA	ASN	LEU	ARG	PRO	CMC	GLU	GLN	HIS	LEU	MET	GLN	LYS
A	N	L	R	P	C	E	Q	H	L	M	Q	K

ES 2 344 034 T3

TABLA 16

5 LOCUS ARQARAHI 1340 bp ss-mRNA PLN
 DEFINITION Arachis hypogea (clone 5 Ala) Ara h I mRNA, complete cds.
 ACCESSION L34402
 KEYWORDS
 SOURCE Arachis hypogea (strain Florunner) seed cDNA to mRNA.
 ORGANISM Arachis hypogea
 10 Eukaryota; Plantae; Embryobionta; magnoliophyta; Magnoliopsida;
 Rosidae; Fabales; Fabaceae.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1340)
 AUTHORS Burks, A.W., Cockrell, G., Stanley, J.S., Helm, R.M. and Bannon, G.A.
 TITLE Recombinant peanut allergen Ara h I expression and IgE binding
 15 in patients with peanut hypersensitivity
 JOURNAL Unpublished (1994)
 STANDARD full automatic
 COMMENT NCBI gi: 508640
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1. .1340
 /organism="Arachis hypogea"
 /strain="Florunner"
 /dev_stage="seed"
 /sequenced_mol="cDNA to mRNA"
 20 CDS 231..1238
 /gene="Ara h I"
 /note="NCBI gi: 508641"
 /codon_start=1
 25 /translation="MPVNTPGQFEDFFPASSRDQSSYLQFSSRNTLEAAFNAEFNEIR
 RVLLEENAGGEQEEERGQRRWSTRSSENNEGVIVKVSKEHVEELTKHAKSVSKKGSEEE
 GDITNPINLREGEPLDLSNFFGKLFVVKPKKPNQLQDLDMMLTCVEIKEGALMLPHFN
 SKAMVIVVVKGTGNLELVAVRKEQQQRGRREEEDEDEEEEGSNREVRRTARLKEG
 DVFIMPAAHPVAINASSELHLLGFGINAENNHRIFLAGDKDNVIDQIEKQAKDLAFPG
 SGEQVEKLIKQKESHFVSAQSQSQSPSSPEKESPEKEDQEENQGGKGPLLSILKAF
 30 N"
 BASE COUNT 422 a 296 c 340 g 282 t
 ORIGIN
 Arqarahi Length: 1340 05:04 Type: N Check: 8329 ..
 40 1 GTATTGTGCA GATCGAGGCC AAACCTAACA CTCTTGTTCT TCCCAAGCAC
 51 GCTGATGCTG ATAACATCCT TGTTATCCAG CAAGGGCAAG CCACCGTGAC
 101 CGTAGCAAAT GGCAATAACA GAAAGAGCTT TAATCTTGAC GAGGGCCATG
 45 151 CACTCAGAAT CCCATCCGGT TTCATTTCTT ACATCTTGAA CCGCCATGAC
 201 AACCAGAACC TCAGAGTAGC TAAATCTCC ATGCCCGTTA ACACACCCGG
 251 CCAGTTTGAG GATTCTTCTC CGGCGAGCAG CCGAGACCAA TCATCCTACT
 301 TGCAGGGCTT CAGCAGGAAT ACGTTGGAGG CCGCCTTCAA TGCGGAATTC
 50 351 AATGAGATAC GGAGGGTGCT GTTAGAAGAG AATGCAGGAG GTGAGCAAGA
 401 GGAGAGAGGG CAGAGGCGAT GGAGTACTCG GAGTAGTGAG AACAAATGAAG
 451 GAGTCATAGT CAAAGTGTC AAGGAGCACG TTGAAGAACT TACTAAGCAC
 55 501 GCTAAATCCG TCTCAAAGAA AGGCTCCGAA GAAGAGGGAG ATATCACCAA
 551 CCAATCAAC TTGAGAGAAG GCGAGCCCGA TCTTTCTAAC AACTTTGGGA
 601 AGTTATTTGA GGTGAAGCCA GACAAGAAGA ACCCCCAGCT TCAGGACCTG
 651 GACATGATGC TCACCTGTGT AGAGATCAA GAAGGAGCTT TGATGCTCCC
 701 ACACTTCAAC TCAAAGGCCA TGGTTATCGT CGTCGTCAAC AAGGAACTG
 751 GAAACCTTGA ACTCGTGGCT GTAAGAAAAG AGCAACAACA GAGGGGACGG
 801 CGGGAGAAG AGGAGGACGA AGACGAAGAA GAGGAGGGAA GTAACAGAGA
 851 GGTGCGTAGG TACACAGCGA GGTGAAGGA AGGCGATGTG TTCATCATGC
 65 901 CAGCAGCTCA TCCAGTAGCC ATCAACGCTT CCTCCGA ACT CCATCTGCTT

ES 2 344 034 T3

951 GGCTTCGGTA TCAACGCTGA AAACAACCAC AGAATCTTCC TTGCAGGTGA
1001 TAAGGACAAAT GTGATAGACC AGATAGAGAA GCAAGCGAAG GATTTAGCAT
5 1051 TCCCTGGGTC GGGTGAACAA GTTGAGAAGC TCATCAAAA CCAGAAGGAA
1101 TCTCACTTTG TGAGTGCTCA ATCTCAATCT CAATCTCCGT CGTCTCCTGA
1151 GAAAGAGTCT CCTGAGAAAG AGGATCAAGA GGAGGAAAAC CAAGGAGGGA
1201 AGGGTCCACT CCTTTCAATT TTGAAGGCTT TTAAC TGAGA ATGGAGGCAA
10 1251 CTTGTTATGT ATCGATAATA AGATCAGCT TTTGTA CTCT ACTATCCAAA
1301 AACTTATCAA TAAATAAAAA CGTTTGTGCG TTGTTTCTCC

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

TABLA 17

5 LOCUS ARQARAH 1949 bp mRNA PLN
 DEFINITION Arachis hypogea (clone P17) Ara h I mRNA, complete cds.
 ACCESSION L38853
 NID q620024
 KEYWORDS peanut hypersensitivity.
 SOURCE Arachis hypogea (strain Florunner) seed cDNA to mRNA.
 10 ORGANISM Arachis hypogea
 Eukaryota; Plantae; Embryobionta; magnoliophyta; Magnoliopsida;
 Rosidae; Fabales; Fabaceae.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1949)
 15 AUTHORS Burks, A.W., Cockrell, G., Stanley, J.S., Helm, R.M. and Bannon, G.A.
 TITLE Recombinant peanut allergen Ara h I expression and IgE binding
 in patients with peanut hypersensitivity
 JOURNAL Unpublished (1994)
 COMMENT NCBI gi: 620024
 FEATURES Location/Qualifiers
 20 source 1. .1949
 /organism="Arachis hypogea"
 /strain="Florunner"
 /dev_stage="Seed"
 /sequenced_mol="cDNA to mRNA"
 5'UTR 1. .2
 25 CDS 3. .1847
 /gene="Ara h I"
 /note="NCBI gi: 620025"
 /codon_start=1
 /db_xref="PID:g620025"
 30 /translation="MRGRVSPMLLLGILVLASVSATQAKSPYRK TENPCAQRCLQSC
 QQEPDDLKQKACESRCKLEYDPRCVYDTGATNQRHPPGERTRGRQPGDYDDRRRQPR
 REEGRWGPAEPREREREEDWRQPREDWRRP SHQOPRKIRPEGREGEQEWGTPGSEVR
 35 EETSRNPPFFPSRRFSTRYGNQNGRIRVLQRFDRSKQFQNLQNHRI VQIEARPNTL
 VLPKHADADNILVIQQGQATVTVANGNNRKS FNLDEGHALRIPSGFISYILNRHDNQ
 LRVAKISMPVNTPGQFEDFFPASSRDQSSYLOGFSRNTLEAAFNAEFNEIRRVLLEEN
 40 AGGEQEERGQRRRSTRSSDNEGVI VKVSKHVQELTKHAKSVSKKGSEEDITNPINL
 RDGEPDLSNMFGRLEFVKPKKNPQLQDLDMLT CVEIKEGALMLPHFNSKAMVIVVV
 NKG TGNLELVAVRKEQQQRGRREQEWEEEEEEEGSNREVRRYTARLKEGDVFI MP
 45 AAHPVAINASSELHLLGFGINAENHRI FLAGDKDNVIDQIEKQAKDLA FPGSGEQVE
 KLIK NQRESHFVSAR PQSQSPSSPEKEDQEEENQGGKGPLLSILKAFN"
 3'UTR 1848. .1949
 polyA_site 1949
 50 BASE COUNT 599 a 455c 517g 378t
 ORIGIN
 Arqarah Length: 1949 1996 16:44 Type: N Check: 6409
 55 1 CAATGAGAGG GAGGGTTTCT CCACTGATGC TGTGCTTGG GATCCTTGTC
 51 CTGGCTTCAG TTTCTGCAAC GCAGGCCAAG TCACCTTACC GGAAAACAGA
 101 GAACCCCTGC GCCCAGAGGT GCCTCCAGAG TTGTCAACAG GAACCCGACG
 151 ACTTGAAGCA AAAGGCATGC GAGTCTCGCT GCACCAAGCT CGAGTATGAT
 201 CCTCGTTGTG TCTATGACAC TGGCGCCACC AACCAACGTC ACCCTCCAGG
 251 GGAGCGGACA CGTGCCCGCC AACCCGAGA CTACGATGAT GACCGCCGTC
 60 101 AACCCCGAAG AGAGGAAGGA GGCCGATGGG GACCAGCTGA ACCGAGGGAG
 351 CGTGAAAGAG AAGAAGACTG GAGACAACCA AGAGAAGATT GGAGGCCGAC
 401 AAGTCATCAG CAGCCACGGA AAATAAGGCC CGAAGGAAGA GAAGGAGAAC
 451 AAGAGTGGGG AACACCAGT AGCGAGGTC GGGAAAGAAC ATCACGGAAC
 501 AACCCCTTCT ACTTCCCGTC AAGGCGGTT AGCACCCGCT ACGGGAACCA
 65 55: AAACGGTAGG ATCCCGCTCC TGCAGAGGTT TGACCAAAGG TCAAAGCAGT

ES 2 344 034 T3

601 TTCAGAATCT CCAGAATCAC CGTATTGTGC AGATCGAGGC CAGACCCTAAC
 651 ACTCTTGTTC TTCCCAAGCA CGCTGATGCT GATAACATCC TTGTTATCCA
 701 GCAAGGACAA GCCACCGTGA CCGTAGCAAA TGGCAATAAC AGAAAGAGCT
 5 751 TTAATCTTGA CGAGGGCCAT GCACTCAGAA TCCCATCCGG TTTCATTICC
 801 TACATCTTGA ATCGACATGA CAACCAGAAC CTCAGAGTAG CTAAAATCTC
 851 CATGCCCGTT AACACGCCCG GCCAGTTTGA GGATTTCTTC CCGGCGAGCA
 901 GCCGAGACCA ATCATCTTAC TTGCAGGGAT TCAGCAGGAA TACTTTGGAG
 951 GCCGCCCTCA ATGCGGAATY CAATGAGATA CCGAGGGTGC TGTTAGAAGA
 10 1001 GAATGCAGGA GGAGAGCAAG AGGAGAGAGG GCAGAGGGCGA CGGAGTACTC
 1051 GGAGTAGTGA TAATGAAGGA GTGATAGTCA AAGTGTCAA GGAGCACGTT
 1101 CAAGAACTTA CTAAGCACGC TAAATCCGTC TCAAAGAAAG GCTCCGAAGA
 1151 GGAAGATATC ACCAACCCAA TCAACTTGAG AGATGGCGAG CCCGATCTTT
 1201 CTAACAACTT TGGGAGGTTA TTTGAGGTGA AGCCAGACAA GAAGAAACCC
 15 1251 CAGCTTCAGG ACCTGGACAT GATGCTCACC TGTGTAGAGA TCAAAGAAGG
 1301 AGCTTTGATG CTCCACACT TCAACTCAAA GGCCATGGTC ATCGTCGTCC
 1351 TCAACAAAGG AACTGGAAAC CTTGAACTCG TAGCTGTAAG AAAAGAGCAA
 1401 CAACAGAGGG GACGGCGGGA ACAAGAGTGG GAAGAAGAGG AGGAAGATGA
 1451 AGAAGAGGAG GGAAGTAACA GAGAGGTGCG TAGGTACACA GCGAGGTTGA
 20 1501 AGGAAGGCGA TGTGTTTATC ATGCCAGCAG CTCATCCAGT AGCCATCAAC
 1551 GCTTCCTCCG AACTCCATCT GCTTGGCTTC GGTATCAACG CTGAAAACAA
 1601 CCACAGAATC TTCCTTGCAG GTGATAAGGA CAATGTGATA GACCAGATAG
 1651 AGAAGCAAGC GAAGGATTTA GCATTCCCTG GTTCGGGTGA ACAAGTTGAG
 1701 AAGCTCATCA AAAACCAGAG GGAGTCTCAC TTTGTGAGTG CTCGTCTCA
 25 1751 ATCTCAATCT CCGTCGTCTC CTGAAAAGA GGATCAAGAG GAGGAAAACC
 1801 AAGGAGGGAA GGGTCCACTC CTTTCAATTT TGAAGGCTTT TAACTGAGAA
 1851 TGGAGGAAAC TTGTTATGTA TCCATAATA GATCACGCTT TTGTAATCTA
 1901 CTATCCAAA ACTTATCAAT AAATAAAAAC GTTTGTGCGT TGTTCCTCC

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 344 034 T3

TABLA 18

5 LOCUS AROALLII 717 bp DNA PLN
 DEFINITION Arachis hypogea (clone Ara h II p38) allergen II gene. polyA
 signal.
 ACCESSION L77197
 NID g1236995
 10 KEYWORDS allergen; conglutin; seed storage protein.
 SOURCE Arachis hypogea (strain Florunner) (clone: Ara h II p38) DNA.
 ORGANISM Arachis hypogea
 Eukaryotae; mitochondrial eukaryotes; Viridiplantae;
 Charophyta/Embryophyta group; Embryophyta; Magnoliophyta;
 Magnoliopsida; Rutanae; Sapindales; Fabaceae; Papilionoideae;
 Arachis.
 15 REFERENCE 1 (bases 1 to 717)
 AUTHORS Stanley, J.S.
 TITLE The major peanut allergen Ara h II is a seed storage protein
 with multiple IgE-binding epitopes
 JOURNAL Unpublished (1996)
 20 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1. .717
 /organism="Arachis hypogea"
 /strain="Florunner"
 /clone="Ara h II p38"
 polyA_signal 562. .567
 25 BASE COUNT 217 a 152 c 184g 164 t
 ORIGIN

Arqallii Length: 717 1996 14:32 Type: N Check: 3606 ..

