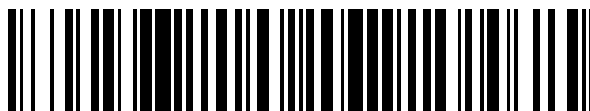


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 856 128**

51 Int. Cl.:

A61K 39/35

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.07.2015** **PCT/SE2015/050828**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2016** **WO16013971**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2015** **E 15750835 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2020** **EP 3171890**

54 Título: **Nuevo alérgeno**

30 Prioridad:

21.07.2014 SE 1450907

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:

27.09.2021

73 Titular/es:

PHADIA AB (100.0%)

Box 6460

751 37 Uppsala, SE

72 Inventor/es:

MATTSSON, LARS;

OLSSON, ULRICA;

LUNDGREN, THOMAS;

LIDHOLM, JONAS y

LARSSON, HÅKAN

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 856 128 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

Nuevo alérgeno

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la alergia. Más específicamente, la invención se refiere a la identificación de alérgenos novedosos de mamíferos y al diagnóstico y tratamiento de la alergia en los mamíferos.

10 Antecedentes

Aproximadamente el 20 % de las poblaciones del mundo industrializado se vuelven hipersensibles (alérgicas) al exponerse a antígenos a partir de una variedad de fuentes ambientales. Aquellos antígenos que inducen tipos de hipersensibilidad inmediata y/o retardada se conocen como alérgenos (Breiteneder, Hoffmann-Sommergruber y otros, 1997). Estos incluyen productos de pastos, árboles, malezas, caspa de animales, insectos, alimentos, medicamentos y productos químicos. Los anticuerpos implicados en la alergia atópica pertenecen principalmente al isotipo E de inmunoglobulina (IgE). La IgE se une a los mastocitos basófilos y las células dendríticas a través de un receptor específico de alta afinidad FcεRI. Tras la exposición a un alérgeno, los anticuerpos IgE específicos del alérgeno en la superficie celular se entrecruzan, lo que lleva a la liberación de mediadores inflamatorios tales como la histamina y los leucotrienos, lo que da lugar a manifestaciones fisiológicas de la alergia (Akdís 2006).

Las pruebas de diagnóstico de alergia implican la detección de anticuerpos IgE de pacientes con una especificidad para las proteínas a partir de una fuente de alérgenos. Sin embargo, una prueba de IgE positiva, es decir, sensibilización a IgE, no siempre conduce a manifestaciones clínicas de alergia y esta discrepancia es una de las principales razones para intentar desarrollar nuevos y mejores procedimientos diagnósticos. En las pruebas típicas, en estas pruebas se usa un extracto acuoso de la fuente del alérgeno, que contiene una mezcla de proteínas. Para la mayoría de las fuentes de alérgenos, las proteínas alergénicas presentes en el extracto crudo solo se han identificado y caracterizado parcialmente. Los procedimientos de las pruebas diagnósticas para la detección de anticuerpos IgE específicos en pacientes pueden usar un inmunoensayo *in vitro* mediante el uso de suero del paciente, o ser una prueba de pinchazo cutáneo (SPT), realizada mediante la aplicación tópica del extracto específico en la piel del paciente (Wainstein, Yee y otros, 2007). En la práctica clínica, el diagnóstico de alergia hecho por un médico generalmente se basa tanto en una prueba positiva de sensibilización de IgE para la fuente de alérgeno relevante como en un historial clínico convincente de reacciones alérgicas a este alérgeno. En los últimos años, se han identificado y caracterizado muchas proteínas alergénicas importantes en los extractos alergénicos. Esto ha permitido la cuantificación de anticuerpos IgE específicos para cada uno de estos componentes alergénicos individuales, a menudo denominados diagnósticos resueltos por componentes (CRD) (Hiller, Laffer y otros, 2002) (Valenta, Lidholm y otros, 1999) o diagnósticos de alergia de base molecular (MA) (Canonica, Ansotegui y otros, 2013).

Ahora se reconoce ampliamente que los diagnósticos de alergia de base molecular (MA) tienen varias ventajas bien definidas en comparación con el análisis convencional de IgE que usa extractos de alérgenos (Canonica, Ansotegui y otros, 2013). Se ha demostrado que el análisis de todos los componentes alergénicos relevantes de una fuente alergénica aumenta significativamente la utilidad clínica de las pruebas de IgE como lo ejemplifican el trigo, el maní y la avellana. (Nicolaou, Poorafshar y otros, 2010; Codreanu, Collignon y otros, 2011; Ebisawa, Moverare y otros, 2012) (Masthoff, Mattsson y otros, 2013). Un requisito necesario si se puede aplicar MA es que se haya identificado y caracterizado la mayoría de los componentes alérgenos individuales de una fuente de alérgenos.

Una de las implicaciones más importantes de los diagnósticos MA es distinguir una sensibilización por IgE genuina de la sensibilización debida a reactividad cruzada, lo que puede ayudar al médico a determinar si los responsables de los síntomas alérgicos son una fuente de alérgenos única, unas pocas estrechamente relacionadas o varias fuentes de alérgenos muy diferentes. Esto puede conducir a un mejor diagnóstico de hipersensibilidad al polen (Stumvoll, Westritschnig y otros, 2003), venenos (Müller, Schmid-Grendelmeier y otros, 2012) y alergia alimentaria (Matsuo, Dahlstrom y otros, 2008; Ebisawa, Shibata y otros, 2012). En particular para la alergia al maní y a la avellana, el uso de pruebas de IgE de componentes alérgenos es mejor para predecir un resultado clínico de la alergia que el uso de una prueba de IgE de extracto clásico (Nicolaou, Poorafshar y otros, 2010; Codreanu, Collignon y otros, 2011; Masthoff, Mattsson y otros, 2013). Una razón de esto es que algunos componentes pueden ser poco abundantes y, por lo tanto, solo demuestran reactividad de IgE debido a la reactividad cruzada con componentes homólogos de otras especies. Los individuos que solo tienen reactividad de IgE a dichos componentes de reacción cruzada pueden, por lo tanto, tener menos probabilidades de tener síntomas clínicos a este alérgeno (Asarnej, Moverare y otros, 2010; Asarnej, Nilsson y otros, 2012). A pesar de su baja asociación clínica, es muy importante identificar todos aquellos componentes de reacción cruzada poco abundantes en un extracto de alérgeno porque en el trabajo clínico de un paciente es importante que la suma de las reactividades de IgE a todos los componentes se suma a la del extracto completo con el fin de descartar la reactividad de IgE a otros componentes menores o desconocidos en el extracto. El resultado de los diagnósticos MA puede conducir a una mejor selección del tratamiento óptimo de inmunoterapia y una mejor evaluación del riesgo de diferentes alergias alimentarias.

Otro uso de los componentes alérgenos es usarlos para mejorar la sensibilidad diagnóstica de un extracto al potenciar el extracto con un componente. Esto puede ser particularmente importante en inmunoensayos

miniaturizados o que no son de laboratorio, tales como una micromatriz de alérgenos o una prueba en el consultorio del médico donde la combinación de condiciones de ensayo menos favorables, menor capacidad de unión de anticuerpos para el reactivo del alérgeno y potencia limitada del extracto natural del alérgeno, puede causar insuficiente sensibilidad diagnóstica.

- 5 En conclusión, es de gran importancia identificar y caracterizar todas las proteínas alergénicas importantes en cada fuente de alérgenos.

El tratamiento de la alergia suele reducir los síntomas de la alergia mediante, por ejemplo, antihistamínicos, pero puede realizarse un tratamiento curativo de la alergia a más largo plazo con inmunoterapia específica. Aplicación del extracto alergénico causante de la enfermedad, más comúnmente por vía subcutánea o sublingual, que provoca una activación específica de una respuesta inmune protectora a las proteínas alergénicas. Aunque los mecanismos exactos no se conocen por completo, una activación tan específica del sistema inmunitario alivia los síntomas de la alergia tras la exposición ambiental posterior del mismo alérgeno (Akdis y Akdis 2007). Un desarrollo posterior de la inmunoterapia regular ha sido el uso de una o varias proteínas alergénicas purificadas en lugar de un extracto natural crudo. Tal inmunoterapia se ha realizado con éxito en pacientes alérgicos al polen de gramíneas (Jutel, Jaeger y otros, 2005) (Cromwell, Fiebig y otros, 2006) (Saarne, Kaiser y otros, 2005) y, además, se ha sugerido para el tratamiento de la alergia contra la caspa de animales. (Valenta, Lidholm y otros, 1999; Gronlund, Saarne y otros, 2009).

En los últimos años se ha prestado una creciente atención a los anticuerpos IgG específicos de alérgenos. Estos pueden modular el efecto de los anticuerpos IgE, ya sea directamente al actuar como anticuerpos bloqueadores sobre el alérgeno o indirectamente al actuar a través de los receptores Fc (Akdis y Akdis 2007; Uermosi, Beerli y otros, 2010; Uermosi, Zabel y otros, 2014).

Así, evaluar tanto la IgE específica como la respuesta de IgG específica a un alérgeno puede ser más relevante clínicamente que medir la respuesta de IgE sola (Custovic, Soderstrom y otros, 2011; Caubet, Bencharitiwong y otros, 2012; Du Toit, Roberts y otros, 2015). Se sabe que la inmunoterapia induce una respuesta IgG específica que consiste principalmente en la subclase IgG4. Dado que esta respuesta de anticuerpos es parte del mecanismo para una inmunoterapia exitosa (Uermosi, Beerli y otros, 2010; Uermosi, Zabel y otros, 2014), el análisis de anticuerpos IgG específicos de alérgenos puede ser una vía para monitorear la eficacia del tratamiento.

En conclusión, la medición de los niveles de IgG específicos de alérgenos puede reflejar la tolerancia natural o inducida al alérgeno a través de la exposición ambiental o el tratamiento de inmunoterapia y puede, en combinación con los niveles de IgE, aumentar la relevancia clínica de una prueba diagnóstica.

La caspa de caballo es una causa cada vez más común de alergia respiratoria (Liccardi, D'Amato y otros, 2011), con síntomas que incluyen rinitis, conjuntivitis, inflamación bronquial y asma. La exposición ocupacional a los alérgenos de los caballos es un factor de riesgo significativo para la sensibilización alérgica (Tutluoglu, Atis y otros, 2002) pero además, pueden detectarse concentraciones considerables de alérgenos en otros lugares tales como las escuelas (Kim, Elfman y otros, 2005). En un estudio, se demostró que la sensibilización a la caspa de caballo por IgE estaba asociada con un alto riesgo de desarrollar asma (Ronmark, Perzanowski y otros, 2003).

Los extractos de pelo y caspa de caballo contienen una complejidad de proteínas alergénicas y hasta ahora se han identificado cuatro alérgenos de caballo: Equ c 1, Equ c 2, Equ c 3 y Equ c 4. Los dos primeros pertenecen a la familia de las proteínas lipocalinas y se han purificado a partir de su fuente natural (Dandeu, Rabillon y otros, 1993; Goubran Botros, Rabillon y otros, 1998) mientras que solo Equ c 1 se ha expresado como proteína recombinante (Gregoire, Rosinski-Chupin y otros, 1996). La secuencia de aminoácidos de Equ c 1 es un 67 % similar a la del alérgeno de gato Fel d 4 (Smith, Butler y otros, 2004). Equ c 3, albúmina de suero de caballo, es una proteína relativamente conservada que muestra una amplia reactividad cruzada con otras albúminas de mamíferos (Goubran Botros, Gregoire y otros, 1996). Equ c 4, se purificó primero (Goubran Botros, Rabillon y otros, 1998; Goubran Botros, Poncet y otros, 2001) y solo más tarde se identificó como laterina de sudor de caballo (McDonald, Fleming y otros, 2009). Recientemente, se ha caracterizado un nuevo alérgeno de caballo de la subfamilia C-D de la familia de proteínas secretoglobina (Equ c 15k, WO2011/133105).

Se afirma que Equ c 1 es el más importante de los alérgenos de caballo conocidos (Dandeu, Rabillon y otros, 1993) y el reconocimiento de anticuerpos IgE de la proteína recombinante estuvo presente en el 76 % de una población estudiada de sujetos alérgicos a caballos (Saarelainen, Rytönen -Nissinen y otros, 2008). En otro estudio que usó alérgenos nativos purificados, solo el 33 % de los pacientes alérgicos a los caballos se sensibilizaron a Equ c 2 y el 23 % a Equ c 4 (Goubran Botros, Rabillon y otros, 1998). La frecuencia de la unión de IgE a la albúmina sérica de caballo se ha abordado en varios estudios que demuestran reactividad hasta en el 40 % de los sujetos alérgicos a los caballos (Spitzauer y otros, 1993; Cabañas y otros, 2000). Sin embargo, como la sensibilización a las albúminas séricas suele ir acompañada de concentraciones más altas de anticuerpos IgE frente a otros componentes alérgenos, su relevancia clínica específica es incierta (Spitzauer, Schweiger y otros, 1993; Cabañas, López-Serrano y otros, 2000). Un estudio reciente confirmó la prevalencia relativa de estos componentes alérgenos del caballo y demostró una prevalencia del 48 % en los pacientes alérgicos a los caballos que tienen reactividad de IgE a Equ c 15k. (WO2011/133105).

Resumen de la invención

Mediante el uso de sueros que no eran reactivos a ninguno de los componentes alérgenos conocidos de caballo, se purificó un nuevo alérgeno de caballo y se identificó como secretoglobina. La secuencia se identificó parcialmente mediante el uso de secuenciación N-terminal y MALDI TOF MS. La secuencia de aminoácidos completa se verificó mediante 3'RACE y se produjo una proteína recombinante de cadena sencilla en *E. Coli*, que tenía una reactividad IgE similar a la de la proteína natural purificada. Además, se describe el uso del alérgeno en el diagnóstico y la terapia, así como un kit de diagnóstico y una composición farmacéutica que contiene el alérgeno.

En un primer aspecto, la invención se refiere a una proteína heterodimérica aislada que tiene una primera cadena peptídica y una segunda cadena peptídica que juntas tienen una identidad de secuencia general de al menos 70 %, tal como 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 98 %, con las secuencias combinadas de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una proteína monocatenaria que tiene una identidad de secuencia global de al menos 70 %, tal como 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 %, con las secuencias combinadas de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un fragmento de una proteína de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores que comprende al menos un epítipo de anticuerpo IgE de una proteína heterodimérica que tiene una primera cadena peptídica que tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 3 y una segunda cadena peptídica que tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 4.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una proteína o fragmento de proteína de acuerdo con los aspectos anteriores, que se ha inmovilizado en un soporte sólido o soluble. Los soportes adecuados para la inmovilización de proteínas y péptidos se conocen bien en la técnica, y la presente invención abarca en este aspecto cualquier soporte que no afecte negativamente en un grado sustancial las propiedades inmunogénicas de la proteína o fragmento de proteína. En este contexto, se entiende que el término "inmovilizado" puede ser cualquier tipo de accesorio adecuado para un soporte específico. En una modalidad, la proteína o el fragmento de proteína de acuerdo con la invención se ha inmovilizado en un soporte sólido adecuado para su uso en un método diagnóstico, como ImmunoCAP, EliA o VareliA. En una modalidad alternativa, la proteína o fragmento de proteína de acuerdo con la invención se ha inmovilizado en una estructura polimérica natural o sintética en solución, tal como una o más estructuras dendroméricas en solución.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una proteína o fragmento de proteína de acuerdo con los aspectos anteriores, que se ha provisto de un marcador o un elemento de marcaje. Así, en una modalidad, la invención es una proteína o fragmento de proteína de acuerdo con la invención que se ha provisto de un marcador luminiscente, tal como un marcador fotoluminiscente tal como un marcador fluorescente o fosforescente, un marcador quimioluminiscente o un marcador radioluminiscente. En una modalidad alternativa, la proteína o fragmento de proteína de acuerdo con la invención se ha derivatizado con un elemento que puede identificarse, tal como una función de afinidad. Las funciones de afinidad para el marcaje de proteínas y péptidos se conocen bien en la técnica y el experto en la técnica será capaz de elegir cualquier función adecuada, tal como biotina.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína o fragmento de proteína de acuerdo con los aspectos anteriores, así como a un vector que comprende la molécula de ácido nucleico, una célula huésped que comprende el vector y un método para la producción recombinante de una proteína o fragmento de proteína de acuerdo con los aspectos anteriores, que comprende cultivar la célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para la evaluación *in vitro* de la alergia tipo 1 que comprende las etapas de

- poner en contacto una muestra de fluido corporal que contiene inmunoglobulina de un paciente sospechoso de tener alergia Tipo 1 con una proteína, cadena peptídica o fragmento de proteína de acuerdo con los aspectos anteriores; y
- detectar la presencia, en la muestra, de anticuerpos, tales como anticuerpos IgE que se unen específicamente a dicha proteína, cadena peptídica o fragmento de proteína;

en donde la presencia de anticuerpos tales como anticuerpos IgE es informativa de una alergia Tipo 1 en dicho paciente.

En una modalidad, el método de acuerdo con la invención comprende detectar la presencia de anticuerpos IgE y/o IgG que se unen específicamente a dicha proteína, cadena peptídica o fragmento de proteína. En otra(s) modalidad(es), la presente invención usa otros isotipos o isotipos adicionales de anticuerpos tales como IgA; IgD; y/o IgM. En esta modalidad, la presencia de anticuerpos IgE específicos es indicativa de una alergia Tipo 1 al caballo en dicho paciente y el nivel de anticuerpos IgG específicos es informativo con respecto a la tolerancia natural o inducida al caballo a través de exposición ambiental o tratamiento de inmunoterapia.

En una modalidad, este método de acuerdo con este aspecto comprende además las etapas de

- poner en contacto la muestra de fluido corporal que contiene inmunoglobulina del paciente sospechoso de tener alergia Tipo 1 con al menos otro componente alérgeno purificado de caballo; y
- detectar la presencia, en la muestra, de anticuerpos IgE que se unen específicamente a dicho componente alérgeno purificado de caballo;

5 en donde la combinación de la presencia de anticuerpos IgE que se unen específicamente a dicha proteína, cadena peptídica o fragmento de proteína, y la ausencia de anticuerpos IgE que se unen específicamente a dicho componente alérgeno del caballo, es indicativa de una alergia Tipo 1 al gato en dicho paciente.

10 En esta modalidad, el componente alérgeno purificado adicional de caballo se selecciona preferentemente del grupo que consiste en Equ c 1, Equ c 2, Equ c 3, Equ c 4/5 y Equ c 15k nativos y recombinantes.

15 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un ensayo que usa proteínas marcadas y/o inmovilizadas y/o fragmentos de proteínas como se describe en la presente solicitud. En una modalidad, la invención es un ensayo que comprende las etapas de (i) capturar un isotipo de anticuerpo de interés sobre un soporte sólido o soluble como se discutió anteriormente; (ii) añadir una proteína o un fragmento de proteína de acuerdo con la invención; y (iii) detectar directa o indirectamente la unión de la proteína o fragmento de proteína al anticuerpo. En una modalidad, la proteína o el fragmento de proteína se han marcado con un fluoróforo, en cuyo caso la detección es una detección directa. En otra modalidad, la proteína o fragmento de proteína se ha derivatizado como se discutió anteriormente, por ejemplo, mediante un elemento conjugado con enzima tal como avidina o estreptavidina.