30 1 GCTCACCATA CTAGTAGCCC TCGCCCTTTT CCTCCTCGCT GCCCAGCAT
 51 CTGCGAGGCA GCAGTGGGAA CTCCAAGGAG ACAGAAGATG CCAGAGCCAG
 101 CTCGAGAGGG CGAACCTGAG GCCCTGCGAG CAACATCTCA TGCAGAAGAT
 151 CCAACGTGAC GAGGATTCAT ATGAACGGGA CCCGTACAGC CCTAGTCAGG
 35 201 ATCCGTACAG CCCTAGTCCA TATGATCGGA GAGGCGCTGG ATCCTCTCAG
 251 CACCAAGAGA GGTGTTGCAA TGAGCTGAAC GAGTTTGAGA ACAACCAAG
 301 GTGCATGTGC GAGGCATTGC AACAGATCAT GGAGAACCAG AGCGATAGGT
 351 TGCAGGGGAG GCAACAGGAG CAACAGTTCA AGAGGGAGCT CAGGAACTTG
 40 401 CCTCAACAGT GCGGCCTTAG GGCACCACAG CGTTGCGACT TGGACGTCGA
 451 AAGTGGCGGC AGAGACAGAT ACTAACACC TATCTCAAAA AAAGAAAAGA
 501 AAAGAAAAGA AAATAGCTTA TATATAAGCT ATTATCTATG GTTATGTTTA
 551 GTTTTGGTAA TAATAAAGAT CATCACTATA TGAATGTGTT GATCGTGTTA
 45 601 ACTAAGGCAA GCTTAGGTTA TATGAGCACC TTTAGAGTGC TTTTATGGCG
 651 TTGTCTATGT TTTGTTGCTG CAGAGTTGTA ACCATCTGA AATAATATAA
 701 AAAGATCATG TTTTGT

50
55
60
65

ES 2 344 034 T3

TABLA 19

```

5  LOCUS      ARQARAHI      2032 bp      mRNA          PLN
   DEFINITION Arachis hypogea (clone P41b) Ara h I mRNA, complete cds.
   ACCESSION  LJ4402
   NID        g602435
   KEYWORDS   allergen.
   SOURCE     Arachis hypogea (strain Florunner) seed cDNA to mRNA.
10  ORGANISM   Arachis hypogea
        Eukaryota; Plantae; Embryobionta; Magnoliophyta; Magnoliopsida;
        Rosidae; Fabales; Fabaceae.
   REFERENCE  1 (bases 1 to 2032)
   AUTHORS    Burks,A.W., Cockrell,G., Stanley,J.S., Helm,R.M. and Bannon,G.A.
15  TITLE      Recombinant peanut allergen Ara h I expression and IgE binding
        in patients with peanut hypersensitivity
   JOURNAL    Unpublished (1994)
   STANDARD   full automatic
   COMMENT    NCBI gi: 602435
   FEATURES   Location/Qualifiers
20  source     1..2032
        /organism="Arachis hypogea"
        /strain="Florunner"
        /dev_stage="seed"
        /sequenced_mol="cDNA to mRNA"
        /clone="P41b"
25  5'UTR      <1..49
   CDS        50..1930
        /gene="Ara h I"
        /note="NCBI gi: 602436"
        /codon_start=1
        /db_ref="PID:g602436"
30
   /translation="MRGRVSPMLLLGLIVLASVSATHAKSSPYQKKTENPCAQRCLQ
   SCQQEPDDLKQKACESRCTKLEYDPRCVYDPRGHTGTTNQRSPPGERTRGRQPGDYDD
35  DRRQPRREEGGRWGPAGPREREREEDWRQPREWRRPSHQQPRKIRPEGREGEQEWGT
   PGSHVREETSRRNPFYFPSRRFSTRYGNQNGRIRVLQRFDQRSRQFQNLQNHRIVQIE
   AKPNTLVLPKHADADNILVIQQGQATVTVANGMNRKSFNLDEGHALRIPSGFISYILN
40  RHDNQNLRVAKISMPVNTPGQFEDFFPASSRDQSSYLQFSRNTLEAAFNAEFNEIRR
   VLLENAGGEQEERGQRWRSTRSSENNEGVIVKVSKEHVEELTKHAKSVSKKGSEEEG
   DITNPINLREGEPLDLSNFGKLFVVKPKDKNPQLQDLDMMLTCVEIKEGALMLPHFNS
45  KAMVIVVVKGTGNLELVAVRKEQQQRGRREEEEDDEEEEGSNREVRRYTARLREGD
   VFIMPAHPVAINASSELHLLGFGINAENNHRIFLAGDKDNVIDQIEKQAKDLAFPGS
   GEQVEKLIKQKESHFVSARPOSQSQSPSSPEKESPEKEDQEENQGGKGPLLSILKA
50  FN"
   3'UTR      1931..2032
   polyA_signal 2005..2010
   polyA_site   2032
   BASE COUNT  628 A      473 C      530 G      401t
   ORIGIN
55  Araqarahi Length: 2032          1996 16:36 Type: N Check: 8370
        1 AATAATCATA TATATTCATC AATCATCTAT ATAAGTAGTA GCAGGAGCAA
        51 TGAGAGGGAG GGTTCCTCCA CTGATGCTGT TGCTAGGGAT CCTTGTCTGT
60  101 GCTTCAGTTT CTGCAACGCA TGCCAAGTCA TCACCTTACC AGAAGAAAAC
        151 AGAGAACCCC TCCGCCCAGA GGTGCCTCCA GAGTTGTCAA CAGGAACCGG
        201 ATGACTTGAA GCAAAGGCA TGCGAGTCTC GCTGCACCAA GCTCGAGTAT
65

```

ES 2 344 034 T3

251 GATCCTCGTT GTGTCTATGA TCCTCGAGGA CACACTGGCA CCACCAACCA
 301 ACGTTCCCCT CCAGGGGAGC GGACACGTGG CCGCCAACCC GGAGACTACG
 351 ATGATGACCG CCGTCAACCC CGAAGAGAGG AAGGAGGCCG ATGGGGACCA
 5 401 GCTGGACCGA GGGAGCGTGA AAGAGAAGAA GACTGGAGAC AACCAAGAGA
 451 AGATTGGAGG CGACCAAGTC ATCAGCAGCC ACGGAAAATA AGGCCCGAAG
 501 GAAGAGAAGG AGAACAAGAG TGGGGAACAC CAGGTAGCCA TGTGAGGGAA
 10 551 GAAACATCTC GGAACAACCC TTTCTACTTC CCGTCAAGGC GGTTTAGCAC
 601 CCGCTACGGG AACCAAAACG GTAGGATCCG GGTCTGCAG AGGTTTGACC
 651 AAAGGTCAAG GCAGTTTCAG AATCTCCAGA ATCACCCTAT TGTGCAGATC
 701 GAGGCCAAAC CTAACACTCT TGTTCTTCCC AAGCACGCTG ATGCTGATAA
 15 751 CATCCTTGTT ATCCAGCAAG GGCAAGCCAC CGTGACCGTA GCAAATGGCA
 801 ATAACAGAAA GAGCTTTAAT CTTGACGAGG GCCATGCACT CAGAATCCCA
 851 TCCGGTTTCA TTCTTACAT CTTGAACCGC CATGACAACC AGAACCTCAG
 20 901 AGTAGCTAAA ATCTCCATGC CCGTTAACAC ACCCGGCCAG TTTGAGGATT
 951 TCTTCCCAGC GAGCAGCCGA GACCAATCAT CCTACTTGCA GGGCTTCAGC
 1001 AGGAATACGT TGGAGGCCGC CTTCAATGCG GAATTCATG AGATACGGAG
 25 1051 GGTGCTGTTA GAAGAGAATG CAGGAGGTGA GCAAGAGGAG AGAGGGCAGA
 1101 GCGGATGGAG TACTCGGAGT AGTGAGAACA ATGAAGGAGT GATAGTCAA
 1151 GTGTCAAAGG AGCACGTTGA AGAACTTACT AAGCACGCTA AATCCGTCTC
 1201 AAAGAAAGGC TCCGAAGAAG AGGGAGATAT CACCAACCCA ATCAACTTGA
 30 1251 GAGAAGGCGA GCCCGATCTT TCTAACAAC TGGGGAAGTT ATTTGAGGTG
 1301 AAGCCAGACA AGAAGAACCC CCAGCTTCAG GACCTGGACA TGATGCTCAC
 1351 CTGTGTAGAG ATCAAAGAAG GAGCTTTGAT GCTCCACAC TTCAACTCAA
 1401 AGGCCATGGT TATCGTCGTC GTCAACAAAG GAACTGGAAA CCTTGAACTC
 35 1451 GTGGCTGTAA GAAAAGAGCA ACAACAGAGG GGACGGCGGG AAGAAGAGGA
 1501 GGACGAAGAC GAAGAAGAGG AGGGAAGTAA CAGAGAGGTG CGTAGGTACA
 1551 CAGCGAGGTT GAAGGAAGGC GATGTGTTCA TCATGCCAGC AGCTCATCCA
 40 1601 GTAGCCATCA ACGCTTCCTC CGAACTCCAT CTGCTTGGCT TCGGTATCAA
 1651 CGTGAAAAC AACCCAGAA TCTTCCTTGC AGGTGATAAG GACAATGTGA
 1701 TAGACCAGAT AGAGAAGCAA GCGAAGGATT TAGCATTCCC TGGGTCGGGT
 1751 GAACAAGTTG AGAAGCTCAT CAAAAACCAG AAGGAATCTC ACTTTGTGAG
 45 1801 TGCTCGTCCT CAATCTCAAT CTCAATCTCC GTCGTCTCCT GAGAAAGAGT
 1851 CTCCTGAGAA AGAGGATCAA GAGGAGGAAA ACCAAGGAGG GAAGGGTCCA
 1901 CTCCTTCAA TTTTGAAGGC TTTTAACTGA GAATGGAGGC AACTTGTTAT
 1951 GTATCGATAA TAAGATCAG CTTTTGTACT CTACTATCCA AAAACTTATC
 50 2001 AATAAATAAA AACGTTTGTG CGTTGTTTCT CC

TABLA 20

55

GENIE> type arah2p38.pep
 TRANSLATE of: arah2p38.final check: 9822 from: 4 to: 480
 generated symbols 1 to: 159.