20 Así, la presente invención es útil en varios tipos diferentes de ensayos de IgE e IgG, tales como en un ensayo inverso en el que, por ejemplo, los anticuerpos IgE obtenidos de un sujeto sensibilizado con IgE se capturan en un soporte y se detectan mediante la unión a un alérgeno marcado, como se discutió anteriormente.

25 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit para realizar los métodos de acuerdo con los aspectos anteriores, dicho kit comprende una proteína, cadena peptídica o fragmento de proteína de acuerdo con la invención, inmovilizada sobre un soporte sólido.

30 En una modalidad de este aspecto, el soporte sólido se selecciona del grupo de nitrocelulosa, vidrio, silicio y plástico y/o es un chip de micromatriz.

35 En una modalidad de este aspecto, el kit comprende, además, un agente de detección capaz de unirse a anticuerpos, tales como anticuerpos IgE y/o anticuerpos IgG unidos a la proteína inmovilizada, cadena peptídica o fragmento de proteína. Dichos agentes detectores pueden ser, por ejemplo, anticuerpos anti-IgE marcados con marcadores detectables, tales como colorantes, fluoróforos o enzimas, como se conoce en la técnica de los inmunoensayos.

40 Los aspectos de la invención incluyen, además, proteínas o fragmentos de proteínas de acuerdo con los aspectos anteriores para su uso en métodos de terapia o diagnóstico practicados en el cuerpo humano o animal, tales como terapia o diagnóstico de alergia Tipo 1 practicada en el cuerpo humano o animal, y métodos para el tratamiento de la alergia Tipo 1, que comprenden administrar, a un individuo susceptible a dicho tratamiento, una proteína, cadena peptídica o fragmento de proteína de acuerdo con los aspectos anteriores.

45 Definiciones

Debe interpretarse que los términos "proteína" y "péptido" tienen su significado habitual en la técnica. Los términos se usan indistintamente en la presente descripción, si no se indica de otra manera.

50 La "longitud" de una proteína es el número de residuos de aminoácidos en la proteína.

55 Un "fragmento" de una proteína debe interpretarse como un fragmento de proteína que consta al menos de 10 aminoácidos, o que tiene una longitud de al menos el 10 % de la longitud de la proteína original. Los fragmentos incluyen fragmentos de proteínas con una longitud de al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % y 90 % de la longitud total de la proteína original.

60 Una "variante" de una proteína se refiere a una variante de una proteína original que tiene una identidad de secuencia con dicha proteína original de al menos el 70 %, preferentemente más del 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 %, calculado sobre toda la longitud de la variante de proteína. Varias herramientas de software para alinear una proteína original y una variante y calcular la identidad de secuencia están disponibles comercialmente, tales como Clustal Omega proporcionada por el Instituto Europeo de Bioinformática (Cambridge, Reino Unido). Las variantes de proteínas pueden tener una longitud de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 100 %, 105 % o 110 % de la proteína original. Así, las variantes de proteínas pueden comprender aminoácidos adicionales como resultado de su producción, tales como una etiqueta de hexahistidina, secuencias enlazadoras o aminoácidos derivados de vectores. Con el fin de ser una "variante" de una proteína alérgica original, la variante de proteína también debe comprender preferentemente al menos un epítipo de anticuerpo IgE de la proteína

alergénica original, es decir, unir anticuerpos IgE de una muestra de suero de un paciente representativo sensibilizado a la proteína alergénica original. Puede analizarse si una variante de una proteína alergénica original comprende un epítipo de anticuerpo IgE de la proteína alergénica original mediante el uso del ensayo de inhibición descrito en el Ejemplo 10. Las variantes que comprenden un epítipo de unión a IgE del epítipo de unión a IgE original son aquellas moléculas que provocan una "inhibición significativa" de la unión a la proteína original que deben interpretarse como aquellas moléculas que pueden inhibir la unión en al menos 10 %, 20 %, 30 % 40 % o 50 % en comparación con la inhibición por tampón solo (diluyente de IgE, Thermo Fisher Scientific). Preferentemente, la variante se une a los anticuerpos IgE sustancialmente al mismo nivel que la proteína alergénica original. Los niveles de unión pueden medirse al inmovilizar la variante o fragmento en una fase sólida y medir la reactividad de IgE de sueros individuales como se describe en el Ejemplo 8. A los efectos de esta definición, "sustancialmente el mismo nivel" debe interpretarse que significa que el nivel de unión de la variante difiere del nivel de unión de la proteína original como máximo en 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %.

Una "proteína heterodimérica" se refiere a una proteína que en su forma nativa comprende dos cadenas de proteínas con diferentes secuencias de aminoácidos, unidas entre sí por enlaces covalentes o no covalentes. Las unidades de monómero, es decir, las cadenas de proteínas, pueden estar codificadas por un gen o genes separados en el organismo de origen.

La "identidad de secuencia" se refiere al grado en que dos secuencias (de nucleótidos o de aminoácidos) tienen los mismos residuos en las mismas posiciones en una alineación, expresada como porcentaje. "Alineación" en este sentido se refiere al proceso o resultado de emparejar los residuos de nucleótidos o de aminoácidos de dos o más secuencias biológicas para lograr niveles máximos de identidad y, en el caso de secuencias de aminoácidos, la conservación, con el fin de evaluar el grado de similitud y la posibilidad de homología. En el caso de una proteína heterodimérica, las secuencias de aminoácidos de las respectivas cadenas, o las secuencias de ácido nucleico que las codifican, pueden concatenarse y usarse en el alineamiento con el fin de determinar una identidad de secuencia "global". Ver además, Fassler y Cooper, "BLAST Glossary", en BLAST® Help, Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (EE.UU.); 2008-.

El término "vector" se refiere a una molécula de ADN usada como vehículo para transportar artificialmente material genético extraño a otra célula, donde puede replicarse y/o expresarse.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el fraccionamiento de las proteínas de la caspa de caballo mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) donde la absorbancia A_{280} se indica con una línea continua y la conductividad se indica con una línea rayada. Las flechas indican la posición de las fracciones que se analizaron para determinar la reactividad de IgE. Las barras verticales indican la mezcla que contiene la fracción activa que se sometió a purificación adicional.

La Figura 2 muestra la segunda etapa de purificación del componente desconocido de caspa de caballo por cromatografía de interacción hidrófoba donde la absorbancia A_{280} se indica con una línea continua y el porcentaje de tampón Tris pH 8,0 en la bomba B (% B) se indica con una línea rayada. Las flechas indican la posición de las fracciones que se analizaron para determinar la reactividad de IgE. Las barras verticales indican la mezcla que contiene la fracción activa que se sometió a purificación adicional.

La Figura 3 muestra la tercera etapa de purificación del componente desconocido de caspa de caballo por cromatografía de intercambio aniónico donde la absorbancia A_{280} se indica con una línea continua y la conductividad se indica con una línea rayada. Las flechas indican la posición de las fracciones que se analizaron para determinar la reactividad de IgE. Las barras horizontales indican las mezclas que se probaron adicionalmente, de los cuales uno contenía la fracción activa que se sometió a una purificación adicional.

La Figura 4 muestra la cuarta etapa de purificación del componente desconocido de caspa de caballo mediante cromatografía de fase inversa, donde la absorbancia A_{280} se indica con una línea continua y el porcentaje de tampón de acetonitrilo al 90 % de TFA al 0,05 % en la bomba B (% B) se indica con una línea rayada. Las barras verticales indican la mezcla de los tres picos (etiquetados 1, 2 y 3) que cada uno se sometió a análisis SDS PAGE y se probó para reactividad IgE.

La Figura 5 muestra el análisis SDS-PAGE de muestras reducidas y no reducidas de los tres picos de la etapa de purificación RPC. El carril M contiene proteínas marcadoras de peso molecular con los pesos moleculares indicados a la izquierda.

La Figura 6 muestra la secuencia postuladas de nucleótidos (a) y aminoácidos (b) de la cadena 1 de longitud completa de la proteína Equ c s. En (c) se muestra la alineación de aminoácidos con la molécula homóloga Fel d 1 cadena 1 de gato.

La Figura 7 muestra la secuencia postulada de nucleótidos (a) y aminoácidos (b) de la cadena 2 de longitud completa de la proteína Equ c s. En (c) se muestra la alineación de aminoácidos con la molécula homóloga Fel d 1 cadena 2 de gato.

5 La Figura 8 muestra la etapa de purificación RPC de una mezcla de cromatografía de intercambio aniónico, realizada mediante el uso de un gradiente más pronunciado con el fin de aumentar la concentración de proteína en las fracciones. Las barras verticales indican las fracciones D4 y D5 que se sometieron a análisis MS/MS en solución de digestión.

10 La Figura 9 muestra la purificación de Equ c s recombinantes por IMAC (a) donde la absorbancia A_{280} se indica con una línea continua y la conductividad se indica con una línea rayada. El gradiente de elución de imidazol varía entre 800 y 1200 mL. Las flechas indican el pico que se mezcló y se sometió a cromatografía de intercambio aniónico (b). Las flechas indican los picos 1 y 2 y las barras verticales indican los límites de estas mezclas.

15 La Figura 10 muestra un análisis de filtración en gel analítico de Equ c s ab recombinante, donde la absorbancia A_{280} se indica mediante una línea continua y la conductividad mediante una línea rayada. En (a) se muestra el análisis de rEqu c s ab, el pico 1 de AIEC, y en (b) rEqu c s ab, pico 2 de AIEC. En (c) se muestra el análisis SDS PAGE de Equ c s ab recombinante del pico 1 y del pico 2 de AIEC tanto en condiciones reductoras como no reductoras.

20 La Figura 11 muestra la correlación entre la reactividad de IgE de Equ c s nativo y recombinante en 35 sujetos sensibilizados con caspa de caballo. Los niveles de 0,35 kU_A/L y 0,1 kU_A/L se indican mediante líneas de puntos.

25 La Figura 12 muestra los niveles de anticuerpos IgE contra el extracto de caspa de caballo (HDE), Equ c 1, nEqu c 2, nEqu c 3, nEqu c 4, rEqu c 15k y rEqu c s en una cohorte de 25 sujetos alérgicos a la caspa de caballo. El número de observaciones por debajo de 0,1 kU_A/L se indica entre paréntesis para cada componente. La línea de puntos indica el nivel de 0,35 kU_A/L y la línea continua indica el nivel de 0,1 kU_A/L. Las barras horizontales indican los niveles medios de IgE.

30 La Figura 13 compara la unión del anticuerpo IgE a rEqu c s y rFel d 1 en una cohorte de sujetos sensibilizados con caspa de caballo. Los niveles de 0,35 kU_A/L y 0,1 kU_A/L se indican mediante líneas de puntos.

Listado de secuencias

Las siguientes secuencias se enumeran en la lista de secuencias.

35

SEQ ID NO:	Descripción
1	secuencia de aminoácidos de la cadena de 5 kDa de Equ c s, incluido el péptido señal
2	secuencia de aminoácidos predicha de la cadena de 10 kDa de Equ c s, incluido el péptido señal
3	secuencia de aminoácidos predicha de la cadena de 5 kDa de Equ c s
4	secuencia de aminoácidos predicha de la cadena de 10 kDa de Equ c s
5	secuencia de aminoácidos para la proteína recombinante completa rEqu c s ab
6	secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante completa rEqu c s ab
7	secuencia de aminoácidos para la proteína recombinante alternativa rEqu c s ba
8	secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante alternativa rEqu c s ba
9	Molécula de ácido nucleico con codones optimizados que codifica la cadena 1
10	Molécula de ácido nucleico con codones optimizados que codifica la cadena 2
11	Cebador directo para cadena 1, PCR 1
12	Cebador directo para cadena 2, PCR 1
13	Cebador directo para cadena 1, PCR 2
14	Cebador directo para cadena 2, PCR 2
15	Cebador inverso para cadena 1, PCR 2
16	Cebador inverso para cadena 2, PCR 2
17-33	Fragmentos de péptidos descritos en la Tabla 7
34-43	Fragmentos de péptidos descritos en la Tabla 8
44	Secuencia doble dada por análisis de secuenciación N-terminal por degradación de Edman del pico 2 de RPC
45	La secuencia de ADN completa de la secuencia postulada denotó Equ c s, cadena 1
46	La secuencia de ADN completa de la secuencia postulada denotó Equ c s, cadena 2
47	Fel d 1 cadena 1
48	Fel d 1 cadena 2

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un alérgeno aislado de caballo, denominado Equ c s en la presente descripción, que pertenece a la familia de la secretoglobina, que muestra una movilidad electroforética (peso molecular aparente) correspondiente a aproximadamente 18 kDa en condiciones no reductoras, y que comprende una primera cadena peptídica que tiene un peso molecular del orden de 5 kDa y una segunda cadena peptídica que tiene un peso molecular del orden de 10 kDa, enlazadas entre sí por uno o más enlaces disulfuro. Este aspecto de la invención comprende, además, variantes y fragmentos de Equ c s con cierta identidad de secuencia con Equ c s nativos, como se definió anteriormente, y que comprenden, preferentemente, al menos un epítipo de anticuerpo IgE de Equ c s nativo. Tales variantes y fragmentos tienen preferentemente reactividad de IgE a sueros reactivos de Equ c s y al menos el 10 % de la unión de IgE a la molécula de rEqu c s original puede inhibirse mediante tal variante o fragmento, como se determinó mediante el ensayo descrito en el Ejemplo 10. Además, en los otros aspectos de la invención descritos más abajo, el término "Equ c s" se usa, por simplicidad, para incluir además, tales variantes y fragmentos de las mismas.

En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el alérgeno de acuerdo con el aspecto mencionado en primer lugar, así como también a un vector que contiene la molécula de ácido nucleico y a una célula huésped que contiene el vector. Las proteínas o péptidos recombinantes producidos por dicha célula huésped que contiene un vector pueden glicosilarse o no en dependencia de la célula huésped que se usa.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método *in vitro* para la evaluación de una alergia de Tipo I en un paciente, en donde una muestra de fluido corporal, como una muestra de sangre o suero del paciente, se pone en

contacto con Equ c s o una composición de acuerdo con el aspecto anterior, por lo cual puede determinarse si la muestra del paciente contiene o no anticuerpos IgE que se unen específicamente a Equ c s. Tal método puede llevarse a cabo de cualquier manera conocida en la técnica. Las Equ c s pueden, por ejemplo, inmovilizarse sobre un soporte sólido, tales como en un inmunoensayo de laboratorio convencional, en una micromatriz o en un ensayo de flujo lateral, o usarse como un reactivo en fase fluida.

En otro aspecto más, la invención se refiere a un método *in vitro* para la evaluación de una alergia Tipo I en un paciente, en donde una muestra de fluido corporal, como una muestra de sangre o suero del paciente, se pone en contacto con Equ c s, por lo cual puede determinarse si la muestra del paciente contiene o no anticuerpos IgE que se unen específicamente a Equ c s pero no a otros componentes alérgenos de caballo, tales como Equ c 1, Equ c 2, Equ c 3, Equ c 4/5 o Equ c 15k. Es probable que un paciente que muestre reactividad de IgE frente a Equ c s, pero no frente a otros componentes alérgenos de caballo, esté principalmente sensibilizado a los gatos y no a los caballos.

En los aspectos mencionados anteriormente, la molécula de Equ c s de tipo silvestre puede, como se mencionó anteriormente, reemplazarse con fragmentos o variantes de Equ c s, naturales o artificiales, que comprenden epítopos de anticuerpos IgE de la proteína de tipo silvestre.

La invención se refiere, además, a un método de tratamiento de la alergia Tipo I que comprende administrar a un paciente que necesite dicho tratamiento Equ c s o Equ c s modificado, como se explica más abajo. Este aspecto de la invención se refiere, además, al uso de Equ c s en tal inmunoterapia, que incluye, por ejemplo, inmunoterapia resuelta por componentes (Valenta y Niederberger 2007). En una modalidad de este aspecto, las Equ c s pueden usarse en su forma natural o en una forma recombinante que muestre propiedades bioquímicas e inmunológicas similares a las de la molécula natural. En otra modalidad, las Equ c s pueden usarse en una forma modificada, generada química o genéticamente, con el fin de derogar o atenuar su capacidad de unión a anticuerpos IgE, mientras preferentemente son capaces de provocar una respuesta IgG en un individuo tratado. Los ejemplos de modificaciones incluyen, pero no se limitan a, fragmentación, truncamiento, tandemización o agregación de la molécula, delección de segmento(s) interno(s), sustitución de residuo(s) de aminoácidos, reordenamiento de dominio o interrupción al menos en parte de la estructura terciaria por ruptura de puentes disulfuro o su unión a otra estructura macromolecular u otros compuestos de bajo peso molecular. En otra modalidad más de este aspecto, las subunidades individuales de 10 kDa y/o 5 kDa de Equ c s se usan como Equ c s modificadas.

En todos los aspectos de la invención mencionados anteriormente, la proteína Equ c s puede purificarse a partir de su fuente natural del caballo, tal como orina, saliva u otros fluidos corporales, o de tejido, tal como pelo o caspa. Además, puede, como se mencionó anteriormente, producirse mediante tecnología de ADN recombinante o sintetizarse químicamente mediante métodos conocidos por un experto en la técnica o descritos en la presente solicitud.

La proteína alergénica de caballo descrita aquí, Equ c s, pertenece a la familia de proteínas secretoglobinas, específicamente una subfamilia que comprende proteínas tetraméricas formadas por dos subunidades heterodiméricas. El heterodímero consta de dos cadenas derivadas de diferentes genes enlazados entre sí por puentes disulfuro (Klug y otros, 2000). La secretoglobina de caballo descrita aquí es un heterodímero de 18±2 kDa, en la presente descripción denominado Equ c s, que consta de una subunidad de 5±2 kDa y una de 10±2 kDa, respectivamente, que para los propósitos de esta invención se denominan como las subunidades de 5 y de 10 kDa, respectivamente. Las asignaciones de peso molecular están de acuerdo con su peso molecular aparente como se observa en SDS-PAGE, como se describe en el Ejemplo 3 más abajo. Se entiende que los pesos moleculares aparentes variarán en dependencia de las condiciones de separación, incluido el medio de separación electroforético y la concentración del mismo, el tampón lineal o de gradiente que se use, etc. Además, la subunidad de 10 kDa contiene un sitio de N-glicosilación, cuya ocupación por una estructura de glicano puede afectar el peso molecular aparente.

La secuencia de aminoácidos de la cadena de 5 kDa tiene la secuencia de aminoácidos predicha

DICPAVKEDV NIFLTGTPDD YVKKVSQYQR NPVILANAÆK LKNCIDKKLT AEDKENALSV	60
LEKIYSSDFC	70

(SEQ ID NO: 3) y un peso molecular teórico de 7,9 kDa.

La secuencia de aminoácidos de la cadena de 10 kDa tiene la secuencia de aminoácidos predicha

CPSFYAVLGV LSLGSKTLLD TSLNLVNATE PEKVAMGKIQ DCYNEAGVIT KISDLIIMGT	60
ITTSPECISH ALSTLTDDVQ EGISKLNPLG R	91

(SEQ ID NO: 4) y un peso molecular teórico de 9,6 kDa.

Cabe señalar que se han descrito proteínas estructuralmente relacionadas en una amplia gama de especies de mamíferos, pero solo se han definido dos proteínas como alérgenos, el alérgeno felino principal Fel d 1 (Acc No. P30438 y P30440) y Equ c 15k (WO2011/133105).

Aunque los alérgenos de la caspa de caballo Equ c 1, Equ c 2, Equ c 3, Equ c 4/5 y Equ c 15k cubren la mayor parte de la reactividad de IgE al extracto de caspa de caballo observada en pacientes alérgicos a los caballos, nosotros hemos encontrado varios casos de individuos con alergia a los gatos que demuestran reactividad de IgE al extracto de caspa de caballo sin reactividad concomitante a ninguno de los cinco componentes alérgenos conocidos de caballo. Esta invención describe la identificación y caracterización del alérgeno de caballo responsable de esta reactividad desconocida de IgE al extracto de caspa de caballo que conduce al descubrimiento de una proteína homóloga al alérgeno de gato Fel d 1.

En una colección de sueros de sujetos sensibilizados con gatos, se pudo caracterizar una serie de sueros que tenían reactividad al extracto de caspa de caballo, mientras que no se pudo detectar reactividad a ninguno de los alérgenos conocidos de caspa de caballo. Mediante el uso de los sueros descritos anteriormente, la unión de IgE al extracto de caspa de caballo podría inhibirse mediante Fel d 1 recombinante, lo que indica que la reactividad de IgE se dirige a una proteína de caballo que es inmunológicamente similar a Fel d 1.

Con la ayuda de estos sueros, pudo purificarse un nuevo alérgeno principal a partir de la caspa de caballo e identificarlo como miembro de la familia de proteínas secretoglobinas. La nueva proteína de caballo, denominada en la presente descripción Equ c s, consta de una cadena de aminoácidos de 5 kDa y una cadena de aminoácidos de 10/11 kDa unidas por puentes disulfuro. Teniendo en cuenta el hecho de que las dos cadenas polipeptídicas están codificadas por genes separados, este estudio demuestra la presencia de una proteína heterodimérica que no se había anticipado previamente mediante estudios bioinformáticos del genoma del caballo. Es distinta de los alérgenos de caballo previamente conocidos. Este alérgeno representa una adición importante al panel de alérgenos equinos conocidos y será útil en el diagnóstico de alergia equina. Dado que se trata de un alérgeno que presenta una reacción cruzada con el alérgeno principal del gato Fel d 1, la reactividad de IgE a esta molécula puede reflejar una sensibilización de reacción cruzada a la caspa de caballo que puede estar asociada o no a síntomas clínicos.

Los ejemplos siguientes ilustran la presente invención con el aislamiento y uso de la secretoglobina denominada Equ c s de caballo. Los ejemplos son solo ilustrativos y no deben considerarse como limitantes de la invención, que está definida por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Identificación de sueros que detectan un componente alérgeno desconocido en el extracto de caspa de caballo que es similar a Fel d 1

Se usaron el extracto de caspa de caballo, el extracto de caspa de gato y las pruebas ImmunoCAP regulares Fel d 1. Se produjeron ensayos experimentales de ImmunoCAP mediante el uso de Equ c 1 y Equ c 15k recombinantes, así como también Equ c 2 y Equ c 4 purificados a partir de caspa de caballo y Equ c 3 purificado a partir de suero de caballo, esencialmente como se describe en la patente núm. WO2011/133105).

Se examinó una colección de sueros que tenían un alto nivel de sensibilización al extracto de caspa de gato para determinar la reactividad de IgE a componentes de caspa de gato y de caballo. Los cinco sueros identificados aquí se caracterizaron por una alta reactividad de IgE al extracto de caspa de gato, Fel d 1 y extracto de caspa de caballo sin reactividad concomitante a ninguno de los cinco componentes alérgenos de caballo conocidos (tabla 1). Así, estos sueros detectaron un componente alérgeno desconocido en el extracto de caspa de caballo.

Los sueros seleccionados se usaron en pruebas de inhibición mediante el uso de extracto de caspa de caballo y extracto de caspa de gato como fase sólida (tabla 2). Como inhibidores recombinantes se usaron Equ c 15k, Fel d 1 y Fel d 7 respectivamente a una concentración final de 100 mg/ml. Como tampón de control de inhibición, se usó tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4, que contenía albúmina de suero humano al 0,3 %. Se calcularon las medias de las determinaciones por duplicado de cada inhibición y se calculó la fracción de inhibición como la fracción de la unión mediante el uso de tampón de control de inhibición que podía inactivarse con cada inhibidor. En estos sueros seleccionados, la unión al extracto de caspa de gato podría inhibirse casi completamente por Fel d 1 (tabla 2a). Ninguno de los otros inhibidores probados mostró inhibición. Esto demuestra que la unión de IgE al extracto de caspa de gato está dominada por la reactividad a Fel d 1. Asimismo, la unión a la fase sólida del extracto de caspa de caballo (tabla 2b) podría inhibirse completamente por rFel d 1 pero no por los otros inhibidores. Esto demostró que la unión de estos sueros al extracto de caspa de caballo se dirige a un componente de caspa de caballo que es inmunológicamente similar al alérgeno de gato Fel d 1. Aunque Equ c 15k pertenece a la familia de las secretoglobinas, esta proteína no demostró ninguna inhibición de la unión al extracto de caspa de caballo, lo que indica que el componente de caballo buscado no es Equ c 15k. Esto puede explicarse por el hecho de que las dos proteínas pertenecen a diferentes subfamilias de secretoglobinas, Fel d 1 pertenece a la subfamilia B-E y Equ c 15k pertenece a la subfamilia C-D (Laukaitis y Karn 2005), WO2011/133105

Ejemplo 2: Purificación de un componente alérgeno de la caspa de caballo, homólogo al alérgeno de gato Fel d 1

Mediante el uso de los sueros descritos en el ejemplo 1, pudo detectarse un componente alérgeno desconocido, similar a Fel d 1, en el extracto de caspa de caballo y mediante el fraccionamiento del extracto de caspa de caballo

por procedimientos cromatográficos e inmovilización de estas fracciones en una fase sólida ImmunoCAP, el componente desconocido pudo seguirse durante varias etapas cromatográficas.

Cromatografía de exclusión por tamaño

Se extrajo caspa de caballo (Allergon, Valinge, Suecia) en MOPS 20 mM, pH 7,6, NaCl 0,15 M (MBS = solución salina tamponada con MOPS), se clarificó por centrifugación y se filtró a través de un filtro de éster de celulosa mixto de 0,45 μ m (Millipore, Billerica, MA, EE.UU). Como primera etapa de purificación, el extracto clarificado se aplicó a una columna Superdex™ 75 (XK26/100, V_t = 505 mL, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) para cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y se realizó la elución con MBS a una velocidad de flujo de 2 mL/min. El cromatograma se muestra en la Figura 1 en la cual seis fracciones, indicadas por flechas, se inmovilizaron en fase sólida como se describió anteriormente (Marknell DeWitt, Niederberger y otros, 2002). La unión de IgE mediante el uso de los sueros descritos anteriormente a las fracciones inmovilizadas se muestra en la tabla 3 que indica que las fracciones probadas 18, 22 y 26 contienen las cantidades más altas del componente alérgeno desconocido. Las fracciones 16-27 (indicadas con barras verticales en la Figura 1) se mezclaron y se sometieron a cromatografía de interacción hidrófoba.

Cromatografía de interacción hidrófoba

La mezcla de SEC se ajustó a NH_4SO_4 1 M y se aplicó a una columna Phenyl Sepharose™ HP (HR10/10, V_t = 8,0 ml, GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con NH_4SO_4 1 M en Tris 20 mM pH 8,0. La elución se realizó en un gradiente lineal de NH_4SO_4 de 1 M a NH_4SO_4 0 M (indicado como 50 % -100 % B en el cromatograma de la figura 2 entre los volúmenes de elución de 140 a 260 ml). Con el fin de eluir proteínas fuertemente unidas, se lavó la bomba A y se cambió el tampón a isopropanol al 30 % en Tris 20 mM pH 8,0. A continuación, se usó un gradiente de isopropanol de 0-30 % de isopropanol para eluir la proteína restante en la columna (indicado como un gradiente de 100 % -0 % de B en el cromatograma entre los volúmenes de elución 285 y 325 mL). Siete picos, indicados en el cromatograma, se diluyeron 1:2 en el tampón de acoplamiento (NaHCO_3 , 0,1 M pH 8,0), se inmovilizaron en fase sólida ImmunoCAP y se probaron para reactividad IgE mediante el uso de los sueros detectores descritos anteriormente (tabla 4). La mayor reactividad de IgE se obtuvo en el gradiente de lavado de isopropanol en la fracción 60. Las fracciones 58-66 se mezclaron y se sometieron a cromatografía de intercambio aniónico.

Cromatografía de intercambio aniónico

El grupo de HIC se acondicionó mediante la adición de la mitad del volumen de la mezcla de Tris pH 8,5 a la mezcla de HIC. La mezcla se aplicó posteriormente a una columna de intercambio aniónico Source™ 15Q (PE4.6/100, V_t = 1,66 ml, GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con Tris 20 mM, pH 8,5. Tras la elución en un gradiente lineal de NaCl 0-0,50 M en el mismo tampón, la proteína se resolvió en varios picos (Figura 3) de los cuales siete se inmovilizaron después de una dilución 1:4 en tampón de acoplamiento. Dado que se detectó reactividad de IgE al componente desconocido en la mayoría de las fracciones a esta dilución (tabla 5a), se combinaron tres mezclas, B4-B1, C1-C4 y C1-C11, según el patrón de bandas de proteínas en SDS PAGE y se inmovilizaron después de diluir 1:20 en tampón de acoplamiento. El análisis de IgE de las fracciones de mezclas más diluidas reveló que la actividad más alta (tabla 5b) se encontró en la primera mezcla, B4-B1, que se sometió a una etapa final de purificación cromatográfica RPC.

Cromatografía de fase inversa

La mezcla de intercambio aniónico se acondicionó mediante la adición de TFA a una concentración final de 0,065 % y se sometió a una etapa final de purificación por RPC al aplicar la muestra a una columna Source™ 15 RPC (Resource, V_t = 3,2 mL; GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con TFA al 0,065 % en agua. La elución se realizó en un gradiente lineal de 0-60 % de tampón B, que constaba de TFA al 0,05 % en acetonitrilo al 90 %. Se eluyeron tres picos cerca del final del gradiente (Figura 4) que se inmovilizaron en fase sólida y se probaron. De acuerdo con la tabla 6, los dos primeros picos contenían niveles elevados del componente desconocido, de los cuales el pico núm. 2 contenía algo más que el primer pico.

Ejemplo 3: Análisis de la fracción purificada por SDS PAGE, secuenciación N-terminal y MALDI TOF MS

El análisis SDS PAGE de las fracciones de RPC reveló un patrón similar para los dos primeros picos de RPC, una banda de 5 kDa y una banda doble a 10/11 kDa en condiciones reductoras que se unieron en una banda ancha a 18 kDa en condiciones no reductoras. Este patrón de bandas es consistente con las proteínas de la familia de las secretoglobinas que típicamente contienen dos bandas a 5 y 10 kDa en condiciones reductoras y una banda a 15-20 kDa en condiciones no reductoras. La banda más grande de las dos bandas está glicosilada y, por tanto, puede aparecer difusa o, como en este caso, aparecer como una doble banda. El análisis de secuenciación N-terminal por degradación de Edman del pico 2 de RPC, realizado esencialmente como se describe en (Mattsson, Lundgren y otros, 2009), reveló una secuencia doble que se volvió menos clara después de siete residuos:

Residuo de aminoácidos núm:	1	2	3	4	5	6	7
Primera alternativa	D	P	S	F	Y	A	V
Segunda alternativa	-	I	R	P	A	V	-

Dado que las cantidades relativas de los aminoácidos en cada ciclo eran similares, no fue posible establecer una secuencia primaria y una secundaria a partir de estos datos. La secuencia doble se muestra, además, en la lista de secuencias como en SEQ ID NO: 44.

En la digestión en gel con tripsina en manchas a partir de bandas electroforéticas en gel SDS PAGE unidimensionales de 5, 10 y 11 kDa seguido de análisis por espectrometría de masas MALDI TOF mediante el uso de un instrumento Bruker Daltonics Autoflex 2 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) seguido de un análisis de huellas de masa de peptídica (PMF) no dio como resultado coincidencias significativas con ninguna proteína conocida en la base de datos NCBI-NR, excepto por la banda de 5 kDa que coincidió con una secuencia predicha de una proteína de caballo no caracterizada (XP_005596696). Sin embargo, aunque una parte de la secuencia de este registro era homóloga a secretoglobinas, el peso molecular era demasiado alto para esta familia de moléculas y no coincidía con la banda de la que se extrajo. Se asumió que este registro previsto era defectuoso.

Ejemplo 4: Análisis bioinformático de secuencias genómicas de caballos que identifican secuencias de aminoácidos homólogas a las cadenas 1 y 2 de Fel d 1

Cadena 1

La proteína alergénica de gato Fel d 1, que era inmunológicamente similar a la proteína desconocida de la caspa de caballo, como se demostró en el ejemplo 1, consta de dos cadenas de aminoácidos, la cadena 1 y la cadena 2 (Acc No. NP_001041618 y NP_001041619 respectivamente) unidas por puentes disulfuro.

Una búsqueda TBLASTN de una base de datos del genoma del caballo (wsg) con la secuencia de Fel d 1, cadena 1 (NP_001041618) dio como resultado una coincidencia de aa 17-79 con la traducción de las posiciones de nucleótidos 77 633-77 453 (de la cadena inversa) de Acc No. AAWR02030062, un segmento de 105 199 pb de la secuencia del genoma del caballo.

Un segmento más grande que rodea esta secuencia, 90 000-70 021 de Acc No. AAWR02030062 se introdujo en el programa de búsqueda de genes FGENESH+ junto con la secuencia precursora de Fel d 1 cadena 1. El programa busca genes homólogos dentro de una secuencia genómica.

El resultado fue una secuencia postulada que consta de tres exones Acc No. AAWR02030062:

77 850 -> 77 790

77 632 -> 77 445

76 428 -> 76 399

La secuencia de ADN completa de esta secuencia postulada, denominada Equ c s, cadena 1, se muestra en la Figura 6a (SEQ ID NO: 45) que codifica 92 residuos de aminoácidos (SEQ ID NO: 1, Figura 6b), de los cuales SignalP predijo que los primeros 22 residuos formaban un péptido señal. La proteína madura deducida del ADNc clonado constaba de 70 residuos de aminoácidos, incluidas tres cisteínas, y tenía una masa molecular predicha de 7,9 kDa y un punto isoelectrónico de 4,96. Una búsqueda BLAST de homología de proteína mediante el uso de esta secuencia predicha revela una secuencia de aminoácidos con homología con secretoglobinas. La secuencia predicha tiene 67 % de identidad de aminoácidos con Fel d 1 cadena 1 (SEQ ID NO: 47) (Figura 6c).

Cadena 2

De manera similar a lo anterior, una búsqueda en TBLASTN de una base de datos del genoma del caballo (wsg) con la secuencia de Fel d 1, cadena 2 (NP_001041619) dio como resultado una coincidencia de aa 21-85 con la traducción de las posiciones de nucleótidos 82588-82782 (de la cadena delantera) de Acc No. AAWR02030062, un segmento de 105199 pb de la secuencia del genoma del caballo.

Un segmento más grande que rodea esta secuencia, 70 021-94 020 de Acc No. AAWR02030062 se introdujo en el programa de búsqueda de genes FGENESH+ junto con la secuencia precursora de Fel d 1 cadena 2. El programa busca genes homólogos dentro de una secuencia genómica.

El resultado fue una secuencia postulada incompleta que consta de dos exones del Acc No. AAWR02030062:

82 004 -> 82 064

82 589 -> 82 770

Basado en la homología con la secuencia para Fel d 1 cadena 2, falta el último exón en esta secuencia postulada. Una búsqueda BLAST de proteína que compara el exón 3 de Feld 1 cadena 2 con la secuencia genómica traducida

después del nucleótido 82770 identificó una secuencia genómica que tiene homología con el exón 3 de Feld 1 cadena 2. Este exón 3 postulado de Equ c s podría unirse en marco con los exones anteriores y contenía un codón de parada en una posición homóloga al exón 3 de Fel d 1 cadena 2. La secuencia de este exón final se encontró en: 90 025-90 127 de la secuencia genómica Acc No. AAWR02030062. La secuencia de ADN completa de esta secuencia postulada, denominada Equ c s, cadena 2, se muestra en la Figura 7a (SEQ ID NO: 46) que codifica 114 residuos de aminoácidos (SEQ ID NO: 2, Figura 7b), de los cuales SignalP predijo que los primeros 23 residuos formaban un péptido señal. La proteína madura deducida a partir del ADNc clonado constaba de 91 residuos de aminoácidos, incluidas tres cisteínas, y tenía una masa molecular predicha de 9,6 kDa y un punto isoelectrónico de 4,84. Una búsqueda BLAST de homología de proteína mediante el uso de esta secuencia predicha revela una secuencia de aminoácidos con homología con secretoglobinas. La secuencia predicha tiene un 47 % de identidad de aminoácidos con Fel d 1 cadena 2 (SEQ ID NO: 48) (Figura 7c).

Ejemplo 5: Amplificación y secuenciación por PCR de ARNm de cadena 1 y cadena 2 de Equ c s de piel de caballo

Se preparó ARN total a partir de piel de caballo mediante el uso del kit RNAqueous (Ambion, Austin, TX, EE. UU.). El ARN poliadenilado se aisló del ARN total mediante el uso del kit de purificación de ARNm y se preparó el ADNc de primera hebra mediante el uso del kit de síntesis de ADNc First-Strand (ambos de Thermo Fisher Scientific). 3 'RACE se realizó de acuerdo con Frohman (Frohman 1993), mediante el uso de un cebador oligonucleotídico directo específico de gen de la secuencia no traducida antes del codón de inicio,

5'-ATAAAAGGGCTGCAGAATTG-3' (SEQ ID NO: 11, cadena 1) y
5'-GCAGCAGAAACCCTGCCCTG-3' (SEQ ID NO: 12, cadena 2).

Se realizó una segunda PCR mediante el uso de un segundo cebador oligonucleotídico directo específico de gen de la secuencia no traducida antes del codón de inicio,

5'-GTGAGCACCTGCCACCTG-3' (SEQ ID NO: 13, cadena 1) y
5'-GAAGAGCATTCTAGCAGTTG-3' (SEQ ID NO: 14, cadena 2)

que lleva un sitio de restricción NdeI terminal para la clonación y cebadores oligonucleótidos inversos específicos,

5'-GAATCTTCTAATCAGACAC-3' (SEQ ID NO: 15, cadena 1) y
5'-GGTAGAGGAGACAGGTGTC-3' (SEQ ID NO: 16, cadena 2).

Se aislaron y secuenciaron en su totalidad cuatro clones 3 'RACE independientes para la cadena 1 y tres clones 3 'RACE independientes para la cadena 2, por lo que pudo verificarse la secuencia codificante de las cadenas postuladas de Equ c s. La secuenciación del ADN se realizó mediante el uso de Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). Los análisis y cálculos de la secuencia de aminoácidos y ADN se realizaron mediante el uso de programas del GCG Wisconsin Package (Accelrys, San Diego, CA, EE. UU.)

Ejemplo 6: Secuenciación N-terminal y análisis MALDI TOF mediante el uso de las secuencias postuladas de la cadena 1 y cadena 2 de Equ c s

La reevaluación de la secuencia de aminoácidos doble descrita en el ejemplo 3 se realizó mediante el uso de las secuencias postuladas de Equ c s. La secuencia doble ahora puede interpretarse como DICPAV (residuos 1-6 de SEQ ID NO: 3) y CPSFYAV (residuos 1-7 de SEQ ID NO: 4) que son idénticas a las secuencias N-terminales postuladas de la cadena madura 1 y cadena 2 de la proteína Equ c s.