60

Arah2p38.Pep Length: 157 1996 15:24 Type: P Check: 2859

65

1 LTILVALALF LLAHASARQ QWELQDRRC QSQLERANLP PCEQHLMOKI
 51 QRDEDSYERD DYSYSDPYS PPSYDRRGAG SSOHQERCCN ELNEFENNQR
 101 CMCEALQOIM ENQSDRLQGR QEQQFKREL RNLPQOCCLR APQRCDLQVE
 151 SGGDRDY

Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 9420614 A [0004]
- US 9615222 W [0116]

Literatura no relacionada con patentes citada en la descripción

- A review of peanut chemistry: implications for the standardization of peanut extracts. **Yunginger J.W.; Jones RT.** Proceedings of the Fourth International Paul Ehrlich Seminar on the Regulatory Control and Standardization of Allergenic Extracts. *Gustav Fischer Verlag*, 16 October 1985, 251-64 [0028]
- **Yunginger JW; Sweeney KG; Sturner WQ et al.** Fatal food-induced anaphylaxis. *JAMA*, 1988, vol. 260, 1450-2 [0028]
- **Sampson HA; Mendelson L; Rosen JP.** Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescent. *N Engl J Med*, 1992, vol. 327,380-4 [0028]
- **Hoffman DR; Haddad ZH.** Diagnosis of IgE-mediated reaction to food antigens by radioimmunoassay. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*, 1974, vol. 54, 165-73 [0028]
- **Chapman MD.** Purification of allergens. *Curr Opin Immunol*, 1989, vol. 1, 647-53 [0028]
- **Chapman MD.** Monoclonal antibodies as structural probes for mite, cat, and cockroach allergens. *J Immunol*, 1987, vol. 139, 1479-84 [0028]
- **Mourad W; Mecheri S; Peltre G; David B; Hebert J.** Study of the epitope structure of purified Dac g I and Lol p I, the major allergens of *Dactylis glomerata* and *Lolium perenne* pollens, using monoclonal antibodies. *J Immunol*, 1988, vol. 141, 3486-91 [0028]
- **Burks AW; Williams LW; Connaughton C; Cockrell G; O'Brien TJ; Helm RM.** Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*, 1992, vol. 90, 962-9 [0028]
- **Burks AW; Williams LW; Helm RM; Connaughton CA; Cockrell G; O'Brien TJ.** Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*, 1991, vol. 88, 172-9 [0028]
- **Rouse DA; Morris SL; Karpas AB; Probst PG; Chaparas SD.** Production, characterization, and species specificity of monoclonal antibodies to *Mycobacterium avium* complex protein antigens. *Infect Immun*, 1990, vol. 58, 1445-99 [0028]
- **Burks AW; Sampson HA; Buckley RH.** Anaphylactic reactions following gammaglobulin administration in patients with hypogammaglobulinemia; detection of IgE antibodies to IgA. *N Engl J Med*, 1986, vol. 314, 560-4 [0028]
- **Sutton R; Wrigley CW; Baldo BA.** Detection of IgE and IgG binding proteins after electrophoresis transfer from polyacrylamide gels. *J Immunol Methods*, 1982, vol. 52, 183-6 [0028]
- **Towbin H; Staehelin T; Gordan J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, vol. 76, 4350-4 [0028]
- Allergens and the genetics of allergy. **Marsh DG.** The antigens. *Academic Press*, 1975, vol. 3, 271-359 [0028]
- **Sampson HA; McCaskill CC.** Food hypersensitivity in atopic dermatitis: evaluation of 113 patients. *J Pediatr*, 1985, vol. 107, 669-75 [0028]
- **Sachs MI; Jones RT; Yunginger JW.** Isolation and partial characterization of a major peanut allergen. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*, 1981, vol. 67, 27-34 [0028]
- **Barnett D; Howden, MEH; Bonham B; Burley RW.** Aspects of legume allergy research. *proc Sydney Allergy Group*, 1985, vol. 4, 104-18 [0028]

ES 2 344 034 T3

- **Chapman MD; Heyman PW; Platts-Mills TAE.** Epitope mapping of two major inhalant allergens, Der p I and Derf I, from mites of the genus *Dermatophagoides*. *J Immunol*, 1987, vol. 139, 1479-84 [0028]
- 5 • **Burks AW; Cockrell G; Connaughton C; Helm RM.** Epitope specificity and immunoaffinity purification of the major peanut allergen, Ara h I. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*, 1994, vol. 93, 743-50 [0028]
- **O'Hehir RE; Young DB; Kay AB; Lamb JR.** Cloned human T lymphocytes reactive with *Dermatophagoides farinosa* (house dust mite): a comparison of T- and B-cell antigen recognition. *Immunology*, 1987, vol. 62, 635-40 [0028]
- 10 • **Yunginger JW; Squillace DL; Jones RT; Helm RM.** Fatal anaphylactic reactions induced by peanuts. *Allergy Proc*, 1989, vol. 10, 249-253 [0030]
- **Sampson HA; Mendelson L; Rosen JP.** Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J. Med*, 1992, vol. 327, 380-384 [0030]
- 15 • **Burks AW; Williams LW; Helm RM; Connaughton C; Cockrell G; O'Brien TJ.** Identification of a major peanut Allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J Allergy Clin Immunol*, 1991, vol. 88, 172-179 [0030]
- 20 • **Burks AW; Williams LW; Connaughton C; Cockrell G; O'Brien T; Helm RM.** Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, utilizing the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J Allergy Clin Immunol*, 1992, vol. 90, 962-969 [0030]
- **Chee PP; Slightom JL.** Molecular biology of legume vicilin-type seed storage protein genes. *Subcell Bioch*, 1991, vol. 17, 31-52 [0030]
- 25 • **Dure L.** An unstable domain in the vicilin genes of higher plants. *N Biol*, 1990, vol. 2, 487-493 [0030]
- **Jansen J.J.; A.F.M. Kardinaal; G. Huijber; B.J. Vleig-Boerstra; B.P. Martens; T. Ockhuizen.** Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1994, vol. 93, 446-456 [0052]
- 30 • **Sampson H.A.** The role of food allergy and mediator release in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1988, vol. 81, 635-645 [0052]
- **Bock S.A.; F.M. Atkins.** The natural history of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1989, vol. 83, 900-904 [0052]
- 35 • **Sampson H.A.; I. Mendelson; J.P. Rosen.** Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N. Engl. J. Med.*, 1992, vol. 327, 380-384 [0052]
- 40 • **Yunginger, J.W.; K.G. Sweeney; W.Q. Sturner; L.A. Giannandrea; J.D. Teigland; M. Bray; P.A. Benson; J.A. York; L. Biedrzycki; D.L. Squillace et al.** Fatal food-induced anaphylaxis. *JAMA*, 1988, vol. 260, 1450-1452 [0052]
- **Bernhisel-Broadbent, J.; S. Taylor; H.A. Sampson.** Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. II. Laboratory correlates. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1989, vol. 84, 701-709 [0052]
- 45 • **Taylor, S.L.; W.W. Busse; M.I. Sachs; J.L. Parker; J.W. Yunginger.** Peanut oil is not allergenic to peanut sensitive individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1981, vol. 68, 372-375 [0052]
- 50 • **Burks A.W.; L.W. Williams; R.M. Helm; C. Connaughton; G. Cockrell; T. O'Brien.** Identification of a major peanut allergen Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1991, vol. 88, 172-179 [0052]
- **Burks A.W.; G. Cockrell; J.S. Stanley; R.M. Helm; G.A. Bannon.** Recombinant peanut allergen Ara h I expression and IgE binding in patients with peanut hypersensitivity. *J. Clin. Invest.*, 1995, vol. 96, 1715-1721 [0052]
- 55 • **Jameson, B.A; H. Wolf.** The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinate. *Comput. Appl. Biosci.*, 1988, vol. 4, 181-186 [0052]
- 60 • **Gibbs, P.E.; K.B. Strongin; A. McPherson.** Evolution of legume seed storage proteins - a domain common to legumins and vicilins is duplicated in vicilins. *Mol. Biol. Evol*, 1989, vol. 6, 614-623 [0052]
- **Van Kampen, V.; W.M. Becker; Z. Chen; H.P. Rihs; G. Mazur; M. Raulf; V. Liebers; S. Istringhausen-Bley; X. Baur.** Analysis of B-cell epitopes in the N-terminal region of Chi 11 component III using monoclonal antibodies. *Molecular Immunol.*, 1994, vol. 31, 1133-1140 [0052]
- 65 • **Breiteneder, H.; F. Ferreira; A. Reikerstorfer; M. Duchene; R. Valenta; K. Hoffman-Sommergruber; C. Ebner; M. Breitenbach; D. Kraft; O. Scheiner.** Complementary DNA cloning and expression in *Escherichia coli*

- of Aln g I, the major allergen in pollen of alder (*Alnus glutinosa*). *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1992, vol. 90, 909-917 [0052]
- **Ball G.**; M.J. **Shelton**; B.J. **Walsh**; D.J. **Hill**; C.S. **Hosking**; M.E. **Howden**. A major continuous allergenic epitope of bovine beta-lactoglobulin recognized by human IgE binding. *Clinical and Experimental Allergy*, 1994, vol. 24, 758-764 [0052]
 - **Aas, K.**; S. **Elsayed**. Physico-chemical properties and specific activity of a purified allergen (codfish). *Developments in Biological Standardization*, 1975, vol. 29, 90-98 [0052]
 - **Elsayed, S.**; E. **Holen**; T. **Dybendal**. Synthetic allergenic epitopes from the amino-terminal regions of the major allergens of hazel and birch pollen. *Int'l. Archives of Allergy & Applied Immunology*, 1989, vol. 89, 410-415 [0052]
 - **Herian, A.M.**; S.L. **Taylor**; R.K. **Bush**. Identification of soybean allergens by immunoblotting with sera from soy-allergic adults. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1990, vol. 92, 193-198 [0052]
 - **Shanti, K.N.**; B.M. **Martin**; S. **Nagpal**; D.D. **Metcalf**; P.V. **Rao**. Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. *J. of Immunology*, 1993, vol. 151, 5354-5363 [0052]
 - Van der **Stoep, N.**; W. **Korver**; T. **Logtenberg**. *In vivo* and *in vitro* IgE isotype switching in human B lymphocytes: evidence for a predominantly direct IgM to IgE class switch program. *European J. of Immunol.*, 1994, vol. 24, 1307-1311 [0052]
 - **Reisman, R.E.** Fifteen years of hymenoptera venom immunotherapy: changing concepts and lessons. *Allergy Proceedings*, 1994, vol. 15, 61-63 [0052]
 - **Fitzsimons, T.**; L.C. **Grammer**. Immunotherapy-definition and mechanism. *Allergy Proc.*, 1990, vol. 11, 156 [0052]
 - **Birkner, T.**; H. **Rumpold**; E. **Jarolim**; H. **Ebner**; M. **Breitenbach**; O. **Scheiner**; D. **Kraft**. Evaluation of immunotherapy-induced changes in specific IgE, IgG, and IgG-subclasses in birch pollen-allergic patients by means of immunoblotting. Correlation with clinical response. *Allergy*, vol. 45, 418-426 [0052]
 - **Scheiner, O.** Recombinant allergens: biological, immunological and practical aspects. *Int Arch Allergy Immunol.*, 1992, vol. 98, 93-96 [0052]
 - **Gordon, B.R.** Future immunotherapy: what lies ahead?. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, 1995, vol. 113, 603-605 [0052]
 - **Sparholt, S.H.**; O.T. **Olsen**; C. **Schou**. The allergen specific B-cell response during immunotherapy. *Clinical and Experimental Allergy*, 1992, vol. 22, 648-653 [0052]
 - **Gieni, R.S.**; X. **Yang**; K.T. **Hayglass**. Allergen-specific modulation of cytokine synthesis patterns and IgE responses *in vivo* with chemically modified allergen. *The Journal of Immunol.*, 1993, vol. 150, 302-310 [0052]
 - **Secrist, H.**; C.J. **Chelen**; Y. **Wen**; J.D. **Marshall**; D.T. **Umetsu**. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J. Exp. Med.*, 1993, vol. 178, 2123-2130 [0052]
 - **Garcia, N.M.**; N.R. **Lynch**; M.C. Di **Prisco**; R.I. **Lopez**. Nonspecific changes in immunotherapy with house dust extract. *J Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 1995, vol. 5, 18-24 [0052]
 - **Oppenheimer, J.J.**; H.S. **Nelson**; S.A. **Bock**; F. **Christensen**; D.Y. **Leung**. Treatment of peanut allergy with rush immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1992, vol. 90, 151-152 [0052]
 - **Fung-Leung, W.P.**; J. **DeSousa-Hitzler**; A. **Ishaque**; L. **Zhou**; J. **Pang**; K. **Ngo**; J.A. **Panakos**; E. **Chourmouzis**; F.T. **Liu**; C.Y. **Laii**. Transgenic mice expressing the human high-affinity immunoglobulin (Ig) E receptor alpha chain respond to human IgE in mast cell degranulation and in allergic reactions. *J. of Exp. Med.*, 1996, vol. 183, 49-56 [0052].

REIVINDICACIONES

5 1. Un método de modificar la inmunogenicidad de un alérgeno que comprende la identificación de uno o más epítomos de unión de la IgE del alérgeno, y la mutación de uno o más epítomos de unión de la IgE para que la unión de la IgE en suero de los individuos con hipersensibilidad a uno o más epítomos de unión IgE se reduce o, la unión de la IgE en suero en individuos con hipersensibilidad al alérgeno es reducido, donde el alérgeno es un alérgeno alimentario y en el que sólo el 1 mutación de aminoácido se hace en uno o más epítomos de unión de la IgE.

10 2. El método de la reivindicación 1 donde el alérgeno es Ara h II.

3. El método de la reivindicación 2 en la que uno o más de los epítomos de unión de la IgE que está mutado e identificado en la SEQ. ID N° 2.

15 4. El método de la reivindicación 1 donde el alérgeno es Ara h I.

5. El método de la reivindicación 4 en la que uno o más de los epítomos de unión de la IgE que está mutado e identificado en la SEQ. ID N° 4.

20 6. Un alérgeno alterado por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en la medicina.

7. El uso de un alérgeno alterado por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una persona alérgica en el que una cantidad efectiva del medicamento se administra para reducir una reacción alérgica a dicho alérgeno.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

0 Índice de Antígeno >= 1.7

Chou-Fasman Prediction
June 20, 1995 05:33

ESTRUCTURA DE DIBUJO de: Fp17arah1. Pep: 1 ck: 4271
Traducción de: fp17arah1. Chequeo de consenso: 394 de 3 a 1967

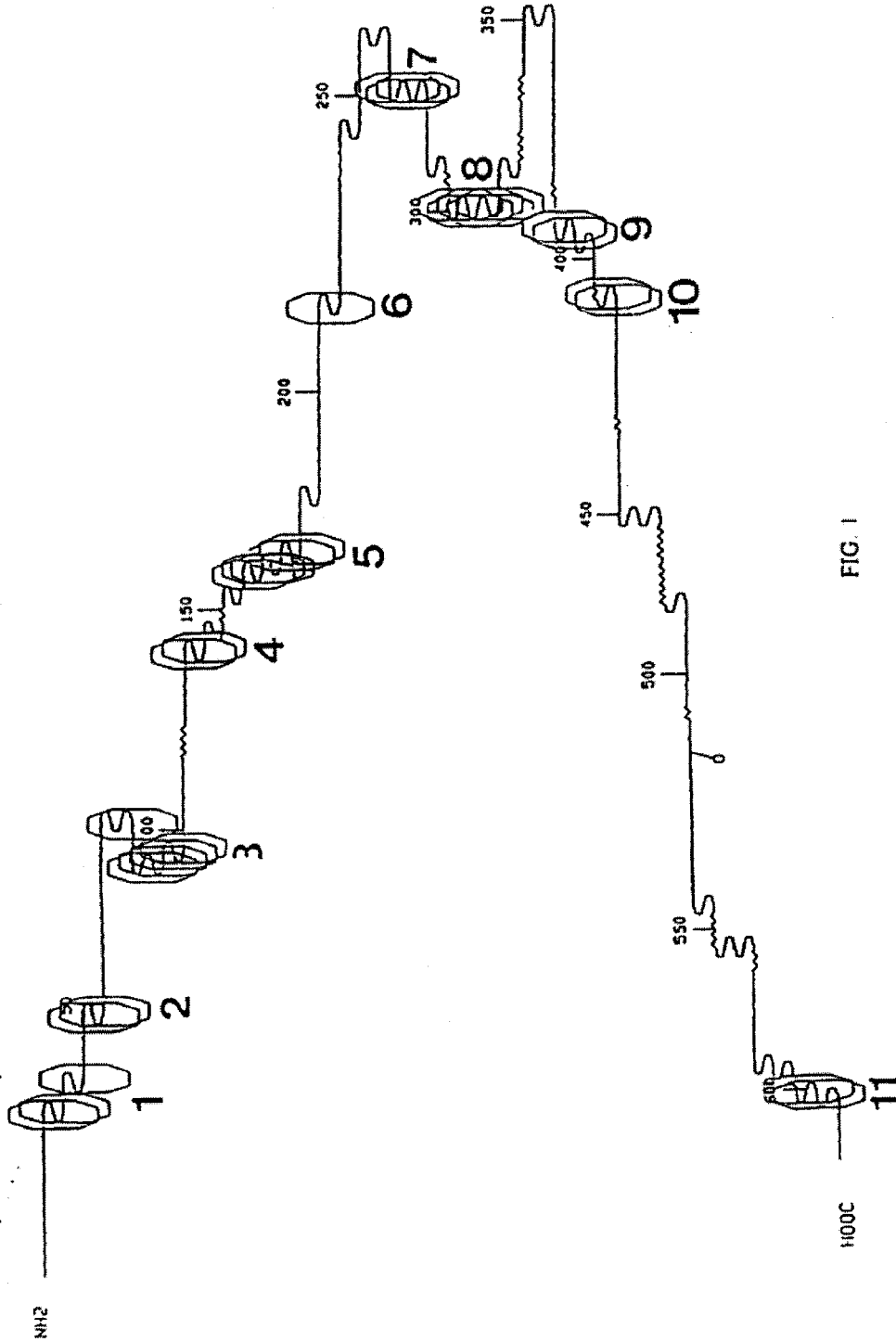
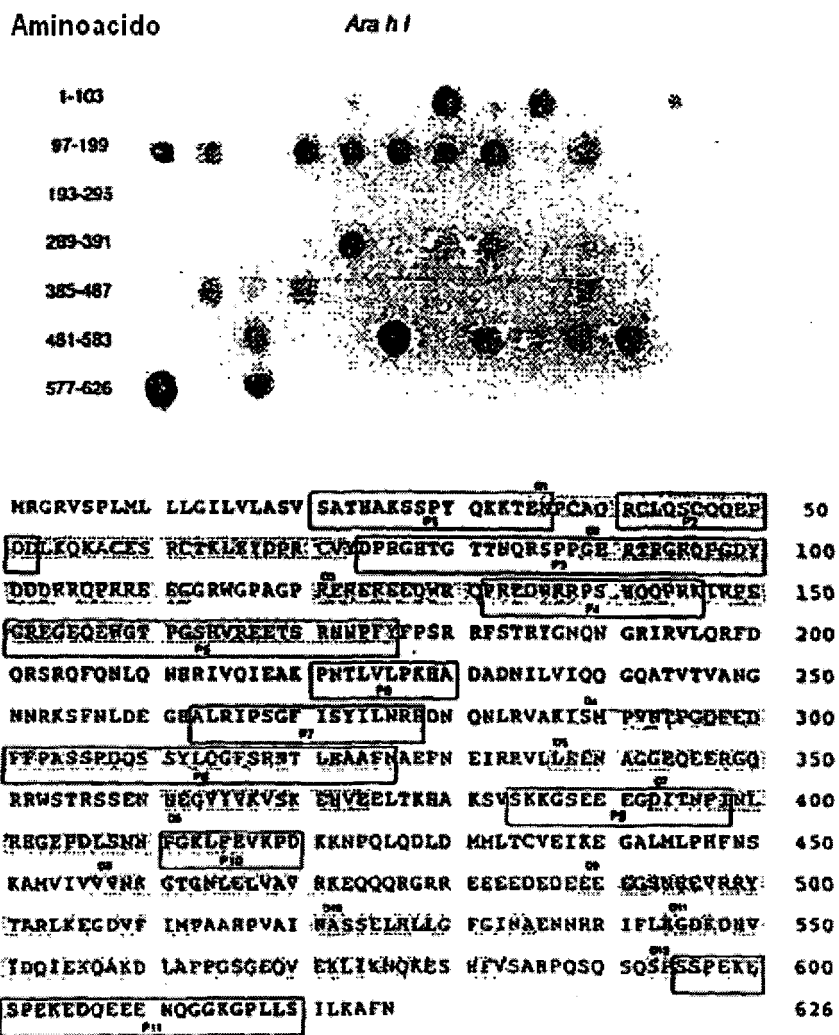


FIG. 2 A



Predicado
 Determinado

FIG. 2

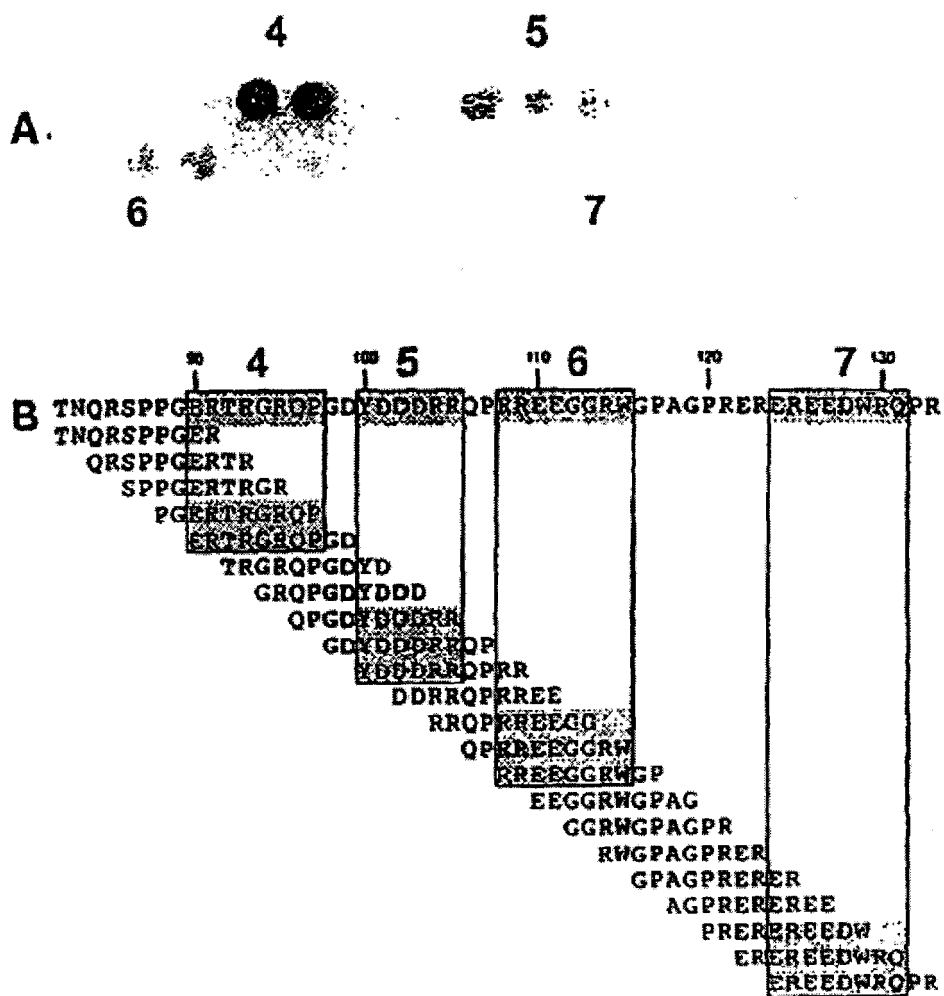
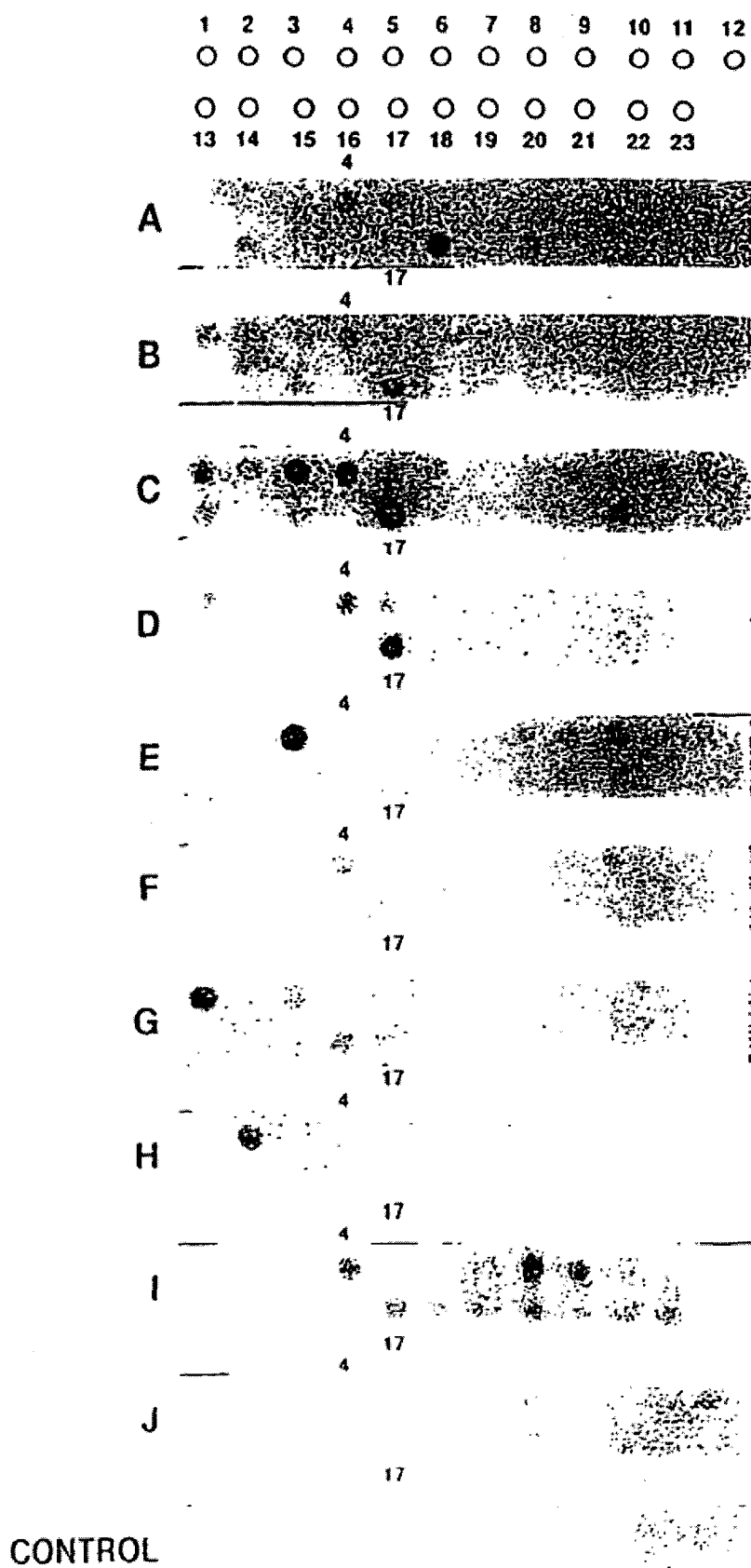