En la digestión en gel de las bandas de 5, 10 y 11 kDa de la muestra reducida del pico 2 en la figura 5 y la banda de 18 kDa de la muestra no reducida del mismo pico se sometió a análisis de huella de masa peptídica (PMF) de MALDI TOF, esencialmente como se describe en (Mattsson, Lundgren y otros, 2009). En la banda de 5 kDa se detectaron ocho péptidos diferentes que tenían una masa que coincidía con los péptidos hipotéticos escindidos con tripsina en la secuencia postulada de la cadena 1 de Equ c s (tabla 7a). Esos péptidos cubrían el 89 % de la secuencia madura postulada, con la inclusión de los extremos N-terminal y C-terminal de la cadena de aminoácidos.

En la banda de 11 kDa se detectaron dos péptidos diferentes que coincidían con la masa de péptidos hipotéticos escindidos con tripsina en la secuencia postulada de la cadena 2 de Equ c s (tabla 7b). Estos péptidos cubrían el 32% de la secuencia madura postulada, incluido el extremo N-terminal de la cadena de aminoácidos. La razón por la que solo se pudo identificar una pequeña parte de la secuencia de la cadena 2 es que contiene una N-glicosilación y el hecho de que los sitios de escisión de tripsina se distribuyen de manera que se producen péptidos demasiado grandes o demasiado pequeños. En la banda de 18 kDa, pudieron encontrarse péptidos tanto de la cadena 1 como de la cadena 2. Con el fin de aumentar la intensidad de la señal de estos péptidos para permitir el análisis MS/MS, se usaron dos fracciones de una purificación por cromatografía RPC similar a la descrita en el ejemplo 2 pero mediante el uso de un gradiente más pronunciado (Figura 8) por lo que los dos primeros picos no se vuelven completamente resueltos. Las fracciones de estos dos primeros picos (fracción D5 y D4) se redujeron, se alquilaron con yodoacetamida y se sometieron a digestión en solución con tripsina. Mediante el uso de estas muestras, pudo verificarse que la secuencia de aminoácidos completa cubierta por el análisis PMF c de la banda de 5 y 10 kDa mediante análisis MS/MS tiene secuencias idénticas a los fragmentos postulados (tabla 8). Un análisis adicional de

esta muestra supuso que los sitios de escisión de semitripsina (es decir, al permitir que solo uno de los extremos de cada péptido fuera escindido por tripsina) identificaron un gran fragmento de péptido cerca del extremo C terminal de la cadena 2 (tabla 8).

El análisis SDS-PAGE (Figura 5) y el análisis espectrométrico de masas anteriores proporcionan evidencia de que las cadenas de aminoácidos de 5 y 10 kDa pueden identificarse como Equ c s, cadena 1 y 2, respectivamente. En el estado nativo no reducido, estas cadenas de aminoácidos se unen mediante uno o más puentes disulfuro, y así forman una proteína heterodimérica. Así, el análisis enlaza la secuencia SEQ ID No 3, codificada por un gen, con la SEQ ID No 4, codificada por un gen diferente, que juntas forman una proteína secretoglobina heterodimérica previamente desconocida.

Ejemplo 7: Producción y caracterización inmunológica de Equ c s recombinantes

Clonación y purificación de Equ c s recombinantes

Se diseñó un gen sintético de cadena simple de Equ c s mediante combinación de secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de las subunidades de 5 kDa y 10 kDa con una secuencia que codifica un péptido enlazador que comprende 3x (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, residuos 72-86 de SEQ ID NO: 5). El gen sintético de longitud completa se clonó en los sitios NdeI y XhoI del vector pET23a(+) (Novagen, Madison, WI, EE. UU.), al agregar una etiqueta de hexahistidina C-terminal para permitir la purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC).

La secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante completa (denominada rEqu c s ab) es

```
MDICPAVKED VNIFLTGTPD DYVKVSYQYQ RNPVILANAE KLNKCIDKKL TAEDKENALS      60
VLEKIYSSDF CGGGGSGGGG SGGGSCPSF YAVLGVLSLG SKTLTDTSLN LVNATEPEKV      120
AMGKIQDCYN EAGVITKISD LIIMGTITTS PECISHALST LTDDVQEGIS KLNPLGRLEH      180
HHHHH                                         185
(SEQ ID NO: 5).
```

La secuencia de nucleótidos se diseñó para un uso óptimo de codones en *E. coli* (DNA2.0, Menlo Park, CA, EE. UU.). La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante completa es

```
atggacattt gccctgcggt taaagaggac gtcaacattt ttctgaccgg taccacagat      60
gattacgtca aaaaagttag ccagtaccag cgtaaccagg ttattctggc aaatgccgag      120
aaactgaaga attgtatcga caaaaagctg acggctgagg ataaggaaaa cgccctgtct      180
gtcttgagag agatttacag cagcgacttc tgtggtggcg gtggcagcgg tgggtggtggt      240
tcgggcggtg gcggcagctg cccgtccttc tatgcggtgc tgggtgttct gagcttaggt      300
agcaagaccc tgttggaacg gagcctgaat ttggtgaatg cgactgaacc ggagaaagtc      360
gcaatgggca agatccaaga ttgctataac gaagcgggag ttatcaccaa gatcagcgat      420
ctgatcatta tgggtacgat cagcaccagc ccggaatgta tctctcacgc gctgtccacc      480
ctgaccaccg acgtgcaaga gggcattagc aaactgaacc cgctgggtcg cctcgagcac      540
caccaccacc accac                                         555
(SEQ ID NO: 6).
```

La secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena 1 es

```
gacatttgcc ctgcggttaa agaggacgtc aacatttttc tgaccggtag cccagatgat      60
tacgtcaaaa aagttagcca gtaccagcgt aaccgggtta ttctggcaaa tgccgagaaa      120
ctgaagaatt gtatcgacaa aaagctgacg gctgaggata aggaaaacgc cctgtctgtc      180
ttggagaaga ttacagcag cgacttctgt                                         210
```

(SEQ ID NO: 9)

El ácido nucleico que codifica la cadena 2 es

```
tgcccgtcgt tttatgcagt cctgggtggt ctgtctttgg gttctaaaac tttgctggac      60
acgagcctga atctggtgaa tgcaacggag cctgaaaagg tcgcatggg caagattcag      120
gactgttaca acgaagcggg cgttattacc aagatcagcg acctgatcat tatgggcacg      180
atcaccacga gccagagtg catcagccac gctttgtcca ccctgaccac cgatgtccaa      240
gagggcatta gcaagctgaa cccgctgggt cgc                                         273
(SEQ ID NO: 10)
```

Se diseñó un constructo alternativo que tenía la subunidad de 10 kDa en el extremo N-terminal seguida por el enlazador y la subunidad de 5 kDa, lo cual conectaba así las dos subunidades en el otro extremo de cada cadena de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos para la proteína recombinante alternativa (denominada rEqu c s ba) es

```

5      MCPSFYAVLG VLSLGSKTLL DTSINLVNAT EPEKVMGKI QDCYNEAGVI TKISDLIIMG      60
      TITTSPECIS HALSTLTDDV QEGISKLNPL GRGGGSGGG GSGGGSDIC PAVKEDVNIF      120
      LTGTPDDYVK KVSQYQRNPV ILANAELKLN CIDKKLTAED KENALSVLEK IYSSDFCLEH      180
      HHHHHH                                     185

```

(SEQ ID NO: 7)

y la secuencia de ácido nucleico que codifica la misma proteína es

```

15      atgtgcccgt cgttttatgc agtcctgggt gttctgtctt tgggttctaa aactttgctg      60
      gacacgagcc tgaatctggt gaatgcaacg gagcctgaaa aggtcgcgat gggcaagatt      120
      caggactggtt acaacgaagc gggcggttatt accaagatca gcgacctgat cattatgggc      180
      acgatcacca cgagcccaga gtgcatcagc cacgctttgt ccaccctgac caccgatgtc      240
      caagagggca ttagcaagct gaacccgctg ggtcgcggtg gtggcggtag cggtggtggt      300
      ggctccggtg gcggtggcag cgatatattgt ccggcggtga aagaagatgt caacatcttc      360
20      ctgaccggta ccccgatga ttatgtgaaa aaagttagcc aataccagcg taatccggtt      420
      atcctggcca atgccgagaa actgaagaac tgcatcgaca aaaagctgac cgcagaggac      480
      aaagaaaacg cgctgagcgt gctggagaag atttacagca gcgacttctg tctcgagcac      540
      caccaccacc accac                                     555

```

(SEQ ID NO: 8).

Los constructos de ADN plasmídico se transformaron en la cepa BL21-AI de *E. coli* (Invitrogen) y se produjo la proteína de cadena sencilla Equ c s recombinante mediante el uso de un biorreactor de 3 litros (Belach Bioteknik, Skogås, Suecia).

El método de purificación de Equ c s recombinantes fue casi idéntico para las dos variantes de la proteína. Las células recolectadas se resuspendieron en Tris-HCl 20 mM pH 8,0 y se lisaron al pasar la suspensión a través de un homogeneizador Emulsiflex C5 (Avestin, Ottawa, Ontario, Canadá) a 10 000-15 000 kPa. Después de la clarificación por centrifugación y filtración, el sobrenadante se aplicó a una columna Chelating Sepharose FF (GE Healthcare Life Sciences), cargada con NiSO₄. El lavado de la columna se realizó con imidazol 20 mM en Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,15 M y la proteína recombinante se eluyó en un gradiente lineal de imidazol 20-500 mM en el mismo tampón (Figura 9a). Se realizó una purificación adicional de la proteína recombinante mediante AIEC en Tris-HCl 20 mM pH 8,0 mediante el uso de una columna Q Sepharose™ FF (GE Healthcare Life Sciences). La proteína se eluyó mediante el uso de un gradiente lineal de NaCl 0-0,6 M lo que dio como resultado un doble pico en el que los dos picos se agruparon por separado (Figura 9b). La concentración de proteína de las preparaciones se determinó a partir de la absorbancia a 280 nm, mediante el uso de un coeficiente de extinción calculado de 0,34 por mg/mL.

Caracterización bioquímica de Equ c s recombinante

La filtración del pico 1 y el pico 2 de rEqu c s ab en gel analítico demostró que el pico 1 contenía una mezcla de las formas dimérica y monomérica de rEqu c s (Figura 10 a) mientras que el pico 2 contenía principalmente material agregado (Figura 10 b). Este resultado fue también el caso de la otra forma recombinante, rEqu c s ba (datos no mostrados).

El análisis SDS PAGE de Equ c s recombinantes de cadena sencilla demostró una banda única a 19 kDa para condiciones reductoras y una banda de peso molecular aparente ligeramente más bajo a 16 kDa para condiciones no reductoras (Figura 10c). Durante las condiciones no reductoras, estaban presentes, además, bandas de mayor peso molecular predominantemente a 39 kDa, que supuestamente representan una forma dimérica de la proteína.

El análisis de la secuencia N-terminal de la primera variante de rEqu c s (rEqu c s ab) dio como resultado una lectura de secuencia clara e inequívoca sin desviación de la secuencia esperada y donde la metionina iniciadora se retuvo por completo. En la preparación de la segunda variante, rEqu c s ba, la metionina iniciadora se retuvo en aproximadamente la mitad de la muestra, pero el resto de la preparación comenzó en la segunda cadena de aminoácidos. En conclusión, ambas preparaciones recombinantes contenían rEqu c s intactas.

Evaluación de la unión de IgE a Equ c s recombinante

Cada uno de los picos 1 y 2 de las dos formas de Equ c s recombinante se inmovilizó en ImmunoCAP™ experimental como se describe (Marknell DeWitt, Niederberger y otros, 2002) y se usó la reactividad de IgE a los sueros descritos en el ejemplo 1 para evaluar la reactividad de IgE de cada una de estas preparaciones. De acuerdo con la tabla 9, todas las preparaciones tenían una reactividad de IgE similar a estos sueros, lo cual, además, estaba de acuerdo con la reactividad de IgE de la fracción purificada que contenía proteína nativa (tabla 6, fracción 2).

Se realizó un análisis adicional de la reactividad de IgE mediante el uso de sueros de 35 sujetos sensibilizados con caspa de caballo al comparar Equ c s ab recombinante con la fracción 2 de proteína purificada nativa de RPC (Figura 4).

Hubo una buena concordancia ($r=0,99$) entre la unión de IgE a Equ c s nativa purificada y Equ c s recombinante (Figura 11), lo que demuestra que la proteína recombinante era inmunológicamente activa y estructuralmente similar a la proteína nativa. Estos datos proporcionan una fuerte evidencia de que la secuencia de aminoácidos de las subunidades de 5 kDa (SEQ ID NO: 3) y 10 kDa (SEQ ID NO: 4) de Equ c s, como se predice a partir de la información de la secuencia genómica identificada, son correctas y representan la secuencia de aminoácidos del alérgeno de caspa de caballo purificado Equ c s.

Ejemplo 8: Evaluación de la actividad de unión a IgE de nEqu c 1, nEqu c 2, nEqu c 3, nEqu c 4, Equ c 15k y Equ c s en una cohorte de pacientes alérgicos a caballos

En el estudio se usaron sueros de 25 sujetos alérgicos a caballos, de España ($n = 20$) y Suecia ($n = 5$). Todos los pacientes tenían un diagnóstico médico de alergia al caballo con síntomas tales como asma, rinoconjuntivitis y urticaria, y una prueba de pinchazo cutáneo positiva al extracto de caspa de caballo. Todas las muestras y los datos clínicos se recogieron con la aprobación del comité de ética local de cada centro que contribuyó al biobanco en el cual se habían depositado las muestras y los datos.

Los niveles de anticuerpos IgE específicos para el extracto de caspa de caballo, nEqu c 1, nEqu c 2, nEqu c 3 y nEqu c 4, rEqu c 15k y rEqu c s ab entre los 25 sujetos alérgicos a los caballos se determinaron mediante el uso de ImmunoCAP™ (Figura 12, Tabla 10). En la Tabla 10, todos los niveles de ImmunoCAP™ se muestran como kU/L y el origen de cada paciente está indicado por ES (España) o SE (Suecia). Los síntomas alérgicos registrados al exponerse al caballo son rinitis (rin), asma (asm), urticaria (urt) o anafilaxia (anaf).

De los 25 sueros analizados, 13 (52 %) mostraron una respuesta de IgE $\geq 0,35$ kU/L a rEqu c s mientras que 12 (48 %) tuvieron reactividad de IgE a rEqu c 15k, 16 (64 %) a nEqu c 2 y 19 (76 %) a nEqu c 1. Tanto nEqu c 3 como nEqu c 4/5 aparecieron como alérgenos menores entre los sujetos estudiados, al unir IgE ab de sólo 5 (20 %) y 7 (28 %) de los sueros probados, respectivamente. En esta cohorte de estudio, ninguno de los pacientes reaccionó exclusivamente a rEqu c s mientras que cuatro (16 %) y dos de los 25 sueros reaccionaron exclusivamente a Equ c 15k y Equ c 1, respectivamente. En promedio, entre todos los sueros reactivos con Equ c 15k, la concentración de anticuerpo IgE contra Equ c s ascendió al 30 % de la concentración de la caspa de caballo.

La correspondiente concentración relativa de anticuerpo IgE contra nEqu c 1 fue del 52 %, mientras que para nEqu c 2, nEqu c 3, nEqu c 4/5 y Equ c 15k las concentraciones relativas fueron 35 %, 69 %, 9 % y 37 %, respectivamente, entre sueros específicamente reactivos a esos alérgenos. Veinticuatro de los 25 sueros mostraron unión de anticuerpos IgE al extracto de caspa de caballo. Todos esos sueros mostraron unión al menos a uno de los cinco alérgenos individuales de caballo probados. La suma de los niveles de unión de IgE al componente individual coincidió o superó a la del extracto de caspa de caballo.

Ejemplo 9: Reactividad cruzada entre Equ c s y secretoglobina de gato, el principal alérgeno Fel d 1

Dado que la reactividad IgE desconocida que fue el punto de partida de este estudio fue inhibida por Fel d 1, se investigó la relación entre Equ c s recombinante y Fel d 1. Se evaluaron los niveles de unión de IgE a Fel d 1 en sueros de 35 sujetos sensibilizados a la caspa de caballo, incluidos los 25 pacientes alérgicos a los caballos descritos en el Ejemplo 8. Hubo una correlación significativa ($r=0,92$) entre los niveles de IgE con Equ c s recombinantes y rFel d 1 (Figura 13) y para casi todos los sujetos la reactividad de IgE a Fel d 1 fue mayor que la de Equ c s.

Para investigar más a fondo la relación entre Equ c s y Fel d 1, los cinco sueros usados en el ejemplo 1 se probaron para determinar la inhibición cruzada, mediante el uso de extracto de caspa de caballo, rFel d 1 y rEqu c s en fase sólida así como también rEqu c 15k, rEqu c s y rFel d 1 como inhibidores a una concentración final de 100 $\mu\text{g/mL}$. Como tampón de control de inhibición, se usó tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4, que contenía albúmina de suero humano al 0,3 %. Se calcularon las medias de las determinaciones por duplicado de cada inhibición y se calculó la fracción de inhibición como la fracción de la unión mediante el uso de tampón de control de inhibición que podía inactivarse con cada inhibidor.

En estos sueros seleccionados, la inhibición de la unión al extracto de caspa de caballo solo podría lograrse mediante Fel d 1 y Equ c s, lo que indica que Equ c s de hecho es la proteína desconocida en el extracto de caspa de caballo que es responsable de la unión de estos sueros (Tabla 11A). La unión a Fel d 1 immunoCAP puede inhibirse por el mismo Fel d 1 pero no por Equ c s (Tabla 11B) mientras que la unión a Equ c s pudo inhibirse tanto por Fel d 1 como por Equ c s (Tabla 11C). Esto demuestra que la unión de IgE entre Fel d 1 y Equ c s es, de hecho, de reacción cruzada como se sugiere debido al alto grado de homología de secuencia entre las dos proteínas (Figura 6C y 7C) y a la alta correlación de la unión de IgE a una población de sueros sensibilizados con caspa de caballo. Además, el hecho de que Fel d 1 pudo inhibir la unión a la fase sólida de Equ c s pero Equ c s no pudo inhibir la unión a Fel d 1, así como el hecho de que la unión de IgE a Fel d 1 fue siempre mayor que a Equ c s en la población de sueros sensibilizados a caspa de caballo sugirió que estos sueros estaban sensibilizados originalmente a Fel d 1 y que la unión a Equ c s era el resultado de una reactividad cruzada.

Ejemplo 10: Evaluación de las propiedades de unión a IgE de una variante o fragmento (analito) de una proteína alergénica

- 5 La proteína alergénica original, en este caso Equ c s, se inmoviliza en un soporte sólido. Las muestras de suero de al menos tres pacientes humanos representativos sensibilizados a las especies relevantes y que muestran reactividad de IgE a la proteína alergénica original de esa especie se incuban durante 2 ha temperatura ambiente con el analito a una concentración final de 100 µg/mL y, en paralelo como controles negativos, con tampón solo y la proteína no alergénica de unión a maltosa (MBP) de *E. coli*. Las muestras se analizan luego para determinar la unión de IgE a soportes sólidos que portan Equ c s inmovilizados para estudiar si la preincubación con la variante o
- 10 fragmento de Equ c s inhibe específicamente o reduce significativamente la unión de IgE.