FIG. 3

FIG. 4



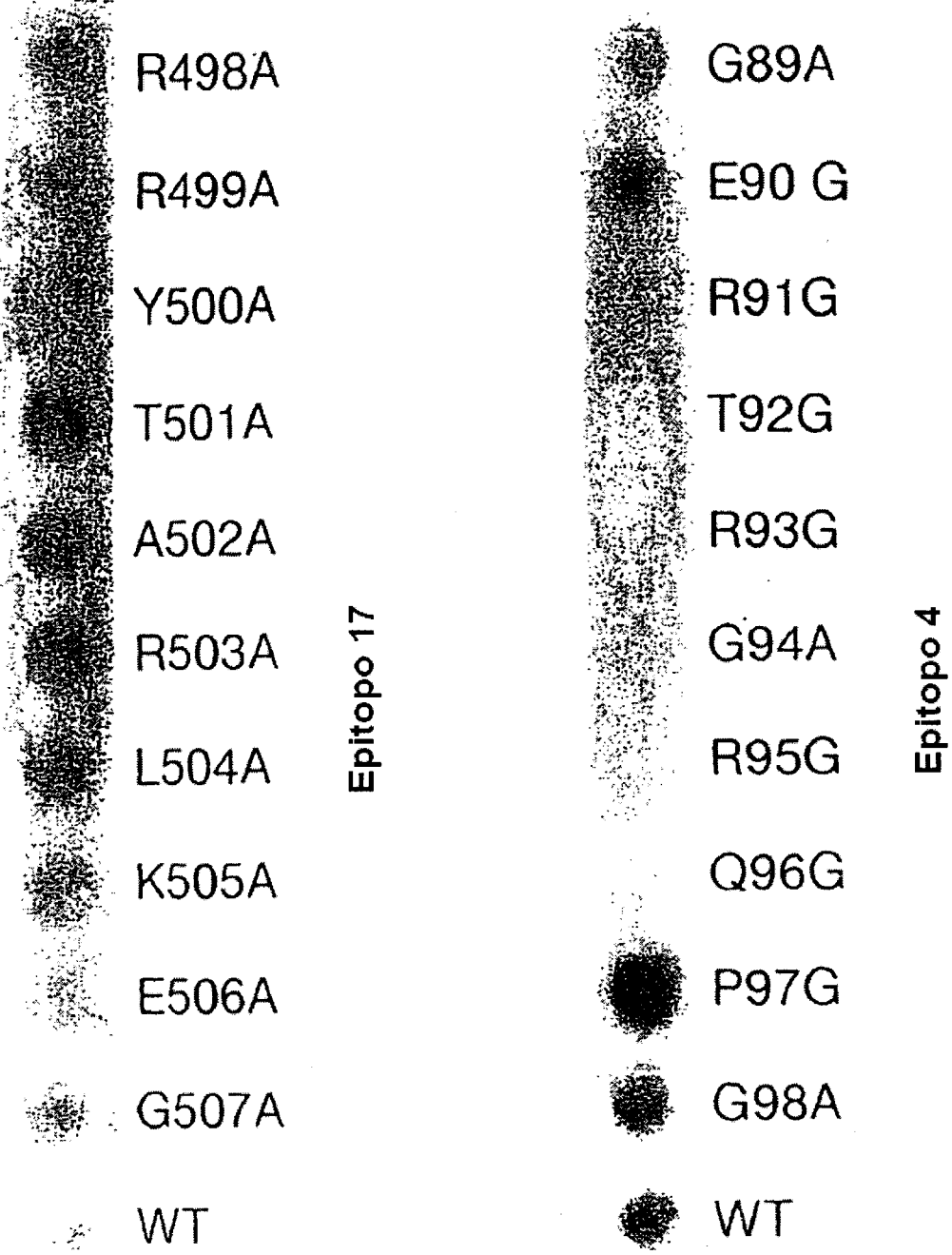


FIG. 5

FIG. 6

Clon Ara h II

ACG AGG CTC ACC ATA CTA GTA GCC CTC GCC CTT TTC CTC CTC GCT GCC 48
 Thr Arg Leu Thr Ile Leu Val Ala Leu Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ala

CAC GCA TCT GCG AGG CAG CAG TGG GAA CTC CAA GGA GAC AGA AGA TGC 96
 His Ala Ser Ala Arg Gln Gln Trp Glu Leu Gln Gly Asp Arg Arg Cys

CAG AGC CAG CTC GAG AGG GCG AAC CTG AGG CCC TGC GAG CAA CAT CTC 144
 Gln Ser Gln Leu Glu Arg Ala Asn Leu Arg Pro Cys Glu Gln His Leu

ATG CAG AAG ATC CAA CGT GAC GAG GAT TCA TAT GAA CGG GAC CCG TAC 192
 Met Gln Lys Ile Gln Arg Asp Glu Asp Ser Tyr Glu Arg Asp Pro Tyr

AGC CCT AGT CAG GAT CCG TAC AGC CCT AGT CCA TAT GAT CGG AGA GGC 240
 Ser Pro Ser Gln Asp Pro Tyr Ser Pro Ser Pro Tyr Asp Arg Arg Gly

GCT GGA TCC TCT CAG CAC CAA GAG AGG TGT TGC AAT GAG CTG AAC GAG 288
 Ala Gly Ser Ser Gln His Gln Glu Arg Cys Cys Asn Glu Leu Asn Glu

TTT GAG AAC AAC CAA AGG TGC ATG TGC GAG GCA TTG CAA CAG ATC ATG 336
 Phe Glu Asn Asn Gln Arg Cys Met Cys Glu Ala Leu Gln Gln Ile Met

GAG AAC CAG AGC GAT AGG TTG CAG GGG AGG CAA CAG GAG CAA CAG TTC 384
 Glu Asn Gln Ser Asp Arg Leu Gln Gly Arg Gln Gln Glu Gln Gln Phe

AAG AGG GAG CTC AGG AAC TTG CCT CAA CAG TGC GGC CTT AGG GCA CCA 432
 Lys Arg Glu Leu Arg Asn Leu Pro Gln Gln Cys Gly Leu Arg Ala Pro

CAG CGT TGC GAC TTG GAC GTC GAA AGT GGC GCC AGA GAC AGA TAC TAA 480
 Gln Arg Cys Asp Leu Asp Val Glu Ser Gly Gly Arg Asp Arg Tyr

ACACCTATCTCAAAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAATAGCTTATATATAAGCTATTATCTATGGTTAT
 GTTAGTTTTGGTAATAATAAAGATCATCACTATATGAATGTGTGATCGTGTAACTAAGCCAAGCTTA
 GGTTATATGAGCACCTTTAGAGTGCTTTATGGCGTTGTCTATGTTTTGTTGCTGCAGAGTTGTAACCAT
 CTTGAPATAATATAAAAAAGATCATGTTTTGTTAAAAAABAAAAABAAAAA

Indice antigeno >=1.7

Chou-Fasman Prediction
January 11, 1995 21:57

ESTRUCTURA DE DIBUJO de: arah2p38 pep.3 ck: 7865
traducción de: arah2p38: comprobación final 9822 de: 4 a 480

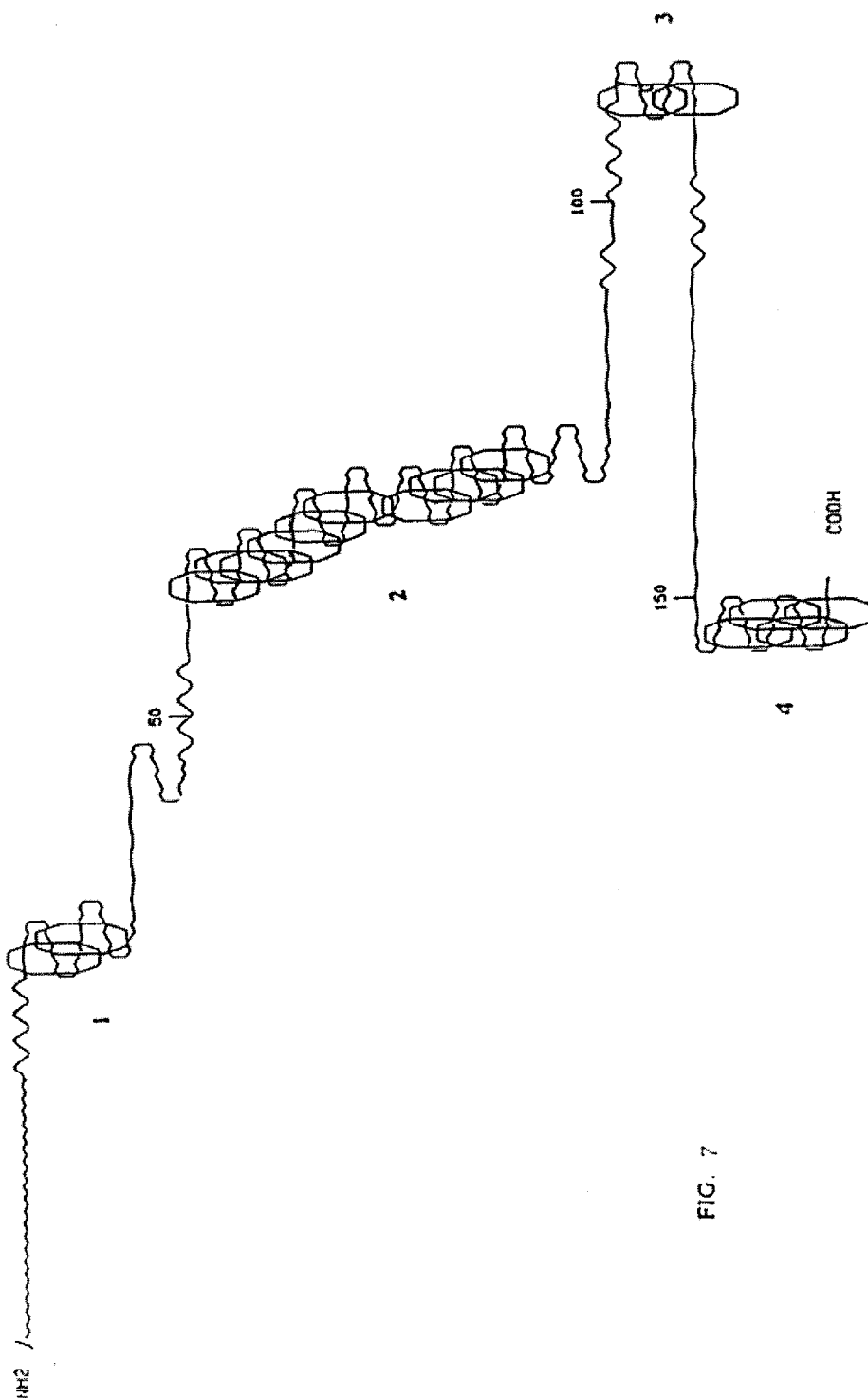


FIG. 7

FIG. 8

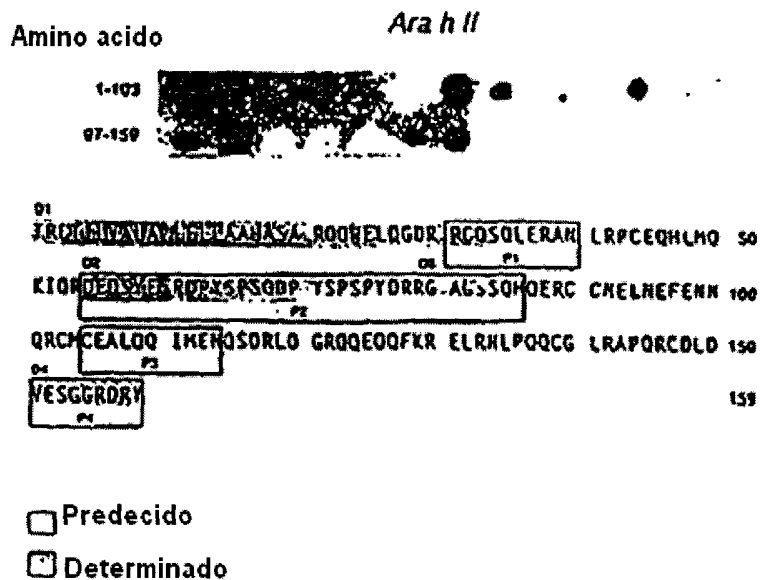


FIG. 9

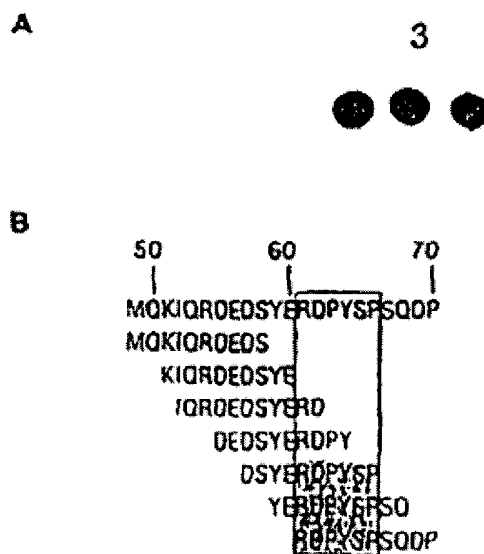
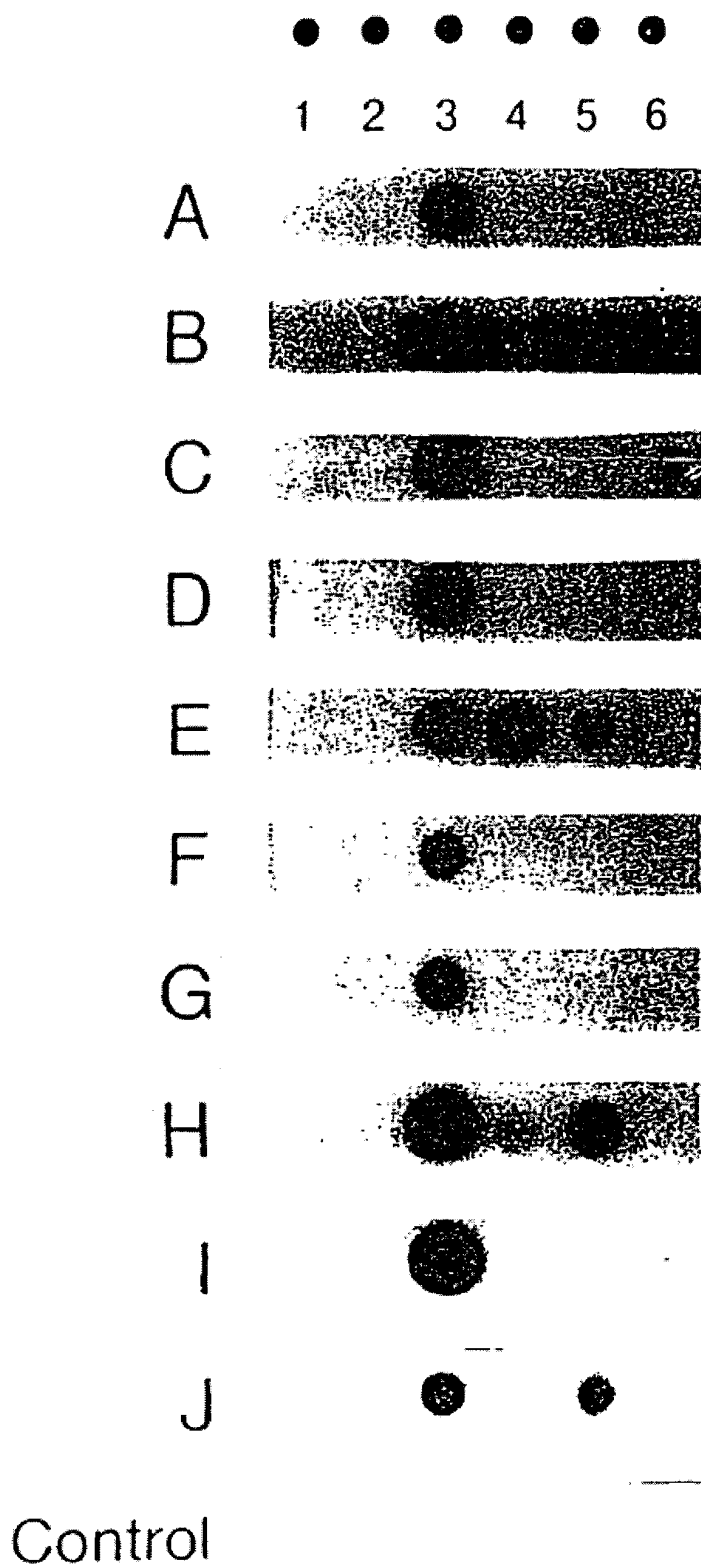


FIG. 10



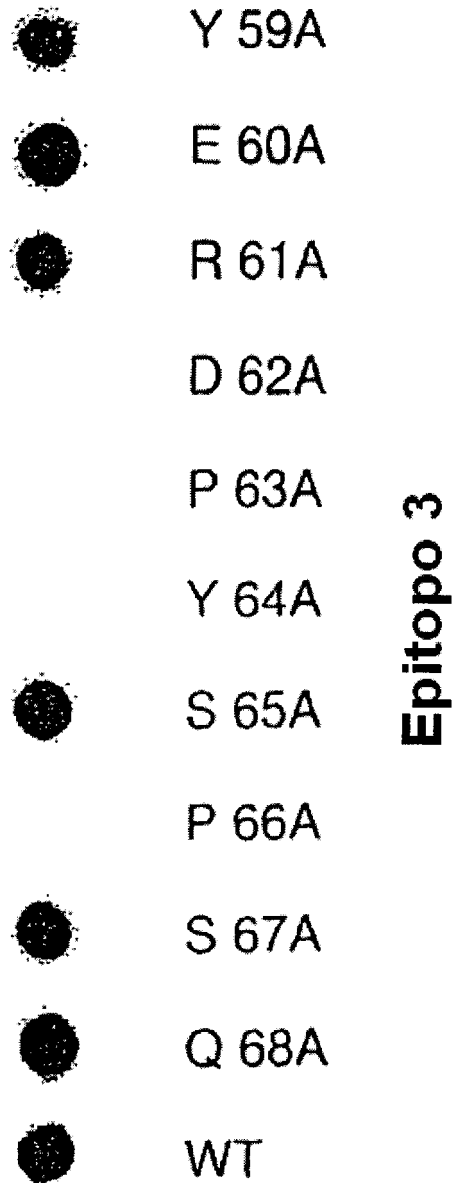


FIG. 11

ES 2 344 034 T3

```

1   AATAATCATATATATTCATCAATCATCTATATAAGTAGTAGCAGGAGCA
-----
50  ATGAGAGGGAGGGTTTCTCCACTGATGCTGTTGCTAGGGATCCTTGTCTCTG
.....
    M R G R V S P L M L L L G I L V L 17
101 GCTTCAGTTTCTGCAACGCATGCCAAGTCATCACCTTACCAGAAGAAAAC
.....G.....C.-----TT.CCG.....
    A S V S A T H A K S S P Y Q K K T 34
151 AGAGAACCCCTGCGCCCAGAGGTGCCTCCAGAGTTGTCAACAGGAACCGG
.....
    E N P C A Q R C L Q S C Q Q E P 50
201 ATGACTTGAAGCAAAAGGCATGCGAGTCTCGCTGCACCAAGCTCGAGTAT
.....
    D D L K Q K A C E S R C T K L E Y 67
251 GATCCTCGTTGTGTCTATGATCCTCGAGGACACACTGGCACCACCAACCA
.....-----.....G.....
    D P R C V Y D P R G H T G T T N Q 84
301 ACGTTCCCCTCCAGGGGAGCGGACACGTGGCCGCCAACCCGGAGACTACG
.....CA.....
    R S P P G E R T R G R Q P G D Y 100
351 ATGATGACCGCCGTCAACCCCGAAGAGAGGAAGGAGGCCGATGGGGACCA
.....
    D D D R R Q P R R E E G G R W G P 117
401 GCTGGACCGAGGGAGCGT'GAAAGAGAAGAAGACTGGAGACAACCAAGAGA
.....A.....
    A G P R E R E R E E D W R Q P R E 134

```

FIGURA 12A

ES 2 344 034 T3

451 AGATTGGAGGCGACCAAGTCATCAGCAGCCACGGAAAATAAGGCCCGAAG

 D W R R P S H Q Q P R K I R P E 150

501 GAAGAGAAGGAGAACAAGAGTGGGGAACACCAGGTAGCCATGTGAGGGAA
G.G.....
 G R E G E Q E W G T P G S H V R E 167

551 GAAACATCTCGGAACAACCCCTTTCTACTTCCCGTCAAGGCGGTTTAGCAC
A.....
 Peptido
 III E T S R N N P F Y F P S R R F S T 184

601 CCGCTACGGGAACCAAACGGTAGGATCCGGGTCTGCAGAGGTTTGACC
C.....
 R Y G N Q N G R I R V L Q R F D 200

651 AAAGGTCAAGGCAGTTTCAGAATCTCCAGAATCACCGTATTGTGCAGATC
A.....
 Q R S R Q F Q N L Q N H R I V Q I 217

701 GAGGCCAAACCTAACACTCTTGTTCTTCCCAAGCAGCTGATGCTGATAA
G.....
 E A K P N T L V L P K H A D A D N 234

751 CATCCTTGTTATCCAGCAAGGGCAAGCCACCGTGACCGTAGCAAATGGCA
A.....
 I L V I Q Q G Q A T V T V A N G 250

801 ATAACAGAAAGAGCTTTAATCTTGACGAGGGCCATGCACTCAGAATCCCA

 N N R K S F N L D E G H A L R I P 267

851 TCCGGTTTCATTTCTACATCTTGAACCGCCATGACAACCAGAACCTCAG
T.A.....
 S G F I S Y I L N R H D N Q N L R 284

901 AGTAGCTAAAATCTCCATGCCCGTTAACACACCCGGCCAGTTTGAGGATT
G.....
 A A K I S M P V N T P G Q F E D 300

FIGURA 12B

ES 2 344 034 T3

951 TCTTCCCGGGCGAGCAGCCGAGACCAATCATCCTACTTGCAGGGCTTCAGC
A.....
 F F P A S S R D Q S S Y L Q G F S 317

1001 AGGAATACGTTGGAGGCCGCCTTCAATGCGGAATTCAATGAGATACGGAG
T.....
 R N T L E A A F N A E F N E I R R 334

1051 GGTGCTGTTAGAAGAGAATGCAGGAGGTGAGCAAGAGGAGAGAGGGCAGA
A.....
 V L L E E N A G G E Q E E R G Q 350

1101 GGCGATGGAGTACTCGGAGTAGTGAGAACAATGAAGGAGTGATAGTCAAA
C.....---T.....
 R R W S T R S S E N N E G V I V K 367

1151 GTGTCAAAGGAGCACGTTGAAGAACTTACTAAGCACGCTAAATCCGTCTC
C.....
 V S K E H V E E L T K H A K S V S 384

1201 AAAGAAAGGCTCCGAAGAAGAGGGAGATATCACCAACCCAATCAACTGA
A---.....
 Peptido II K K G S E E E G D I T N P I N L 400

1251 GAGAAGGCGAGCCCCGATCTTTCTAACAACCTTTGGGAAGTTATTTGAGGTG
T.....G.....
R E G E P D L S N N F G K L F E V 417

1301 AAGCCAGACAAGAAGAACCCCCAGCTTCAGGACCTGGACATGATGCTCAC

 K P D K K N P Q L Q D L D M M L T 434

1351 CTGTGTAGAGATCAAAGAAGGAGCTTTGATGCTCCACACTTCAACTCAA

 C V E I K E G A L M L P H F N S 450

FIGURA 12C

ES 2 344 034 T3

1401 AGGCCATGGTTATCGTCGTCGTCACAAAGGAACTGGAAACCTTGAACTC
C.....
 - K A M V I V V V N K G T G N L E L 467

1451 GTGGCTGTAAGAAAAGAGCAACAACAGAGGGGACGGCGGGAA-----
 ..A.....CAAGAGTC
 V A V R K E Q Q Q R G R R E - - - 481

1493 -GAAGAGGAGGACGAAGACGAAGAAGAGGGGAAGTAACAGAGAGGTGC
 G.....A.....G.....T.....
 E E E D E D E E E E G S N R E V 497

1542 GTAGGTACACAGCGAGGTTGAAGGAAGGCGATGTGTTTCATCATGCCAGCA

 R R Y T A R L K E G D V F I M P A 514

15 GCTCATCCAGTAGCCATCAACGCTTCCTCCGAAGTCCATCTGCTTGGCTT

 A H P V A I N A S S E L H L L G F 531

1642 CGGTATCAACGCTGAAAACAACCCACAGAATCTTCCTTGCAGGTGATAAGG

 Peptido G I N A E N N H R I F L A G D K 547
 |

1692 ACAATGTGATAGACCAGATAGAGAAGCAAGCGAAGGATTTAGCATTCCCT

 D N V I D Q I E K Q A K D L A F P 564

1742 GGGTCGGGTGAACAAGTTGAGAAGCTCATCAAAAACCAGAAGGAATCTCA
 ..T.....G...G.....
 G S G E Q V E K L I K N Q K E S H 581

1792 CTTTGTGAGTGCTCGTCCTCAATCTCAATCTCAATCTCCGTCGTCCTCTG
CG.....
 F V S A R P Q S Q S Q S P S S P 597

1842 AGAAAGAGTCTCCTGAGAAAGAGGATCAAGAGGAGGAAAACCAAGGAGGG
 -----A.....
 E K E S P E K E D Q E E E N Q G G 614

FIGURA 12D

```

1892  AAGGTCCTCCTTCAATTTGAAGGCTTTAACTGAGATGGAGGCA
      .....A.
      K G P L L S I L K A F N                               626
1942  ACTTGTATGATCGATAATAAGATCACGCTTTTGTACTCTACTATCCAA
      .....C.....A.....
1992  AAACTTATCAATAAATAAAAACGGTTTGTGCGTTGTTTCTCCAAAAA
      .....