Tabla 1 Características de unión a IgE de los sueros usados para la detección de un componente desconocido de la caspa de caballo.

	CDE	rFel d 1	HDE	rEqu c 1	nEqu c 2	nEqu c 3	nEqu c 4	rEqu c 15k
Suero	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L
A	>100	>100	12,0	0,19	0,46	0,05	0,11	0,08
B	97,0	95,1	11,4	0,21	0,32	0,07	0,16	0,08
C	87,9	>100	10,9	0,13	0,21	0,03	0,08	0,06
D	61,9	69,0	7,36	0,11	0,16	0,04	0,09	0,06
E	67,6	61,0	6,28	0,02	0,04	0,14	0,02	0,00
Extracto de caspa de gato CDE								
Extracto de caspa de caballo HDE								

Tabla 2 Inhibición de la unión de IgE a **a)** extracto de caspa de gato y **b)** extracto de caspa de caballo, mediante el uso de los inhibidores Equ c 15k, Fel d 1 y Fel d 7.

a) unión al extracto de caspa de gato en fase sólida			
Suero	Inhibidor	Concentración (kUA/L)	Inhibición (%)
A	tampón	73,3	0
	Equ c 15k	74,6	-2
	Fel d 1	13,5	82
	Fel d 7	76,2	-4
B	tampón	59,7	0
	Equ c 15k	56,4	6
	Fel d 1	8,5	86
	Fel d 7	58,7	2
C	tampón	55,9	0
	Equ c 15k	57,2	-2
	Fel d 1	9,06	84
	Fel d 7	57,6	-3
D	tampón	39,1	0
	Equ c 15k	39,1	0
	Fel d 1	6,17	84
	Fel d 7	37,7	4
E	tampón	53,6	0
	Equ c 15k	51,2	4
	Fel d 1	19,0	65
	Fel d 7	56,7	-6
b) unión al extracto de caspa de caballo en fase sólida			
Suero	Inhibidor	Concentración (kUA/L)	Inhibición (%)
A	tampón	7,46	0
	Equ c 15k	7,87	-5
	Fel d 1	0,12	98
	Fel d 7	7,99	-7
B	tampón	6,42	0
	Equ c 15k	6,57	-2
	Fel d 1	0,22	97
	Fel d 7	6,84	-6
C	tampón	6,27	0
	Equ c 15k	5,97	5
	Fel d 1	0,11	98
	Fel d 7	6,09	3
D	tampón	4,20	0
	Equ c 15k	4,04	4
	Fel d 1	0,10	98
	Fel d 7	4,42	-5
E	tampón	4,64	0
	Equ c 15k	4,56	2
	Fel d 1	0,06	99
	Fel d 7	4,70	-1

Tabla 3 Unión de IgE de sueros detectores a fracciones inmovilizadas de cromatografía SEC de extracto de caspa de caballo

Fracción	18	22	26	30	34	38
Suero	kUA/L	kUA/L	kUA/L	kUA/L	kUA/L	kUA/L
A	18,9	16,4	18,3	10,1	4,01	1,78
B	12,4	11,5	11,8	7,02	3,04	1,53
C	15,2	12,3	12,2	7,25	3,02	1,46
D	10,7	8,79	8,44	5,40	2,22	1,02
E	11,0	9,31	9,24	6,45	2,49	0,77

Tabla 4 Unión de IgE de sueros detectores a fracciones inmovilizadas de cromatografía HIC de una fracción enriquecida de extracto de caspa de caballo

Fracción	8	17	23	36	39	42	60
Sueros	kUA/L	kUA/L	kUA/L	kUA/L	kUA/L	kUA/L	kUA/L
A	0,21	0,25	0,44	2,67	3,99	11,9	22,9
B	0,29	0,65	0,55	2,69	3,15	9,43	16,8
C	0,17	0,22	0,30	2,03	3,25	9,98	18,0
D	0,17	0,19	0,26	1,59	2,27	6,62	11,4
E	0,06	0,16	0,19	1,15	2,20	8,32	13,9

Tabla 5 Unión de IgE de sueros detectores a fracciones inmovilizadas de cromatografía de intercambio aniónico de una fracción enriquecida de extracto de caspa de caballo.

a) Fracciones inmovilizadas a dilución 1:4							
Fracción	B3	B2	C1	C2	C5	C8	D9
Sueros	kUA/L	kUA/L	kUA/L	kUA/L	kUA/L	kUA/L	kUA/L
A	25,7	25,5	23,5	23,3	20,3	20,5	5,2
B	18,1	17,9	17,9	16,9	16,2	16,3	4,0
C	17,1	16,8	16,8	16,7	17,1	16,2	3,8
D	11,6	11,7	11,7	11,2	11,4	10,3	2,6
E	14,9	14,4	14,7	13,9	14,5	12,1	2,0
b) Mezclas inmovilizadas a dilución 1:20							
Fracción	B4-B1	C1-C4	C5-C11				
Sueros	kUA/L	kUA/L	kUA/L				
A	10,71	9,00	6,50				
B	8,92	7,67	5,07				
C	8,46	6,72	4,97				
D	5,44	4,48	3,26				
E	5,74	4,46	3,00				

Tabla 6 Unión de IgE de sueros detectores a fracciones inmovilizadas de cromatografía RPC de una fracción enriquecida de extracto de caspa de caballo.

Fracción	1	2	3
Sueros	kU _A /L	kU _A /L	kU _A /L
A	17,8	21,1	5,52
B	13,2	15,1	4,41
C	13,5	15,2	4,14
D	9,68	11,0	2,97
E	8,10	9,99	1,92

Tabla 7 Fragmentos de péptidos que coinciden con las masas teóricas de Equ c s escindidas con tripsina de la digestión en gel de a) 5 kDa y b) banda de 10 kDa de muestra reducida y c) banda de 18 kDa de muestra no reducida.

a)					
m/z medido	m/z teórico	Cadena Equ c s	intervalo	péptido	SEQ ID NO:
2609,29	2609,28	1	23-45	-.DICPAVKEDVNIFLTGTPDDYVK.K	17
1825,85	1825,88	1	30-45	K.EDVNIFLTGTPDDYVK.K	18
1953,97	1953,98	1	30-46	K.EDVNIFLTGTPDDYVKK.V	19
908,50	908,49	1	46-52	K.KVSQYQR.N	20
780,39	780,39	1	47-52	K.VSQYQR.N	21
1068,59	1068,6	1	53-62	R.NPVILANA EK.I	22
1659,84	1659,88	1	71-85	K.LTAEDKENALSVLEK.I	23
891,39	891,35	1	86-92	K.IYSSDFC.-	24
b)					
m/z medido	m/z teórico	Cadena Equ c s	intervalo	péptido	SEQ ID NO:
1697,84	1697,89	2	24-39	-CPSFYAVLGVLSLGSK.T	25
1510,67	1510,72	2	62-74	K.IQDCYNEAGVITK.I	26
c)					
m/z medido	m/z teórico	Cadena Equ c s	intervalo	péptido	SEQ ID NO:
2609,31	2609,28	1	23-45	-.DICPAVKEDVNIFLTGTPDDYVK.K	27
1825,86	1825,88	1	30-45	K.EDVNIFLTGTPDDYVK.K	28
1953,93	1953,98	1	30-46	K.EDVNIFLTGTPDDYVKK.V	29
908,46	908,49	1	46-52	K.KVSQYQR.N	30
1068,56	1068,6	1	53-62	R.NPVILANA EK.I	31
1659,84	1659,88	1	71-85	K.LTAEDKENALSVLEK.I	32
1510,69	1510,72	2	62-74	K.IQDCYNEAGVITK.I	33

Tabla 8 Péptidos identificados por MS/MS a partir de la fracción digerida en solución de RPC.

m/z medido	m/z teórico	m/z puntuación de MS/MS	Cadena Equ c s	intervalo	péptido	SEQ ID NO:
802,34	802,41	22,2	1	23-29	-.DICPAVK.E	34
1825,96	1825,88	88,0	1	30-45	K.EDVNIFLTGTPDDYVK.K	35
908,46	908,49	55,3	1	46-52	K.KVSQYQR.N	36
780,34	780,39	25,9	1	47-52	K.VSQYQR.N	37
1068,58	1068,6	75,9	1	53-62	R.NPVILANA EK.I	38
1659,89	1659,88	82,4	1	71-85	K.LTAEDKENALSVLEK.I	39
891,31	891,35	14,8	1	86-92	K.IYSSDFC.-	40
1510,75	1510,72	127,2	2	62-74	K.IQDCYNEAGVITK.I	41
1697,90	1697,89	128,3	2	24-39	-CPSFYAVLGVL SLGSK.T	42
2573,50	2573,32	53,4	2	75-98	K.ISDLIIMGTITTSPECISHALSTL.T*	43

*Péptido identificado por escisión de proteína por semitripsina.

Tabla 9 Reactividad de IgE de preparaciones de rEqu c s

	pico 1 rEqu c s ba	pico 2 rEqu c s ba	pico 1 rEqu c s ab	pico 2 rEqu c s ab
Sueros	kU _A /l	kU _A /l	kU _A /l	kU _A /l
A	24,87	23,09	23,40	23,12
B	15,70	15,02	15,61	15,23
C	15,15	15,34	16,77	15,57
D	15,41	15,59	16,10	15,50
E	13,16	12,99	13,05	13,23

Tabla 10 Reactividad de IgE de 25 pacientes alérgicos a caballos

Paciente núm.	síntomas	País	e3	nEqu c 1	nEqu c 2	nEqu c 3	nEqu c 4	rEqu c 15k	rEqu cs
1	Rin	SE	1,55	0,06	0,21	0,12	0,30	1,31	0,14
2	Rin, asm	SE	1,28	1,24	0,56	0,00	0,16	0,03	0,48
3	Rin	ES	4,79	1,42	0,13	0,00	0,04	1,89	0,05
4	Rin, asm	ES	5,87	4,96	2,32	0,07	0,53	0,16	1,14
5	Rin, asm	ES	1,79	1,28	0,26	0,01	0,15	0,04	1,12
6	Rin, asm	ES	8,74	5,41	5,56	0,00	0,34	0,02	0,80
7	Rin, asm	ES	0,21	0,00	0,02	0,00	0,02	0,20	0,06
8	Rin, asm	ES	4,55	1,41	2,02	0,00	0,53	0,86	0,10
9	Rin	ES	0,55	0,00	0,01	0,00	0,02	0,63	0,06
10	asm, urt, a	ES	17,31	6,20	2,67	11,90	3,11	6,07	0,08
11	Rin	ES	16,62	1,30	15,15	5,04	0,86	0,10	1,72
12	Rin, urt	ES	13,49	2,91	1,19	0,03	0,30	12,96	1,31
13	hin, asm, u	SE	26,19	11,04	7,48	0,05	2,94	5,68	1,80
14	Rin	SE	6,58	3,42	1,08	0,01	0,48	1,16	2,23
15	Rin, asm	SE	7,01	0,03	0,04	0,04	0,20	7,45	0,13
16	Rin	ES	6,78	5,77	0,95	9,43	0,28	0,02	0,97
17	Rin	ES	28,73	21,92	5,89	33,75	1,19	0,24	9,25
18	Rin, urt	ES	13,81	5,44	14,10	0,05	0,13	0,07	0,14
19	Rin, asm	ES	5,18	0,06	0,08	0,06	0,18	5,81	1,54
20	Rin, asm	ES	0,78	0,76	0,09	0,01	0,02	0,02	0,06
21	Rin, asm	ES	1,96	1,63	0,58	0,01	0,16	0,04	0,32
22	Rin, urt	ES	1,28	0,24	1,75	0,01	0,02	0,06	0,23
23	Rin, asm	ES	6,94	2,49	0,30	0,00	0,10	1,36	4,02
24	Rin, asm	ES	3,18	1,46	1,31	0,00	0,13	0,60	0,05
25	Rin	ES	7,78	5,46	1,32	4,61	0,08	0,03	4,99

Tabla 11 Inhibición de la unión de IgE a **a)** extracto de caspa de caballo, **b)** rFel d 1 y c) rEqu c s fase sólida, mediante el uso de los inhibidores Equ c 15k, Equ c s y Fel d 1.

a) unión al extracto de caspa de caballo en fase sólida			
Suero	Inhibidor	Concentración (kUA/L)	Inhibición (%)
A	tampón	6,71	0
	Equ c 15k	7,40	-10
	Equ c s	0,27	96
	Fel d 1	0,13	98
B	tampón	5,03	0
	Equ c 15k	5,10	-2
	Equ c s	0,33	93
	Fel d 1	0,20	96
C	tampón	5,49	0
	Equ c 15k	5,50	0
	Equ c s	0,25	96
	Fel d 1	0,12	98
D	tampón	5,01	0
	Equ c 15k	5,32	-6
	Equ c s	0,22	96
	Fel d 1	0,13	97
E	tampón	3,70	0
	Equ c 15k	4,06	-10
	Equ c s	0,09	98
	Fel d 1	0,06	98
b) unión a la fase sólida de rFel d 1			
Suero	Inhibidor	Concentración (kUA/L)	Inhibición (%)
A	tampón	54,97	0
	Equ c 15k	57,45	-5
	Equ c s	58,70	-7
	Fel d 1	5,22	91
B	tampón	42,07	0
	Equ c 15k	43,80	-4
	Equ c s	43,20	-3
	Fel d 1	3,87	91
C	tampón	47,30	0
	Equ c 15k	49,98	-6
	Equ c s	48,35	-2
	Fel d 1	4,01	92
D	tampón	44,15	0
	Equ c 15k	45,25	-2
	Equ c s	41,90	5
	Fel d 1	3,85	91
E	tampón	32,38	0
	Equ c 15k	33,32	-3
	Equ c s	29,99	7
	Fel d 1	2,02	94

(continuación)

c) unión a la fase sólida de rEqu c s			
Suero	Inhibidor	Concentración (kUA/L)	Inhibición (%)
A	tampón	13,39	0
	Equ c 15k	11,73	12
	Equ c s	5,30	60
	Fel d 1	0,59	96
B	tampón	9,08	0
	Equ c 15k	8,63	5
	Equ c s	3,47	62
	Fel d 1	0,45	95
C	tampón	10,05	0
	Equ c 15k	9,37	7
	Equ c s	3,82	62
	Fel d 1	0,40	96
D	tampón	9,22	0
	Equ c 15k	8,44	8
	Equ c s	3,76	59
	Fel d 1	0,40	96
E	tampón	6,60	0
	Equ c 15k	6,33	4
	Equ c s	1,59	76
	Fel d 1	0,24	96

Referencias

- Akdis, C. A. (2006). "Allergy and hypersensitivity: mechanisms of allergic disease." *Curr Opin Immunol* 18(6): 718-726.
- Akdis, M. y CA Akdis (2007). "Mechanisms of allergen-specific immunotherapy." *J Allergy Clin Immunol* 119(4): 780-791.
- Asarnej, A., R. Moverare, y otros, (2010). "IgE to peanut allergen components: relation to peanut symptoms and pollen sensitization in 8-year-olds." *Allergy*.
- Asarnej, A., C. Nilsson, y otros, (2012). "Peanut component Ara h 8 sensitization and tolerance to peanut." *J Allergy Clin Immunol* 130(2): 468-472.
- Breiteneder, H., K. Hoffmann-Sommergruber y otros, (1997). "Recombinant allergens; basic and practical considerations." *Arbeiten aus dem Paul Ehrlich Institut - Bundesamt für Sera und Impfstoffe - Zu Frankfurt Am*(91): 80-86.
- Cabañas, R., MC López-Serrano, y otros, (2000). "Importance of albumin in cross-reactivity among cat, dog and horse allergens." *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 10(2): 71-77.
- Canonica, GW, IJ Ansotegui y otros, (2013). "A WAO - ARIA - GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics." *World Allergy Organ J* 6(1): 17.
- Caubet, JC, R. Bencharitwong y otros, (2012). "Significance of ovomucoid- and ovalbumin-specific IgE/IgG(4) ratios in egg allergy." *J Allergy Clin Immunol* 129(3): 739-747.
- Codreanu, F., O. Collignon y otros, (2011). "A novel immunoassay using recombinant allergens simplifies peanut allergy diagnosis." *Int Arch Allergy Immunol* 154(3): 216-226.
- Cromwell, O., H. Fiebig y otros, (2006). "Strategies for recombinant allergen vaccines and fruitful results from first clinical studies." *Immunol Allergy Clin North Am* 26(2): 261-281, vii.
- Custovic, A., L. Soderstrom y otros, (2011). "Allergen-specific IgG antibody levels modify the relationship between allergen-specific IgE and wheezing in childhood." *J Allergy Clin Immunol* 127(6): 1480-1485.
- Dandeu, JP, J. Rabillon y otros, (1993). "Hydrophobic Interaction Chromatography for Isolation and Purification of Equ.CI, the Horse Major Allergen." *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* 621(1): 23-31.
- Du Toit, G., G. Roberts y otros, (2015). "Randomized trial of peanut consumption in infants at risk for peanut allergy." *N Engl J Med* 372(9): 803-813.
- Ebisawa, M., R. Moverare y otros, (2012). "Measurement of Ara h 1-, 2-, and 3-specific IgE antibodies is useful in diagnosis of peanut allergy in Japanese children." *Pediatr Allergy Immunol* 23(6): 573-581.
- Ebisawa, M., R. Shibata y otros, (2012). "Clinical utility of IgE antibodies to omega-5 gliadin in the diagnosis of wheat allergy: a pediatric multicenter challenge study." *Int Arch Allergy Immunol* 158(1): 71-76.

Goubran Botros, H., C. Gregoire, y otros, (1996). "Cross-antigenicity of horse serum albumin with dog and cat albumins: study of three short peptides with significant inhibitory activity towards specific human IgE and IgG antibodies." *Immunology* 88(3): 340-347.

Goubran Botros, H., P. Poncet, y otros, (2001). "Biochemical characterization and surfactant properties of horse allergens." *Eur J Biochem* 268(10): 3126-3136.

Goubran Botros, H., J. Rabillon, y otros, (1998). "Thiophilic adsorption chromatography: purification of Equ c2 and Equ c3, two horse allergens from horse sweat." *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences & Applications* 710(1-2): 57-65.

Gregoire, C., I. Rosinski-Chupin y otros, (1996). "cDNA cloning and sequencing reveal the major horse allergen Equ c1 to be a glycoprotein member of the lipocalin superfamily." *Journal of Biological Chemistry* 271(51): 32951-32959.

Gronlund, H., T. Saarne y otros, (2009). "The Major Cat Allergen, Fel d 1, in Diagnosis and Therapy." *Int Arch Allergy Immunol* 151(4): 265-274.

Hiller, R., S. Laffer y otros, (2002). "Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment." *FASEB Journal* 16(3): 414-416.

Jutel, M., L. Jaeger y otros, (2005). "Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens." *J Allergy Clin Immunol* 116(3): 608-613.

Kim, J.L., L. Elfman y otros, (2005). "Current asthma and respiratory symptoms among pupils in relation to dietary factors and allergens in the school environment." *Indoor Air* 15(3): 170-182.

Laukaitis, C. y R. Karn (2005). "Evolution of the secretoglobins: a genomic and proteomic view." *Biol J Linnean Soc* 84: 493-501.

Liccardi, G., G. D'Amato y otros, (2011). "Sensitization to Horse Allergens in Italy: A Multicentre Study in Urban Atopic Subjects without Occupational Exposure." *Int Arch Allergy Immunol* 155(4): 412-417.