```

Secuencia del nucleótido del ADNc del clon Ara h I. La secuencia del nucleótido del clon 41 B es mostrada en la primera línea. La segunda línea representa la secuencia del ADN P17 con puntos (.) representado los nucleótidos que son los mismos, guion (-), nucleótidos que están perdiendo, y nucleótidos A, C, G o T que difieren entre dos secuencias de ADN. La síntesis de la proteína empieza (ATG) y para en las posiciones subrayadas (TGA) con una señal de consenso (AATAAA). Los residuos de aminoácido llamativos son estas áreas que corresponden a las secuencias de aminoácidos determinadas de péptidos I, II y III de ara h I (tabla 14). Los números de la izquierda indican la secuencia del nucleótido y los de la derecha corresponden a la secuencia de aminoácido predichas. Estos datos de secuencia están disponibles en el GenBank bajo el número de acceso L34402.

FIGURA 12E

ES 2 344 034 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: UNIVERSIDAD DE ARKANSAS
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: ALERGÉNICOS DEL CACAHUETE Y MÉTODOS
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 4
- 10 (iv) DIRECCIÓN POSTAL:
- (A) DESTINATARIO: Patrea L. Pabst
 - (B) CALLE: 2800 One Atlantic Center 1201 West Peachtree Street
 - 15 (C) CIUDAD: Atlanta
 - (D) ESTADO: GA
 - (E) PAÍS: EE.UU.
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 30309-3450
- 20 (v) LECTOR DE ORDENADOR
- (A) TIPO MEDIO: Floppy disk
 - (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
 - 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Publicación # 1.0, Versión # 1,25
- (vi) APLICACIÓN ACTUAL DE DATOS:
- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
 - (C) CLASIFICACIÓN:
- 35 (vii) SOLICITUD ANTERIOR DE DATOS:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/US96/15, 222
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 23 de septiembre 1996
 - 40 (C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) AUTORIDAD/AGENTE DE INFORMACIÓN:
- 45 (A) NOMBRE: Pabst, Patrea L.
 - (B) NÚMERO DE REGISTRO: 31.284
 - (C) REFERENCIA/NÚMERO DE EXPEDIENTE: HS 103
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:
- 50 (A) TELÉFONO: (404)-873-8794
 - (B) TELEFAX: (404)-873-8795

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 1:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:
- (A) LONGITUD: 474 nucleótidos
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 60 (C) STRANDEDNESS: doble
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (A) Descripción: identificado como Ara h II clon de ADNc
- 65 (iii) HIPÓTESIS: n
- (iv) ANTI-SENTIDO: No

ES 2 344 034 T3

(v) TIPO DE FRAGMENTO: No aplica

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Arachis hypogaea*

(B) DEFORMACIÓN: Florunner

(C) INDIVIDUAL ISOLATE:

(D) Fase De Desarrollo: las semillas

(E) HAPLOTIPO: No aplica

(F) TIPO DE TEJIDO: cDNA de semillas

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(A) BIBLIOTECA: biblioteca de expresión de ADNc de semillas florunner en Uni-ZAP XR vector

(ix) ESPECIAL:

(A) NOMBRE/CLAVE:

(B) LOCALIZACIÓN:

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN: Mediante acuerdo con la información y la secuencia de la proteína consenso establecido

(D) OTRA INFORMACIÓN: la proteína de almacenamiento de semillas y alérgenos

(xi) DESCRIPCIÓN SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

```
CTCACCATAC TAGTAGCCCT CGCCCTTTTC CTCCTCGCTG CCCACGCATC TCGGAGGCAG 60
CAGTGGGAAC TCCAAGGAGA CAGAAGATGC CAGAGCCAGC TCGAGAGGGC GAACCTGAGG 120
CCCTGCGAGC AACATCTCAT GCAGAAGATC CAACGTGACG AGGATTCATA TGAACGGGAC 180
CCGTACAGCC CTAGTCAGGA TCCGTACAGC CCTAGTCCAT ATGATCGGAG AGGCGCTGGA 240
TCCTCTCAGC ACCAAGAGAG GTGTTGCAAT GAGCTGAACG AGTTTGAGAA CAACCAAAGG 300
TGCATGTGCG AGGCAITGCA ACAGATCATG GAGAACCAGA GCGATAGGTT GCAGGGGAGG 360
CAACAGGAGC AACAGTTCAA GAGGGAGCTC AGGAACTTGC CTCAACAGTG CGGCCTTAGG 420
GCACCACAGC GTTGCGACTT GGACGTCGAA AGTGGCGGCA GAGACAGATA CTA 474
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 157

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: la secuencia de aminoácidos

(A) Descripción: identificado como clon Ara h II de ADNc derivado de secuencia de aminoácidos

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Arachis hypogaea*

(B) DEFORMACIÓN: Florunner

(C) AISLAMIENTO INDIVIDUAL:

(D) FASE DE DESARROLLO: las semillas

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE:

ES 2 344 034 T3

(B) LOCALIZACIÓN:

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN: Mediante acuerdo con la información y la secuencia de la proteína consenso establecido

5

(D) OTRA INFORMACIÓN: la proteína de almacenamiento de semillas y alérgenos

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE:

10

(B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 15-24

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:

(D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como epítipo Ara h 2 IgE vinculante, el péptido 1

15

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE:

(B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 21-30

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:

20

(D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como epítipo Ara h 2 IgE vinculante, el péptido 2

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE:

25

(B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 27-36

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:

(D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como epítipo Ara h 2 IgE vinculante, péptido 3

30

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE:

(B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 39-48

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:

35

(D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como epítipo Ara h 2 IgE vinculante, péptido 4

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE:

40

(B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 49-58

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:

(D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como epítipo Ara h 2 IgE vinculante, péptido 5

45

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE:

(B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 60-69

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:

50

(D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como epítipo Ara h II unión de la IgE, el péptido 3

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE:

55

(B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 65-74

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:

60

(D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como epítipo Ara h 2 unión de la IgE, el péptido 7

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE:

65

(B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 81-90

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:

(D) OTRA INFORMACIÓN: epítipo identificado como Ara h II unión de la IgE, el péptido 4

ES 2 344 034 T3

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 91-100
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:
- (D) OTRA INFORMACIÓN: epítipo identificado como Ara h II unión de la IgE, el péptido 5

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 105-159
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:
- (D) OTRA INFORMACIÓN: epítipo identificado como Ara h II unión de la IgE, el péptido 6

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 115-124
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:
- (D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h 2 epítipo IgE vinculante, péptido 8

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 127-136
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:
- (D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h 2 epítipo IgE vinculante, péptido 9

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 143-152
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:
- (D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h 2 epítipo IgE vinculante, el péptido 10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

```

Leu Thr Ile Leu Val Ala Leu Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ala His Ala
 1           5           10           15
Ser Ala Arg Gln Gln Trp Glu Leu Gln Gly Asp Arg Arg Cys Gln Ser
           20           25           30
Gln Leu Glu Arg Ala Asn Leu Arg Pro Cys Glu Gln His Leu Met Gln
           35           40           45
Lys Ile Gln Arg Asp Glu Asp Ser Tyr Glu Arg Asp Pro Tyr Ser Pro
 50           55           60
Ser Gln Asp Pro Tyr Ser Pro Ser Pro Tyr Asp Arg Arg Gly Ala Gly
 65           70           75           80
Ser Ser Gln His Gln Glu Arg Cys Cys Asn Glu Leu Asn Glu Phe Glu
 55           85           90           95
Asn Asn Gln Arg Cys Met Cys Glu Ala Leu Gln Gln Ile Met Glu Asn
           100          105          110
Gln Ser Asp Arg Leu Gln Gly Arg Gln Gln Glu Gln Gln Phe Lys Arg
 60           115          120          125
Glu Leu Arg Asn Leu Pro Gln Gln Cys Gly Leu Arg Ala Pro Gln Arg
 130          135          140
Cys Asp Leu Asp Val Glu Ser Gly Gly Arg Asp Arg Tyr
 145          150          155
    