Marknell DeWitt, Å., V. Niederberger y otros, (2002). "Molecular and immunological characterization of a novel timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen, Phl p 11." *Clinical & Experimental Allergy* 32(9): 1329-1340.

Masthoff, L.J., L. Mattsson y otros, (2013). "Sensitization to Cor a 9 and Cor a 14 is highly specific for a hazelnut allergy with objective symptoms in Dutch children and adults." *J Allergy Clin Immunol* 132(2): 393-399.

Matsuo, H., J. Dahlstrom y otros, (2008). "Sensitivity and specificity of recombinant omega-5 gliadin-specific IgE measurement for the diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis." *Allergy* 63(2): 233-236.

Mattsson, L., T. Lundgren y otros, (2009). "Prostatic kallikrein: A new major dog allergen." *J Allergy Clin Immunol* 123(2): 362-368.

McDonald, R.E., R.I. Fleming y otros, (2009). "Latherin: a surfactant protein of horse sweat and saliva." *PLoS One* 4(5): e5726.

Müller, U., P. Schmid-Grendelmeier y otros, (2012). "IgE to recombinant allergens Api m 1, Ves v 1, and Ves v 5 distinguish double sensitization from crossreaction in venom allergy." *Allergy* 67(8): 1069-1073.

Nicolaou, N., M. Poorafshar y otros, (2010). "Allergy or tolerance in children sensitized to peanut: prevalence and differentiation using component-resolved diagnostics." *J Allergy Clin Immunol* 125(1): 191-197 e191-113.

Ronmark, E., M. Perzanowski y otros, (2003). "Different sensitization profile for asthma, rhinitis, and eczema among 7-8-year-old children: report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden studies." *Pediatr Allergy Immunol* 14(2): 91-99.

Saarelainen, S., M. Rytönen-Nissinen y otros, (2008). "Animal-derived lipocalin allergens exhibit immunoglobulin E cross-reactivity." *Clin Exp Allergy* 38(2): 374-381.

Saarne, T., L. Kaiser y otros, (2005). "Rational design of hypoallergens applied to the major cat allergen Fel d 1." *Clin Exp Allergy* 35(5): 657-663.

Smith, W., A.J. Butler y otros, (2004). "Fel d 4, a cat lipocalin allergen." *Clinical & Experimental Allergy* 34(11): 1732-1738.

Spitzauer, S., C. Schweiger y otros, (1993). "Characterisation of dog allergens by means of immunoblotting." *International Archives of Allergy and Immunology* 100: 60-67.

Stumvoll, S., K. Westritschnig y otros, (2003). "Identification of cross-reactive and genuine *Parietaria judaica* pollen allergens." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111(5): 974-979.

Tutluoglu, B., S. Atis y otros, (2002). "Sensitization to horse hair, symptoms and lung function in grooms." *Clin Exp Allergy* 32(8): 1170-1173.

Urmosi, C., R.R. Beerli y otros, (2010). "Mechanisms of allergen-specific desensitization." *J Allergy Clin Immunol* 126(2): 375-383.

Urmosi, C., F. Zabel y otros, (2014). "IgG-mediated down-regulation of IgE bound to mast cells: a potential novel mechanism of allergen-specific desensitization." *Allergy* 69(3): 338-347.

Wainstein, B.K., A. Yee y otros, (2007). "Combining skin prick, immediate skin application and specific-IgE testing in the diagnosis of peanut allergy in children." *Pediatr Allergy Immunol* 18(3): 231-239.

Valenta, R., J. Lidholm y otros, (1999). "The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT)." *Clinical and Experimental Allergy* 29(7): 896-904.

Valenta, R. y V. Niederberger (2007). "Recombinant allergens for immunotherapy." *J Allergy Clin Immunol* 119(4): 826-830.

Listado de secuencias

<110> Phadia AB

<120> Nuevo alérgeno de caballo
 <130> P10607SE00
 5 <160> 48
 <170> PatentIn versión 3.5
 10 <210> 1
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 15 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(22)
 <220>
 <221> mat_péptido
 20 <222> (23)..(92)
 <400> 1
 25 Met Lys Arg Ala Gly Ala Leu Val Leu Leu Trp Thr Thr Leu Leu Leu
 -20 -15 -10
 Ile Pro Gly Arg Asn Cys Asp Ile Cys Pro Ala Val Lys Glu Asp Val
 -5 -1 1 5 10
 30 Asn Ile Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Asp Tyr Val Lys Lys Val Ser
 15 20 25
 Gln Tyr Gln Arg Asn Pro Val Ile Leu Ala Asn Ala Glu Lys Leu Lys
 30 35 40
 35 Asn Cys Ile Asp Lys Lys Leu Thr Ala Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu
 45 50 55
 40 Ser Val Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ser Asp Phe Cys
 60 65 70
 45 <210> 2
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 50 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(23)
 <220>
 <221> mat_péptido
 55 <222> (24)..(114)
 <400> 2
 60
 65

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

25 <210> 3
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Equus caballus

30 <400> 3

	Asp	Ile	Cys	Pro	Ala	Val	Lys	Glu	Asp	Val	Asn	Ile	Phe	Leu	Thr	Gly	
	1				5					10					15		
35	Thr	Pro	Asp	Asp	Tyr	Val	Lys	Lys	Val	Ser	Gln	Tyr	Gln	Arg	Asn	Pro	
			20						25					30			
	Val	Ile	Leu	Ala	Asn	Ala	Glu	Lys	Leu	Lys	Asn	Cys	Ile	Asp	Lys	Lys	
40			35					40					45				
	Leu	Thr	Ala	Glu	Asp	Lys	Glu	Asn	Ala	Leu	Ser	Val	Leu	Glu	Lys	Ile	
		50					55					60					
45	Tyr	Ser	Ser	Asp	Phe	Cys											
		65				70											

50 <210> 4
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Equus caballus

55 <400> 4

60

65

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

<210> 5
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Proteína monocatenaria sintética

<220>
 <221> INIT_MET
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> MISC_CARACTERÍSTICA
 <222> (72)..(86)
 <223> Péptido enlazador

<220>
 <221> MISC_CARACTERÍSTICA
 <222> (180)..(185)
 <223> Etiqueta de hexahistidina

<400> 5

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

55

60

65

	Pro Val Ile Leu Ala Asn Ala Glu Lys Leu Lys Asn Cys Ile Asp Lys	
	35 40 45	
5	Lys Leu Thr Ala Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Val Leu Glu Lys	
	50 55 60	
10	Ile Tyr Ser Ser Asp Phe Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly	
	65 70 75 80	
	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Ser Phe Tyr Ala Val Leu Gly Val	
	85 90 95	
15	Leu Ser Leu Gly Ser Lys Thr Leu Leu Asp Thr Ser Leu Asn Leu Val	
	100 105 110	
20	Asn Ala Thr Glu Pro Glu Lys Val Ala Met Gly Lys Ile Gln Asp Cys	
	115 120 125	
25	Tyr Asn Glu Ala Gly Val Ile Thr Lys Ile Ser Asp Leu Ile Ile Met	
	130 135 140	
	Gly Thr Ile Thr Thr Ser Pro Glu Cys Ile Ser His Ala Leu Ser Thr	
	145 150 155 160	
30	Leu Thr Thr Asp Val Gln Glu Gly Ile Ser Lys Leu Asn Pro Leu Gly	
	165 170 175	
35	Arg Leu Glu His His His His His His	
	180 185	
40	<210> 6	
	<211> 555	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> ADN que codifica péptido monocatenario sintético	
	<400> 6	
50	atggacattt gccctgcggt taaagaggac gtcaacattt ttctgaccgg taccccagat	60
	gattacgtca aaaaagtgag ccagtaccag cgtaaccggt ttattctggc aaatgccgag	120
	aaactgaaga attgtatcga caaaaagctg acggctgagg ataaggaaaa cgccctgtct	180
55	gtcttgagaga agatttacag cagcgacttc tgtggtggcg gtggcagcgg tgggtggtggt	240
	tggggcggtg gcggcagctg cccgtccttc tatgcggtgc tgggtgttct gagcttaggt	300
60	agcaagaccc tgttgacac gagcctgaat ttggtgaatg cgactgaacc ggagaaagtc	360

```

gcaatgggca agatccaaga ttgctataac gaagcgggcg ttatcaccaa gatcagcgat      420
ctgatcatta tgggtacgat cacgaccagc ccggaatgta tctctcacgc gctgtccacc      480
5    ctgaccaccg acgtgcaaga gggcattagc aaactgaacc cgctgggtcg cctcgagcac      540
caccaccacc accac                                                         555

```

```

10    <210> 7
      <211> 185
      <212> PRT
      <213> Secuencia Artificial

```

```

15    <220>
      <223> Péptido monocatenario sintético

```

```

      <220>
      <221> INIT_MET
20    <222> (1)..(1)

```

```

      <220>
      <221> MISC_CARACTERÍSTICA
      <222> (93)..(107)
25    <223> Péptido enlazador

```

```

      <220>
      <221> MISC_CARACTERÍSTICA
      <222> (180)..(185)
30    <223> Etiqueta de hexahistidina

```

```

<400> 7
      Met Cys Pro Ser Phe Tyr Ala Val Leu Gly Val Leu Ser Leu Gly Ser
35      1          5          10          15

      Lys Thr Leu Leu Asp Thr Ser Leu Asn Leu Val Asn Ala Thr Glu Pro
40      20          25          30

      Glu Lys Val Ala Met Gly Lys Ile Gln Asp Cys Tyr Asn Glu Ala Gly
45      35          40          45

      Val Ile Thr Lys Ile Ser Asp Leu Ile Ile Met Gly Thr Ile Thr Thr
50      50          55          60

      Ser Pro Glu Cys Ile Ser His Ala Leu Ser Thr Leu Thr Thr Asp Val
55      65          70          75          80

      Gln Glu Gly Ile Ser Lys Leu Asn Pro Leu Gly Arg Gly Gly Gly Gly
60      85          90          95

      Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Cys Pro Ala
65      100         105         110

      Val Lys Glu Asp Val Asn Ile Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Asp Tyr

```

	115	120	125
5	Val Lys Lys Val Ser Gln Tyr Gln Arg Asn Pro Val Ile Leu Ala Asn 130 135 140		
10	Ala Glu Lys Leu Lys Asn Cys Ile Asp Lys Lys Leu Thr Ala Glu Asp 145 150 155 160		
15	Lys Glu Asn Ala Leu Ser Val Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ser Asp Phe 165 170 175		
20	Cys Leu Glu His His His His His His 180 185		
25	<210> 8 <211> 555 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
30	<220> <223> ADN que codifica péptido monocatenario sintético		
35	<400> 8		
40	atgtgcccgt cgttttatgc agtcctgggt gttctgtctt tgggttctaa aactttgctg 60		
45	gacacgagcc tgaatctggt gaatgcaacg gagcctgaaa aggtcgcgat gggcaagatt 120		
50	caggactgtt acaacgaagc gggcggttatt accaagatca gcgacctgat cattatgggc 180		
55	acgatcacca cgagcccaga gtgcctcagc cacgctttgt ccaccctgac caccgatgtc 240		
60	caagagggca ttagcaagct gaaccgcgtg ggtcgcggtg gtggcggtag cggtggtggt 300		
65	ggctccggtg gcggtggcag cgatatattgt ccggcggtga aagaagatgt caacatcttc 360		
70	ctgaccggtg ccccgatga ttatgtgaaa aaagttagcc aataccagcg taatccggtt 420		
75	atcctggcca atgccgagaa actgaagaac tgcctcgaca aaaagctgac cgcagaggac 480		
80	aaagaaaacg cgctgagcgt gctggagaag atttacagca gcgacttctg tctcgagcac 540		
85	caccaccacc accac 555		
90	<210> 9 <211> 210 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
95	<220> <223> Cadena 1 con codones optimizados		
100	<400> 9		
105	gacatttgcc ctgcggttaa agaggacgtc aacatttttc tgaccggtac cccagatgat 60		
110	tacgtcaaaa aagtgaacca gtaccagcgt aaccggtta ttctggcaaa tgccgagaaa 120		
115	ctgaagaatt gtatcgacaa aaagctgacg gctgaggata aggaaaacgc cctgtctgtc 180		
120	ttggagaaga ttacagcag cgacttctgt 210		

<210> 10
 <211> 273
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Cadena 2 con codones optimizados
 <400> 10
 10 tgcccgtcgt tttatgcagt cctgggtggt ctgtctttgg gttctaaac ttgctggac 60
 acgagcctga atctggtgaa tgcaacggag cctgaaaagg tcgcgatggg caagattcag 120
 15 gactgttaca acgaagcggg cgttattacc aagatcagcg acctgatcat tatgggcacg 180
 atcaccacga gccagagtg catcagccac gctttgtcca ccctgaccac cgatgtccaa 240
 gagggcatta gcaagctgaa cccgctgggt cgc 273
 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador directo para cadena 1, PCR 1
 <400> 11
 30 ataaaagggc tgcagaattg 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo para cadena 2, PCR 1
 40 <400> 12
 gcagcagaaa ccctgccctg 20
 <210> 13
 <211> 18
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo para cadena 1
 50 <400> 13
 gtgagcacct gccacctg 18
 <210> 14
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> Cebador directo para cadena 2
 <400> 14
 gaagagcatt ctagcagttg 20
 65 <210> 15
 <211> 19

<210> 21
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 5
 <400> 21
 Val Ser Gln Tyr Gln Arg
 1 5
 10
 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 15
 <400> 22
 Asn Pro Val Ile Leu Ala Asn Ala Glu Lys
 1 5 10
 20
 <210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 25
 <400> 23
 Leu Thr Ala Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Val Leu Glu Lys
 1 5 10 15
 30
 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 35
 <400> 24
 Ile Tyr Ser Ser Asp Phe Cys
 1 5
 40
 <210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 45
 <400> 25
 Cys Pro Ser Phe Tyr Ala Val Leu Gly Val Leu Ser Leu Gly Ser Lys
 1 5 10 15
 50
 <210> 26
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 55
 <400> 26
 Ile Gln Asp Cys Tyr Asn Glu Ala Gly Val Ile Thr Lys
 1 5 10
 60
 <210> 27
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 65
 <400> 27

Asp Ile Cys Pro Ala Val Lys Glu Asp Val Asn Ile Phe Leu Thr Gly
 1 5 10 15

5 Thr Pro Asp Asp Tyr Val Lys
 20

<210> 28
 <211> 16
 10 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 <400> 28

15 Glu Asp Val Asn Ile Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Asp Tyr Val Lys
 1 5 10 15

<210> 29
 <211> 17
 20 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 <400> 29

25 Glu Asp Val Asn Ile Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Asp Tyr Val Lys
 1 5 10 15

30 Lys

<210> 30
 <211> 7
 35 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 <400> 30

40 Lys Val Ser Gln Tyr Gln Arg
 1 5

<210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 45 <400> 31

Asn Pro Val Ile Leu Ala Asn Ala Glu Lys
 1 5 10

50 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 55 <400> 32

Leu Thr Ala Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Val Leu Glu Lys
 1 5 10 15

60 <210> 33
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 65 <400> 33

	Ile	Gln	Asp	Cys	Tyr	Asn	Glu	Ala	Gly	Val	Ile	Thr	Lys
	1				5					10			
5	<210> 34 <211> 7 <212> PRT <213> Equus caballus												
10	<400> 34 <div style="text-align: center;"> Asp Ile Cys Pro Ala Val Lys 1 5 </div>												
15	<210> 35 <211> 16 <212> PRT <213> Equus caballus												
20	<400> 35 <div style="text-align: center;"> Glu Asp Val Asn Ile Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Asp Tyr Val Lys 1 5 10 15 </div>												
25	<210> 36 <211> 7 <212> PRT <213> Equus caballus												
30	<400> 36 <div style="text-align: center;"> Lys Val Ser Gln Tyr Gln Arg 1 5 </div>												
35	<210> 37 <211> 6 <212> PRT <213> Equus caballus												
40	<400> 37 <div style="text-align: center;"> Val Ser Gln Tyr Gln Arg 1 5 </div>												
45	<210> 38 <211> 10 <212> PRT <213> Equus caballus												
50	<400> 38 <div style="text-align: center;"> Asn Pro Val Ile Leu Ala Asn Ala Glu Lys 1 5 10 </div>												
55	<210> 39 <211> 15 <212> PRT <213> Equus caballus												
60	<400> 39 <div style="text-align: center;"> Leu Thr Ala Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Val Leu Glu Lys 1 5 10 15 </div>												
65	<210> 40 <211> 7 <212> PRT <213> Equus caballus												

<400> 40

Ile Tyr Ser Ser Asp Phe Cys
1 5

5 <210> 41
<211> 13
<212> PRT
<213> Equus caballus

10 <400> 41

Ile Gln Asp Cys Tyr Asn Glu Ala Gly Val Ile Thr Lys
1 5 10

15 <210> 42
<211> 16
<212> PRT
<213> Equus caballus

20 <400> 42

Cys Pro Ser Phe Tyr Ala Val Leu Gly Val Leu Ser Leu Gly Ser Lys
1 5 10 15

25 <210> 43
<211> 24
<212> PRT
<213> Equus caballus

30 <400> 43

Ile Ser Asp Leu Ile Ile Met Gly Thr Ile Thr Thr Ser Pro Glu Cys
1 5 10 15

35 Ile Ser His Ala Leu Ser Thr Leu
20

40 <210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> Equus caballus

45 <220>
<221> DUDOSO
<222> (1)..(1)
<223> Asp o Cys

50 <220>
<221> DUDOSO
<222> (2)..(2)
<223> Pro, Ile o Cys

55 <220>
<221> DUDOSO
<222> (3)..(3)
<223> Ser, Arg o Cys

60 <220>
<221> DUDOSO
<222> (4)..(4)
<223> Phe, Pro o Cys

65 <220>
<221> DUDOSO
<222> (5)..(5)
<223> Tyr, Ala o Cys

<220>
 <221> DUDOSO
 <222> (6)..(6)
 <223> Ala, Val o Cys

5

<220>
 <221> DUDOSO
 <222> (7)..(7)
 <223> Val o Cys

10

<400> 44

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

15

<210> 45
 <211> 279
 <212> ADN
 <213> Equus caballus

20

<400> 45

atgaagcggg	ctggtgctct cgtgctgctc tggaccacct tgcttctgat cccaggcaga	60
aattgtgaca	tttgcccagc cgtgaaggaa gatgttaata tattcctgac aggaaccct	120
gatgactatg	ttaaaaaagt ttcacagtac caacgcaatc ctgtaatatt ggccaatgct	180
gaaaagctaa	agaactgcat tgataagaaa ttgacagccg aggataagga gaatgccctc	240
agtgtgctgg	agaaaatata ctcaagtgat ttttgtaa	279

30

<210> 46
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Equus caballus

35

<400> 46

atgaaggggg	cactgcttgt gctggccttg ctggtgacca gagagctggg catcaagatg	60
gcggaagctt	gcccagagttt ttatgcagtc cttggtgtgt tgtcccttgg aagcaagaca	120
ctgttgga	cctccctcaa tctggtcaat gctactgaac cggaaaaagt agccatggga	180
aaaatccagg	attgctacaa tgaggcggga gtcataacca agatctcgga tctgatcatc	240
atgggtacta	tcaccaccag ccagaaatgc atcagccacg cactgagcac attgacgacg	300
gatgttcaag	aaggcatttc taagctgaac cctctgggga gatga	345

50

<210> 47
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> Felis catus

55

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(18)

60

<400> 47

65

	Met	Leu	Asp	Ala	Ala	Leu	Pro	Pro	Cys	Pro	Thr	Val	Ala	Ala	Thr	Ala	
	1				5					10					15		
5	Asp	Cys	Glu	Ile	Cys	Pro	Ala	Val	Lys	Arg	Asp	Val	Asp	Leu	Phe	Leu	
				20					25					30			
10	Thr	Gly	Thr	Pro	Asp	Glu	Tyr	Val	Glu	Gln	Val	Ala	Gln	Tyr	Lys	Ala	
			35					40					45				
15	Leu	Pro	Val	Val	Leu	Glu	Asn	Ala	Arg	Ile	Leu	Lys	Asn	Cys	Val	Asp	
		50					55					60					
20	Ala	Lys	Met	Thr	Glu	Glu	Asp	Lys	Glu	Asn	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Asp	
	65					70				75						80	
25	Lys	Ile	Tyr	Thr	Ser	Pro	Leu	Cys									
					85												
	<210> 48																
	<211> 109																
	<212> PRT																
	<213> Felis catus																
30	<220>																
	<221> SEÑAL																
	<222> (1)..(23)																
	<400> 48																
35	Met	Arg	Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	Val	Thr	Gln	Ala	Leu	
	1				5					10				15			
40	Gly	Val	Lys	Met	Ala	Glu	Thr	Cys	Pro	Ile	Phe	Tyr	Asp	Val	Phe	Phe	
				20					25					30			
45	Ala	Val	Ala	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Ser	Leu	Thr	Lys	
			35					40					45				
50	Val	Asn	Ala	Thr	Glu	Pro	Glu	Arg	Thr	Ala	Met	Lys	Lys	Ile	Gln	Asp	
		50					55					60					
55	Cys	Tyr	Val	Glu	Asn	Gly	Leu	Ile	Ser	Arg	Val	Leu	Asp	Gly	Leu	Val	
	65					70				75						80	
60	Met	Thr	Thr	Ile	Ser	Ser	Ser	Lys	Asp	Cys	Met	Gly	Glu	Ala	Val	Gln	
					85					90					95		
65	Asn	Thr	Val	Glu	Asp	Leu	Lys	Leu	Asn	Thr	Leu	Gly	Arg				
						100				105							

REIVINDICACIONES

1. Una proteína que es una proteína heterodimérica aislada o una proteína monocatenaria, en donde una primera y una segunda cadena peptídica de la proteína heterodimérica; o la proteína monocatenaria; tienen una identidad global de secuencia de al menos el 70 % con las secuencias combinadas de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
2. Un fragmento de una proteína de acuerdo con la reivindicación 1, dicho fragmento comprende al menos un epítipo de anticuerpo IgE de una proteína heterodimérica que tiene una primera cadena peptídica que tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 3 y una segunda cadena peptídica que tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 4, y dicho fragmento tiene una longitud de al menos el 60 % de la longitud combinada de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
3. Una proteína o un fragmento de una proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que se ha inmovilizado en un soporte sólido o soluble y/o que se ha provisto de un marcador detectable.
4. Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de acuerdo con la reivindicación 1 o un fragmento de proteína de acuerdo con la reivindicación 2.
5. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Una célula huésped que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 5.
7. Un método para la evaluación *in vitro* de la alergia Tipo 1 que comprende las etapas de
- poner en contacto una muestra de fluido corporal que contiene inmunoglobulina de un paciente sospechoso de tener alergia Tipo 1 con una proteína o fragmento de proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2; y
 - detectar la presencia, en la muestra, de anticuerpos que se unen específicamente a dicha proteína, cadena peptídica o fragmento de proteína;
- en donde la presencia de tales anticuerpos unidos es indicativa de una alergia Tipo 1 en dicho paciente.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende detectar la presencia, en la muestra, de anticuerpos IgE y/o IgG que se unen específicamente a dicha proteína, cadena peptídica o fragmento de proteína; en donde la presencia de anticuerpos IgE específicos es indicativa de una alergia Tipo 1 al caballo en dicho paciente y el nivel de anticuerpos IgG específicos es informativo con respecto a la tolerancia natural o inducida al caballo a través de exposición ambiental o tratamiento de inmunoterapia.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, que comprende, además, las etapas de
- poner en contacto la muestra de fluido corporal que contiene inmunoglobulina del paciente sospechoso de tener alergia Tipo 1 con al menos otro componente alérgeno purificado de caballo; y
 - detectar la presencia, en la muestra, de anticuerpos IgE que se unen específicamente a dicho componente alérgeno purificado de caballo;
- en donde la combinación de la presencia de anticuerpos IgE que se unen específicamente a dicha proteína, cadena peptídica o fragmento de proteína, y la ausencia de anticuerpos IgE que se unen específicamente a dicho componente alérgeno de caballo, es indicativa de una alergia Tipo 1 al gato en dicho paciente.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el otro componente alérgeno purificado de caballo se selecciona del grupo que consiste en Equ c 1, Equ c 2, Equ c 3, Equ c 4/5 y Equ c 15k nativos y recombinantes.
11. Un kit para realizar el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-10, que comprende una proteína o un fragmento de proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 inmovilizada sobre un soporte sólido, y que además comprende un reactivo capaz de detectar anticuerpos unidos a dicha proteína o fragmento de proteína inmovilizada.
12. Una proteína o un fragmento de proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para su uso en métodos de diagnóstico de alergia Tipo 1, practicados en el cuerpo humano o animal.
13. Una proteína o fragmento de proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para su uso en métodos para la terapia de la alergia Tipo 1, practicados en el cuerpo humano o animal.

Figura 1

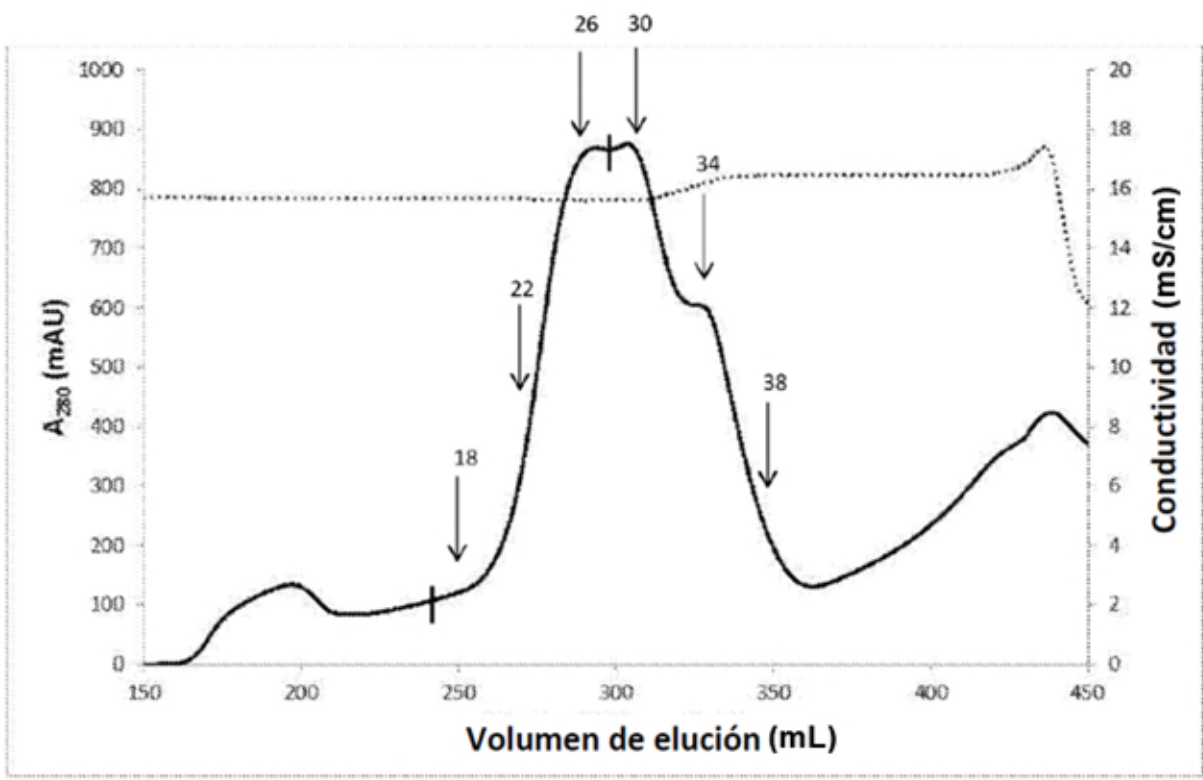


Figura 2

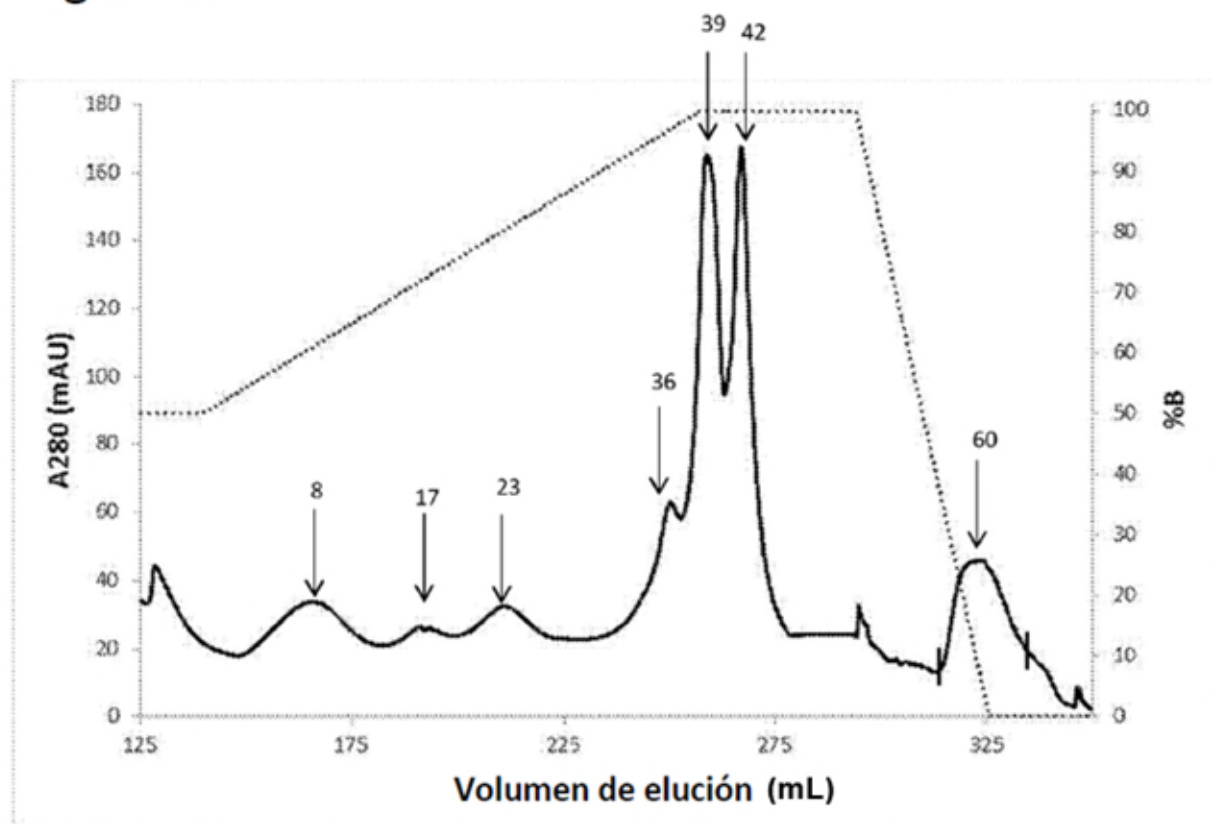


Figura 3

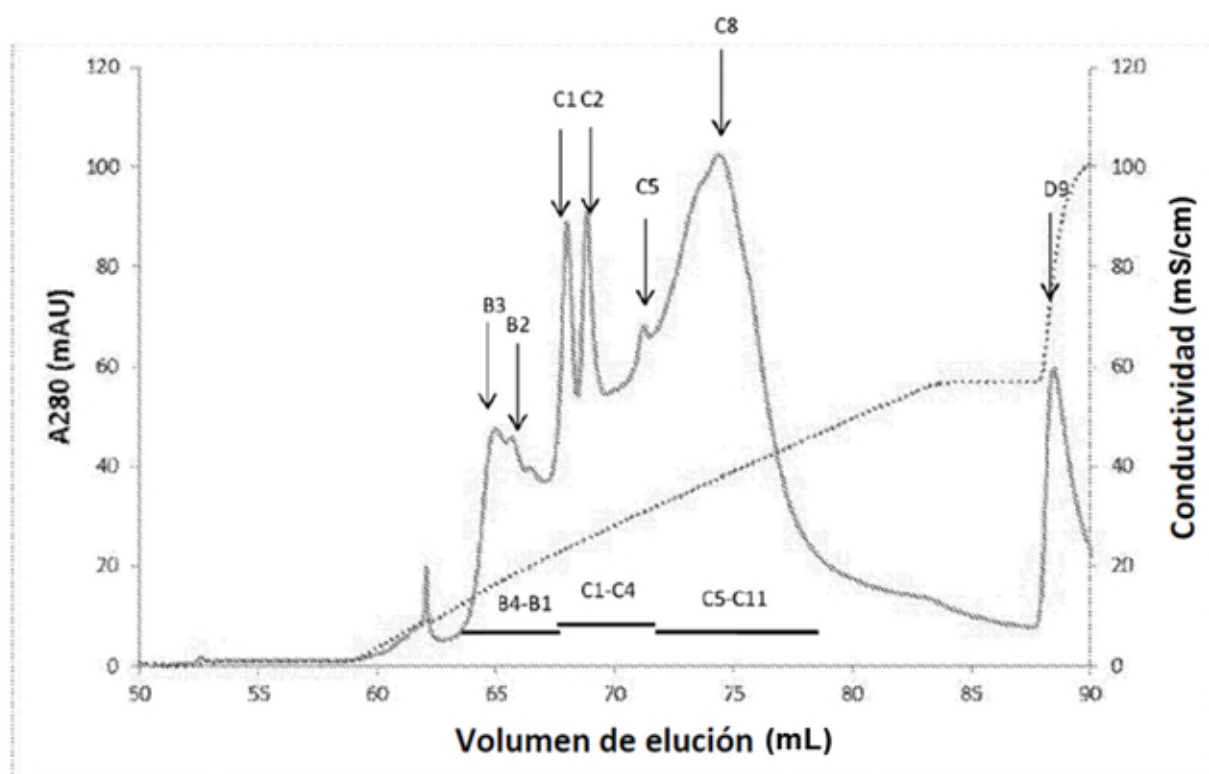


Figura 4

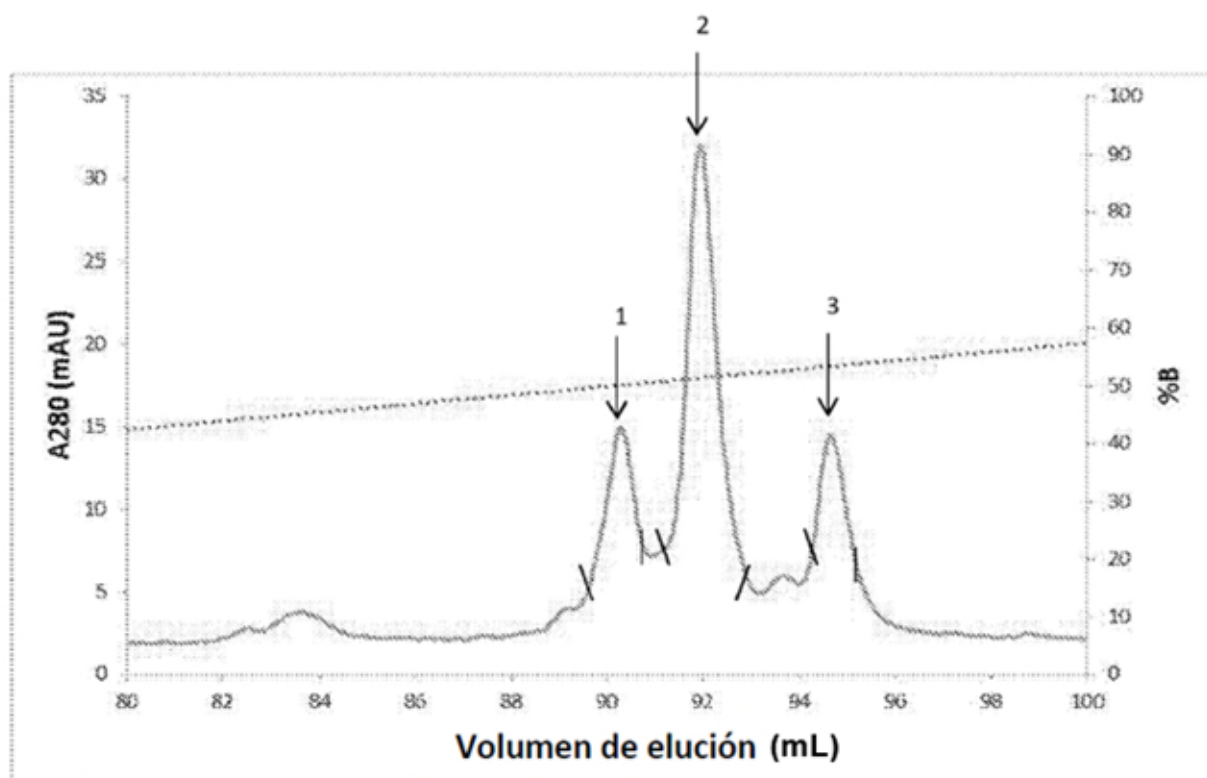


Figura 5

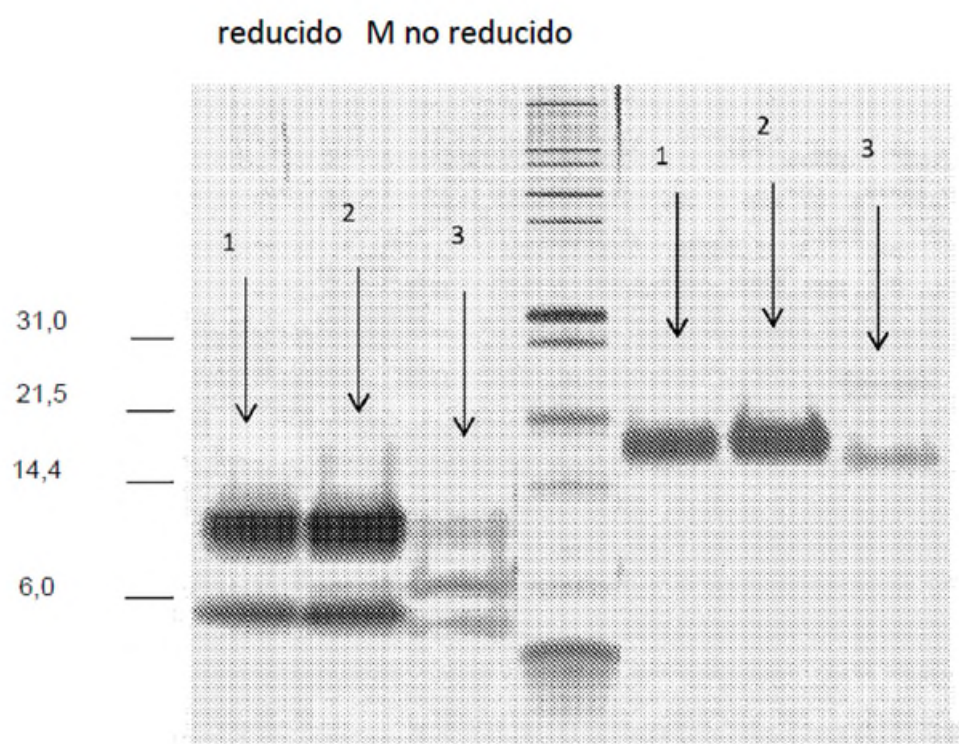


Figura 6

a)