```

ES 2 344 034 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 1930
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: doble
- 10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

- (A) Descripción: identificado como Ara h I ADNc

(iii) hipótesis: n

(iv) ANTI-SENTIDO: No

(ix) Descripción XI SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

20	AATAATCATA TATATTCATC AATCATCTAT ATAAGTAGTA GCAGGAGCA ATG AGA	55
	Met Arg	
	1	
25	GGG AGG GTT TCT CCA CTG ATG CTG TTG CTA GGG ATC CTT GTC CTG GCT	103
	Gly Arg Val Ser Pro Leu Met Leu Leu Leu Gly Ile Leu Val Leu Ala	
	5 10 15	
30	TCA GTT TCT GCA ACG CAT GCC AAG TCA TCA CCT TAC CAG AAG AAA ACA	151
	Ser Val Ser Ala Thr His Ala Lys Ser Ser Pro Tyr Gln Lys Lys Thr	
	20 25 30	
35	GAG AAC CCC TGC GCC CAG AGG TGC CTC CAG AGT TGT CAA CAG GAA CCG	199
	Glu Asn Pro Cys Ala Gln Arg Cys Leu Gln Ser Cys Gln Gln Glu Pro	
	35 40 45 50	
40	GAT GAC TTG AAG CAA AAG GCA TGC GAG TCT CGC TGC ACC AAG CTC GAG	247
	Asp Asp Leu Lys Gln Lys Ala Cys Glu Ser Arg Cys Thr Lys Leu Glu	
	55 60 65	
45	TAT GAT CCT CGT TGT GTC TAT GAT CCT CGA GGA CAC ACT GGC ACC ACC	295
	Tyr Asp Pro Arg Cys Val Tyr Asp Pro Arg Gly His Thr Gly Thr Thr	
	70 75 80	
50	AAC CAA CGT TCC CCT CCA GGG GAG CGG ACA CGT GGC CGC CAA CCC GGA	343
	Asn Gln Arg Ser Pro Pro Gly Glu Arg Thr Arg Gly Arg Gln Pro Gly	
	85 90 95	

ES 2 344 034 T3

GAC TAC GAT GAT GAC CGC CGT CAA CCC CGA AGA GAG GAA GGA GGC CGA 391
 Asp Tyr Asp Asp Asp Arg Arg Gln Pro Arg Arg Glu Glu Gly Gly Arg
 100 105 110

5 TGG GGA CCA GCT GGA CCG AGG GAG CGT GAA AGA GAA GAA GAC TGG AGA 439
 Trp Gly Pro Ala Gly Pro Arg Glu Arg Glu Arg Glu Glu Asp Trp Arg
 115 120 125 130

10 CAA CCA AGA GAA GAT TGG AGG CGA CCA AGT CAT CAG CAG CCA CGG AAA 487
 Gln Pro Arg Glu Asp Trp Arg Arg Pro Ser His Gln Gln Pro Arg Lys
 135 140 145

15 ATA AGG CCC GAA GGA AGA GAA GGA GAA CAA GAG TGG GGA ACA CCA GGT 535
 Ile Arg Pro Glu Gly Arg Glu Gly Glu Gln Glu Trp Gly Thr Pro Gly
 150 155 160

20 AGC CAT GTG AGG GAA GAA ACA TCT CGG AAC AAC CCT TTC TAC TTC CCG 583
 Ser His Val Arg Glu Glu Thr Ser Arg Asn Asn Pro Phe Tyr Phe Pro
 165 170 175

25 TCA AGG CGG TTT AGC ACC CGC TAC GGG AAC CAA AAC GGT AGG ATC CGG 631
 Ser Arg Arg Phe Ser Thr Arg Tyr Gly Asn Gln Asn Gly Arg Ile Arg
 180 185 190

30 GTC CTG CAG AGG TTT GAC CAA AGG TCA AGG CAG TTT CAG AAT CTC CAG 679
 Val Leu Gln Arg Phe Asp Gln Arg Ser Arg Gln Phe Gln Asn Leu Gln
 195 200 205 210

35 AAT CAC CGT ATT GTG CAG ATC GAG GCC AAA CCT AAC ACT CTT GTT CTT 727
 Asn His Arg Ile Val Gln Ile Glu Ala Lys Pro Asn Thr Leu Val Leu
 215 220 225

40 CCC AAG CAC GCT GAT GCT GAT AAC ATC CTT GTT ATC CAG CAA GGG CAA 775
 Pro Lys His Ala Asp Ala Asp Asn Ile Leu Val Ile Gln Gln Gly Gln
 230 235 240

45 GCC ACC GTG ACC GTA GCA AAT GGC AAT AAC AGA AAG AGC TTT AAT CTT 823
 Ala Thr Val Thr Val Ala Asn Gly Asn Asn Arg Lys Ser Phe Asn Leu
 245 250 255

50 GAC GAG GGC CAT GCA CTC AGA ATC CCA TCC GGT TTC ATT TCC TAC ATC 871
 Asp Glu Gly His Ala Leu Arg Ile Pro Ser Gly Phe Ile Ser Tyr Ile
 260 265 270

55 TTG AAC CGC CAT GAC AAC CAG AAC CTC AGA GTA GCT AAA ATC TCC ATG 919
 Leu Asn Arg His Asp Asn Gln Asn Leu Arg Val Ala Lys Ile Ser Met
 275 280 285 290

60 CCC GTT AAC ACA CCC GGC CAG TTT GAG GAT TTC TTC CCG GCG AGC AGC 967
 Pro Val Asn Thr Pro Gly Gln Phe Glu Asp Phe Phe Pro Ala Ser Ser
 295 300 305

65 CGA GAC CAA TCA TCC TAC TTG CAG GGC TTC AGC AGG AAT ACG TTG GAG 1015
 Arg Asp Gln Ser Ser Tyr Leu Gln Gly Phe Ser Arg Asn Thr Leu Glu
 310 315 320

70 GCC GCC TTC AAT GCG GAA TTC AAT GAG ATA CGG AGG GTG CTG TTA GAA 1063
 Ala Ala Phe Asn Ala Glu Phe Asn Glu Ile Arg Arg Val Leu Leu Glu
 325 330 335

75 GAG AAT GCA GGA GGT GAG CAA GAG GAG AGA GGG CAG AGG CGA TGG AGT 1111
 Glu Asn Ala Gly Gly Glu Gln Glu Glu Arg Gly Gln Arg Arg Trp Ser
 340 345 350

ES 2 344 034 T3

	ACT CGG AGT AGT GAG AAC AAT GAA GGA GTG ATA GTC AAA GTG TCA AAG	1159
	Thr Arg Ser Ser Glu Asn Asn Glu Gly Val Ile Val Lys Val Ser Lys	
	355 360 365 370	
5	GAG CAC GTT GAA GAA CTT ACT AAG CAC GCT AAA TCC GTC TCA AAG AAA	1207
	Glu His Val Glu Glu Leu Thr Lys His Ala Lys Ser Val Ser Lys Lys	
	375 380 385	
10	GGC TCC GAA GAA GAG GGA GAT ATC ACC AAC CCA ATC AAC TTG AGA GAA	1255
	Gly Ser Glu Glu Glu Gly Asp Ile Thr Asn Pro Ile Asn Leu Arg Glu	
	390 395 400	
15	GGC GAG CCC GAT CTT TCT AAC AAC TTT GGG AAG TTA TTT GAG GTG AAG	1303
	Gly Glu Pro Asp Leu Ser Asn Asn Phe Gly Lys Leu Phe Glu Val Lys	
	405 410 415	
20	CCA GAC AAG AAG AAC CCC CAG CTT CAG GAC CTG GAC ATG ATG CTC ACC	1351
	Pro Asp Lys Lys Asn Pro Gln Leu Gln Asp Leu Asp Met Met Leu Thr	
	420 425 430	
25	TGT GTA GAG ATC AAA GAA GGA GCT TTG ATG CTC CCA CAC TTC AAC TCA	1399
	Cys Val Glu Ile Lys Glu Gly Ala Leu Met Leu Pro His Phe Asn Ser	
	435 440 445 450	
30	AAG GCC ATG GTT ATC GTC GTC GTC AAC AAA GGA ACT GGA AAC CTT GAA	1447
	Lys Ala Met Val Ile Val Val Val Asn Lys Gly Thr Gly Asn Leu Glu	
	455 460 465	
35	CTC GTG GCT GTA AGA AAA GAG CAA CAA CAG AGG GGA CGG CGG GAA GAA	1495
	Leu Val Ala Val Arg Lys Glu Gln Gln Gln Arg Gly Arg Arg Glu Glu	
	470 475 480	
40	GAG GAG GAC GAA GAC GAA GAA GAG GAG GGA AGT AAC AGA GAG GTG CGT	1543
	Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Glu Gly Ser Asn Arg Glu Val Arg	
	485 490 495	
45	AGG TAC ACA GCG AGG TTG AAG GAA GGC GAT GTG TTC ATC ATG CCA GCA	1591
	Arg Tyr Thr Ala Arg Leu Lys Glu Gly Asp Val Phe Ile Met Pro Ala	
	500 505 510	
50	GCT CAT CCA GTA GCC ATC AAC GCT TCC TCC GAA CTC CAT CTG CTT GGC	1639
	Ala His Pro Val Ala Ile Asn Ala Ser Ser Glu Leu His Leu Leu Gly	
	515 520 525 530	
55	TTC GGT ATC AAC GCT GAA AAC AAC CAC AGA ATC TTC CTT GCA GGT GAT	1687
	Phe Gly Ile Asn Ala Glu Asn Asn His Arg Ile Phe Leu Ala Gly Asp	
	535 540 545	
60	AAG GAC AAT GTG ATA GAC CAG ATA GAG AAG CAA GCG AAG GAT TTA GCA	1735
	Lys Asp Asn Val Ile Asp Gln Ile Glu Lys Gln Ala Lys Asp Leu Ala	
	550 555 560	
65	TTC CCT GGG TCG GGT GAA CAA GTT GAG AAG CTC ATC AAA AAC CAG AAG	1783
	Phe Pro Gly Ser Gly Glu Gln Val Glu Lys Leu Ile Lys Asn Gln Lys	
	565 570 575	
70	GAA TCT CAC TTT GTG AGT GCT CGT CCT CAA TCT CAA TCT CAA TCT CCG	1831
	Glu Ser His Phe Val Ser Ala Arg Pro Gln Ser Gln Ser Gln Ser Pro	
	580 585 590	
75	TCG TCT CCT GAG AAA GAG TCT CCT GAG AAA GAG GAT CAA GAG GAG GAA	1879
	Ser Ser Pro Glu Lys Glu Ser Pro Glu Lys Glu Asp Gln Glu Glu Glu	
	595 600 605 610	
80	AAC CAA GGA GGG AAG GGT CCA CTC CTT TCA ATT TTG AAG GCT TTT AAC	1927
	Asn Gln Gly Gly Lys Gly Pro Leu Leu Ser Ile Leu Lys Ala Phe Asn	
	615 620 625	
85	TGA	1930

ES 2 344 034 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

- (A) LONGITUD: 626
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocido

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Glicoproteína

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Arachis hypogaea*
- (B) CEPA: Florunner
- (C) INDIVIDUAL ISOLATE: Ara h I

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN:
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN: Mediante acuerdo con la información y la secuencia de la proteína consenso establecido
- (D) OTRA INFORMACIÓN: la proteína de almacenamiento de semillas y alérgenos

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 25-34
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:
- (D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epitopo, péptido 1

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 48-57
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:
- (D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epitopo, el péptido 2

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 65-74
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:
- (D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epitopo, péptido 3

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 89-98
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:
- (D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epitopo, péptido 4

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 97-105
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:
- (D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epitopo, péptido 5

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:

ES 2 344 034 T3

- (B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 107-116
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:
- (D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epítipo, péptido 6

5

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 123-132
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:
- (D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epítipo, péptido 7

10

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 134-143
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:
- (D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epítipo, péptido 8

15

20

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 143-152
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:
- (D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epítipo, péptido 9

25

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 294-303
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:
- (D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epítipo, el péptido 10

30

35

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 311-320
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:
- (D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epítipo, el péptido 11

40

45

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 325-334
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:
- (D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epítipo, el péptido 12

50

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 344-353
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:
- (D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epítipo, el péptido 13

55

60

(ix) RASGO:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 393-402
- (C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:
- (D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epítipo, el péptido 14

65

ES 2 344 034 T3

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE:

(B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 409-418

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:

(D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epítopo, el péptido 15

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE:

(B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 461-470

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:

(D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epítopo, el péptido 16

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE:

(B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 498-507

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:

(D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epítopo, el péptido 17

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE:

(B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 525-534

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:

(D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epítopo, el péptido 18

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE:

(B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 539-548

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:

(D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epítopo, el péptido 19

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE:

(B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 551-560

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:

(D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epítopo, el péptido 20

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE:

(B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 559-568

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:

(D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epítopo, el péptido 21

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE:

(B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 578-587

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:

(D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epítopo, el péptido 22

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE:

(B) LOCALIZACIÓN: aminoácidos 597-606

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN:

ES 2 344 034 T3

(D) OTRA INFORMACIÓN: identificado como Ara h I IgE epítopo, el péptido 23

(ix) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

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

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 344 034 T3

	145				150					155					160	
	Pro	Gly	Ser	His	Val	Arg	Glu	Glu	Thr	Ser	Arg	Asn	Asn	Pro	Phe	Tyr
5					165					170					175	
	Phe	Pro	Ser	Arg	Arg	Phe	Ser	Thr	Arg	Tyr	Gly	Asn	Gln	Asn	Gly	Arg
				180					185					190		
10	Ile	Arg	Val	Leu	Gln	Arg	Phe	Asp	Gln	Arg	Ser	Arg	Gln	Phe	Gln	Asn
			195					200					205			
	Leu	Gln	Asn	His	Arg	Ile	Val	Gln	Ile	Glu	Ala	Lys	Pro	Asn	Thr	Leu
15			210				215					220				
	Val	Leu	Pro	Lys	His	Ala	Asp	Ala	Asp	Asn	Ile	Leu	Val	Ile	Gln	Gln
	225					230					235					240
	Gly	Gln	Ala	Thr	Val	Thr	Val	Ala	Asn	Gly	Asn	Asn	Arg	Lys	Ser	Phe
20					245					250					255	
	Asn	Leu	Asp	Glu	Gly	His	Ala	Leu	Arg	Ile	Pro	Ser	Gly	Phe	Ile	Ser
				260					265					270		
25	Tyr	Ile	Leu	Asn	Arg	His	Asp	Asn	Gln	Asn	Leu	Arg	Val	Ala	Lys	Ile
			275					280					285			
	Ser	Met	Pro	Val	Asn	Thr	Pro	Gly	Gln	Phe	Glu	Asp	Phe	Phe	Pro	Ala
30		290					295					300				
	Ser	Ser	Arg	Asp	Gln	Ser	Ser	Tyr	Leu	Gln	Gly	Phe	Ser	Arg	Asn	Thr
	305					310					315					320
	Leu	Glu	Ala	Ala	Phe	Asn	Ala	Glu	Phe	Asn	Glu	Ile	Arg	Arg	Val	Leu
35					325					330					335	
	Leu	Glu	Glu	Asn	Ala	Gly	Gly	Glu	Gln	Glu	Glu	Arg	Gly	Gln	Arg	Arg
				340					345					350		
40	Trp	Ser	Thr	Arg	Ser	Ser	Glu	Asn	Asn	Glu	Gly	Val	Ile	Val	Lys	Val
			355					360					365			
	Ser	Lys	Glu	His	Val	Glu	Glu	Leu	Thr	Lys	His	Ala	Lys	Ser	Val	Ser
45		370					375					380				
	Lys	Lys	Gly	Ser	Glu	Glu	Glu	Gly	Asp	Ile	Thr	Asn	Pro	Ile	Asn	Leu
	385					390					395					400
	Arg	Glu	Gly	Glu	Pro	Asp	Leu	Ser	Asn	Asn	Phe	Gly	Lys	Leu	Phe	Glu
50					405						410				415	
	Val	Lys	Pro	Asp	Lys	Lys	Asn	Pro	Gln	Leu	Gln	Asp	Leu	Asp	Met	Met
				420					425					430		
55	Leu	Thr	Cys	Val	Glu	Ile	Lys	Glu	Gly	Ala	Leu	Met	Leu	Pro	His	Phe
			435					440					445			
	Asn	Ser	Lys	Ala	Met	Val	Ile	Val	Val	Val	Asn	Lys	Gly	Thr	Gly	Asn
60			450				455					460				
	Leu	Glu	Leu	Val	Ala	Val	Arg	Lys	Glu	Gln	Gln	Gln	Arg	Gly	Arg	Arg
	465					470					475					480
	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Ser	Asn	Arg	Glu
65					485						490				495	

ES 2 344 034 T3

Val Arg Arg Tyr Thr Ala Arg Leu Lys Glu Gly Asp Val Phe Ile Met
 500 505 510
 5 Pro Ala Ala His Pro Val Ala Ile Asn Ala Ser Ser Glu Leu His Leu
 515 520 525
 10 Leu Gly Phe Gly Ile Asn Ala Glu Asn Asn His Arg Ile Phe Leu Ala
 530 535 540
 15 Gly Asp Lys Asp Asn Val Ile Asp Gln Ile Glu Lys Gln Ala Lys Asp
 545 550 555 560
 Leu Ala Phe Pro Gly Ser Gly Glu Gln Val Glu Lys Leu Ile Lys Asn
 565 570 575
 20 Gln Lys Glu Ser His Phe Val Ser Ala Arg Pro Gln Ser Gln Ser Gln
 580 585 590
 Ser Pro Ser Ser Pro Glu Lys Glu Ser Pro Glu Lys Glu Asp Gln Glu
 595 600 605
 25 Glu Glu Asn Gln Gly Gly Lys Gly Pro Leu Leu Ser Ile Leu Lys Ala
 610 615 620
 Phe Asn
 625
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65