ATGAAGCGGGCTGGTGCTCTCGTGCTGCTCTGGACCACCTTGCTTCTGA
TCCCAGGCAGAAATTGTGACATTTGCCAGCCGTGAAGGAAGATGTTAA
TATATTCCTGACAGGAACCCCTGATGACTATGTTAAAAAAGTTTCACAGT
ACCAACGCAATCCTGTAATATTGGCCAATGCTGAAAAGCTAAAGAACTG
CATTGATAAGAAATTGACAGCCGAGGATAAGGAGAATGCCCTCAGTGTG
CTGGAGAAAATATACTCAAGTGATTTTTGTAA (SEQ ID NO: 45)

b)

MKRAGALVLLWTTLLIPGRNCDICPAVKEDVNIFLTGTPDDYVKKVSQYQ
RNPVILANAELKNCIDKKLTAEDKENALSVLEKIYSSDFC (SEQ ID NO: 1)

c)

```
Equ c a 1 DICPAVKEDVNIFLTGTPDDYVKKVSQYQ RNPVILANAELKNCIDKKLTAEDKENALSV 60
+ICPAVK DV++FL GTPD YV++V+QY PV+LANA LKNC+D K+T EDKENALSV
Fel d 1 1 EICPAVKRDVDLELNGTPDKYVEQVAQYNARPVVLANAENLKNCVDKMTEDKENALSV 70

Equ c s 1 LEKIYSSDFC 70
L+KIY+S C
Fel d 1 1 LDKIYTSPLC 30
```

Figura 7

a)

ATGAAGGGGGCACTGCTTGTGCTGGCCTTGCTGGTGACCAGAGAGC
TGGGCATCAAGATGGCGGAAGCTTGCCCGAGTTTTTATGCAGTCCTT
GGTGTGTTGTCCCTTGGAAGCAAGACACTGTTGGACACCTCCCTCAA
TCTGGTCAATGCTACTGAACCGGAAAAAGTAGCCATGGGAAAAATCC
AGGATTGCTACAATGAGGCGGGAGTCATAACCAAGATCTCGGATCTG
ATCATCATGGGTACTATCACCACCAGCCCAGAATGCATCAGCCACGCA
CTGAGCACATTGACGACGGATGTTCAAGAAGGCATTTCTAAGCTGAA
CCCTCTGGGGAGATGA (SEQ ID NO: 46)

b)

MKGALLVLALLVTRELGIKMAEACPSFYAVLGVLSLGSKTLLDTSNLNVN
ATEPEKVAMGKIQDCYNEAGVITKISDLIIMGTITTSPECISHALSTLTDD
VQEGISKLNPLGR (SEQ ID NO: 2)

c)

```
Equ c s 2  CPSFYAVLGVLSLGSKTLLDTSNLNVNATEPEKVAMGKIQDCYNEAGVITKISDLIIMGT  60
CP FY V  ** G++ LLD SL  VNATEPE+ AM KIQDCY E G+I+++ D ++M T
Pel d 1 2  CPIFYDVFFAVANGNELLDLSLTKVNATEPERTAMKIQDCYVENGLISRVLDGLVMTT  83

Equ c s 2  ITTSPECISHALSTLTDDVQEGISKLNPLGR  91
I++S +C+ A+      D+      KLN LGR
Pel d 1 2  ISSKDCMGEAVQNTVEDI-----KLNTLGR  109
```

Figura 8

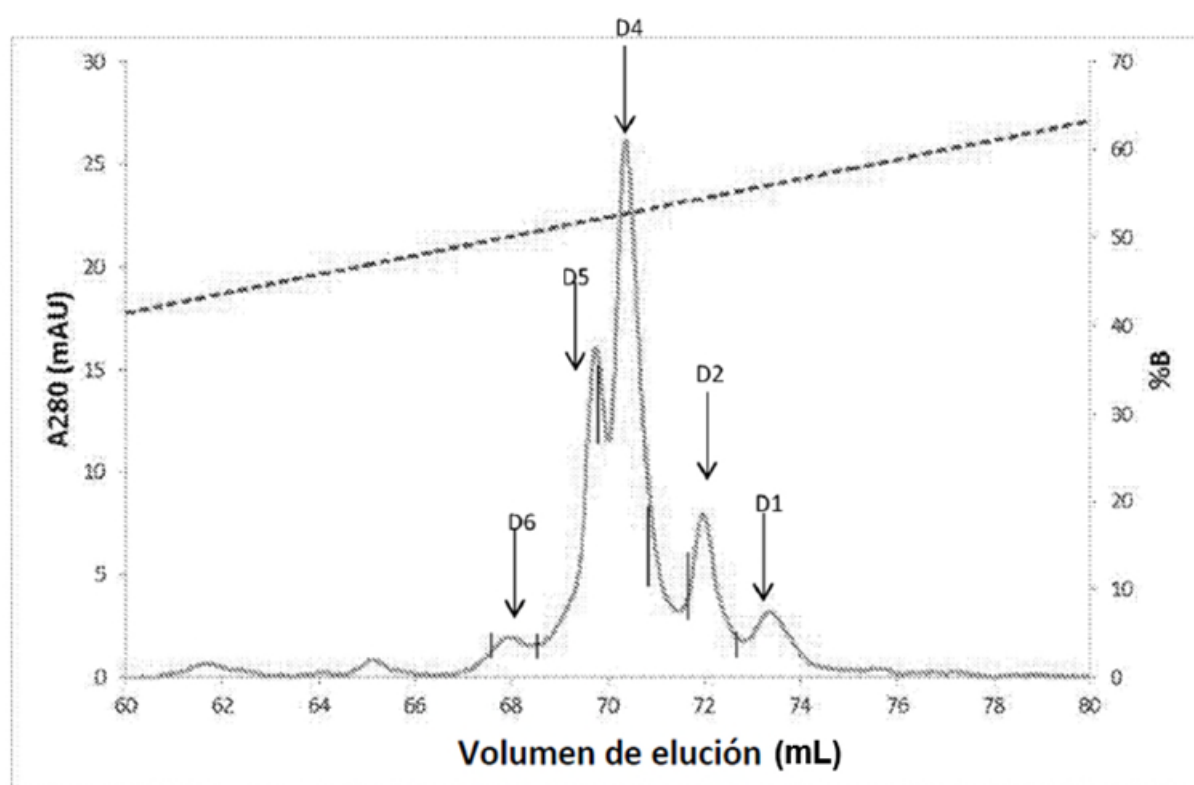
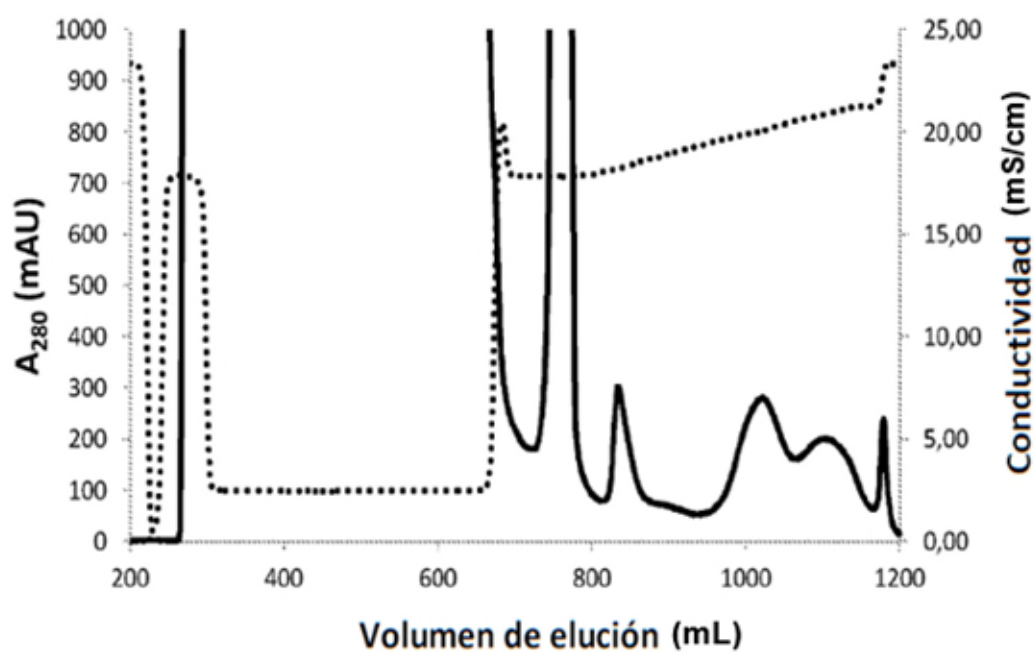


Figura 9

a) IMAC



a) AIEC

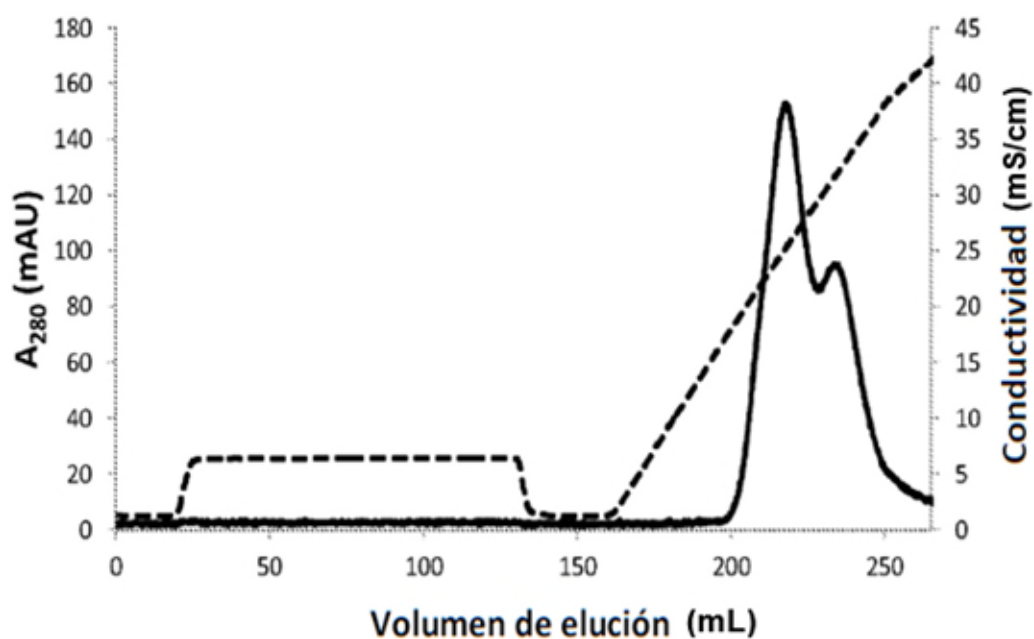
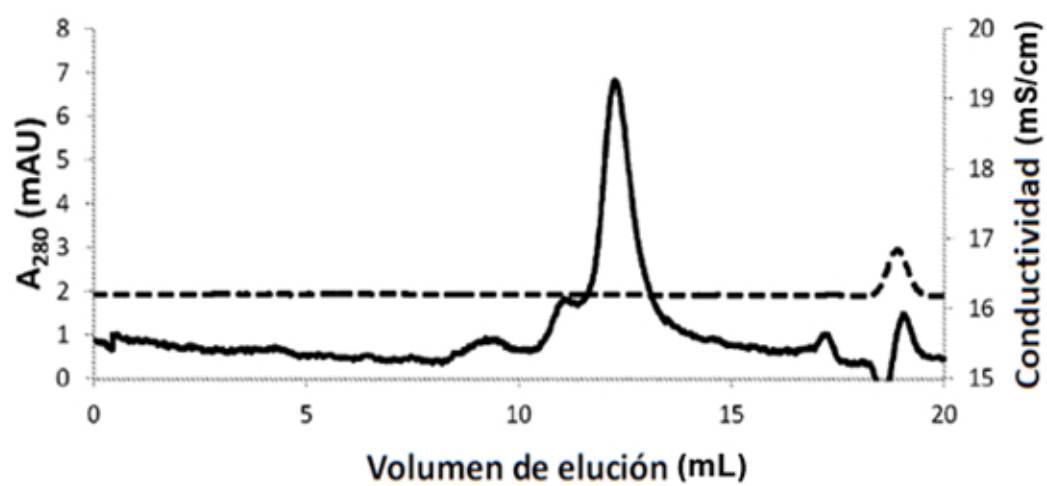


Figura 10

a) Pico 1



b) Pico 2

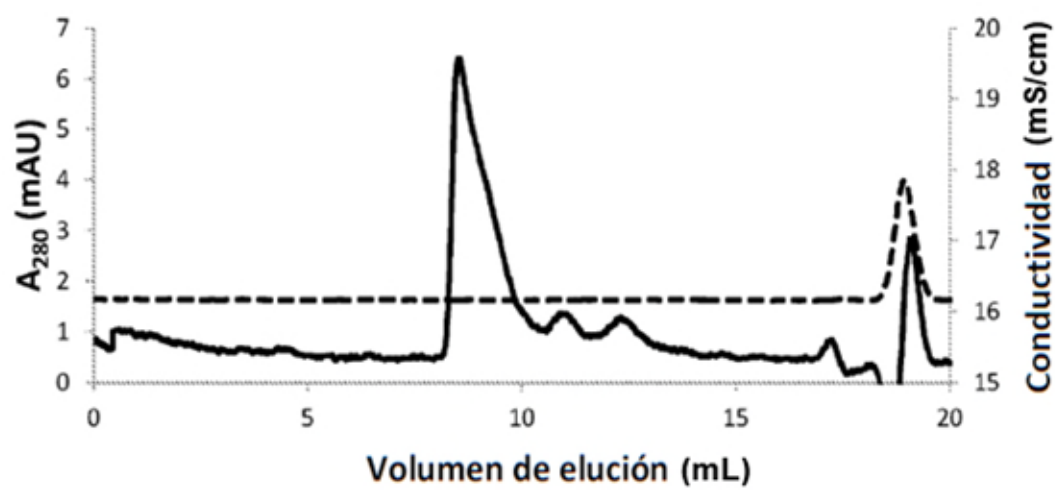


Figura 10 c)
SDS PAGE

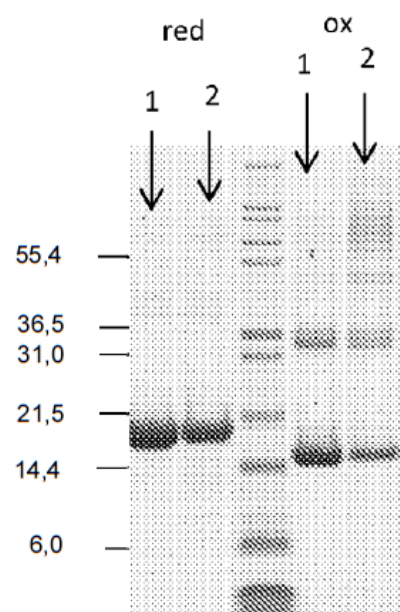


Figura 11

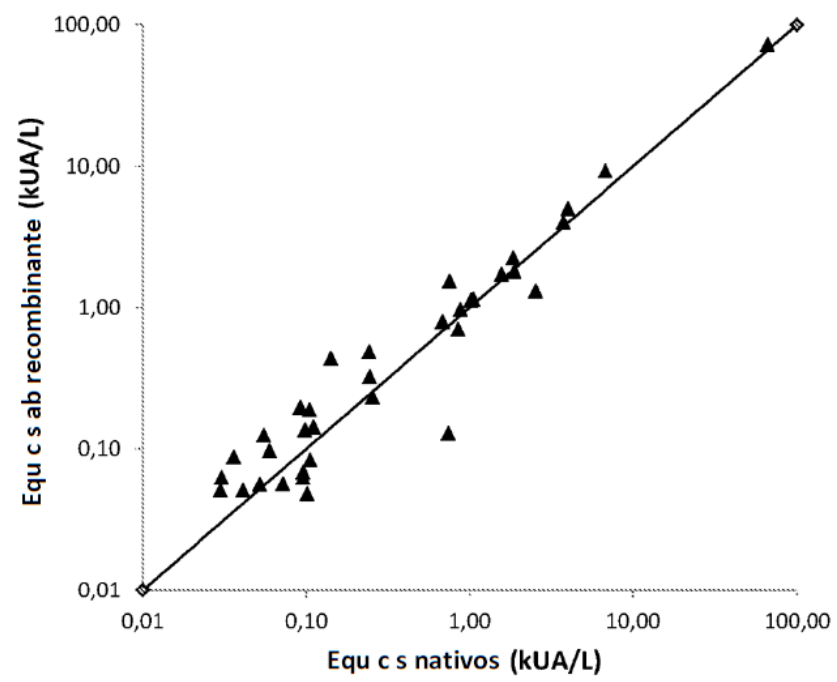


Figura 12

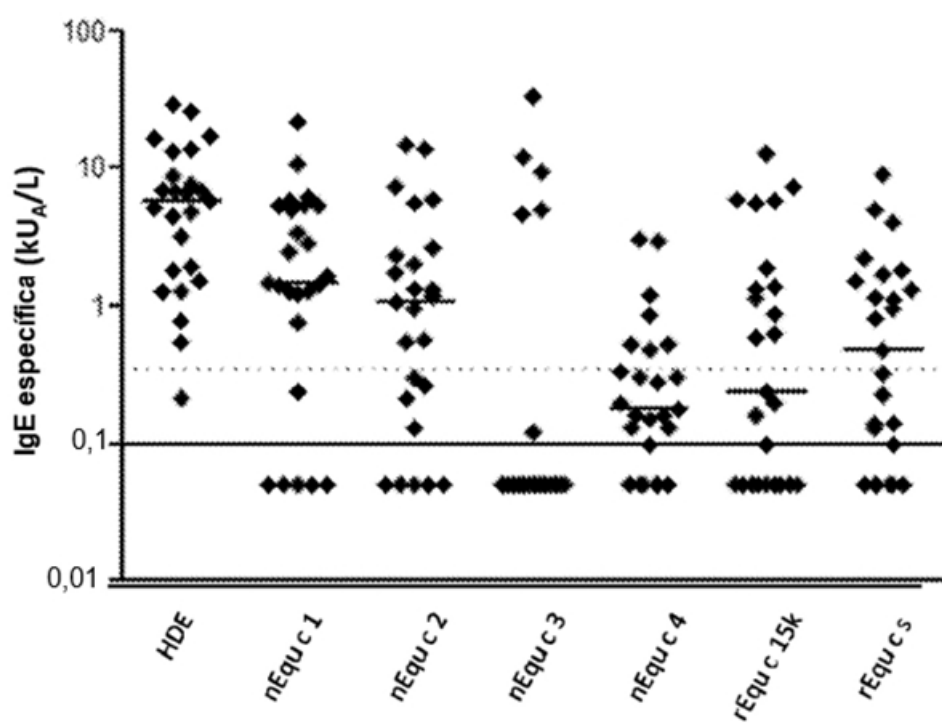


Figura 13

