

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 241**

51 Int. Cl.:

A61K 39/36 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
A61K 39/35 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2008 PCT/SE2008/051377**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2009 WO09070118**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2008 E 08854961 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2225266**

54 Título: **Nuevos alérgenos de trigo**

30 Prioridad:

30.11.2007 SE 0702680
30.11.2007 US 991338 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2017

73 Titular/es:

PHADIA AB (100.0%)
BOX 6460
751 37 UPPSALA, SE

72 Inventor/es:

VALENTA, RUDOLF;
CONSTANTIN, CLAUDIA y
QUIRCE, SANTIAGO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 634 241 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

Nuevos alérgenos de trigo

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la alergia mediada por IgE, particularmente al asma ocupacional tal como el asma de panadero. Más específicamente, la invención se refiere a la identificación de un nuevo alérgeno de trigo y su uso en terapia y diagnóstico. La invención también se refiere a métodos para el diagnóstico y el tratamiento de la alergia mediada por IgE en mamíferos.

Antecedentes

10 Los alérgenos del trigo (*Triticum aestivum*) pueden causar tres alergias distintas mediadas por IgE, alergia respiratoria por inhalación de harina de trigo, alergia alimentaria por ingestión de productos de trigo y alergia al polen de trigo que pertenece al grupo de alergias al polen de gramíneas. La sensibilización alérgica a los componentes de la harina de trigo es una de las causas más frecuentes del asma ocupacional y aproximadamente 1-10% de los trabajadores de la panadería están afectados, por lo que se denomina asma de panadero. Estos trabajadores de panadería desarrollan anticuerpos IgE contra alérgenos de harina de trigo y asma y/o rinitis inducidos por la harina.

15 La corroboración del supuesto de que el asma de panadero es una verdadera enfermedad ocupacional proviene del hallazgo de que la prevalencia de la sensibilización a los alérgenos asociados a la panadería es aproximadamente diez veces mayor en las personas expuestas a la harina en comparación con las poblaciones de control sin exposición a la harina. Además, ha sido posible establecer valores umbral para la harina de trigo que se sabe que causan asma bronquial en personas sensibilizadas. Una primera investigación sistemática sobre la alergia a la

20 la harina fue llevada a cabo ya en 1933 por Baggoe. Otros informes tempranos se centraron en la descripción de los casos de asma de panadero seguida de estudios mecánicos que demuestran la importancia de los mecanismos mediados por IgE en el asma de panadero. Posteriormente, se hicieron varios intentos para caracterizar los alérgenos de harina que provocan la enfermedad mediante métodos inmunoquímicos, tecnología RAST, inmunotransferencia y recientemente mediante técnicas de clonación molecular.

25 El *Triticum aestivum* es un miembro importante de la familia de las gramíneas. Hasta 40% de todos los individuos alérgicos portan anticuerpos IgE en suero que reaccionan con alérgenos del polen de gramíneas. Varios estudios han informado sobre la reactividad cruzada entre la harina de trigo y el polen de gramíneas debido a epítomos comunes de IgE en la harina de trigo y las proteínas del polen de las gramíneas. Se ha descrito la reactividad cruzada entre los alérgenos del polen de gramíneas y los alérgenos de semillas de trigo y hay evidencia de que los

30 pacientes que sufren asma de panadero y alergia alimentaria al trigo mediada por IgE pueden reconocer diferentes alérgenos que se pueden utilizar para el diagnóstico diferencial del asma de panadero, la alergia alimentaria a la harina de trigo y la alergia al polen de gramíneas. Sin embargo, la gran mayoría de los alérgenos solubles de harina de trigo aún no se ha identificado. Hoy en día, solamente se han identificado y se han caracterizado unos pocos alérgenos de la harina de trigo e incluyen los miembros de la familia de inhibidores de la alfa amilasa, la acil-CoA-

35 oxidasa, la peroxidasa, la fructosa-bifosfato aldolasa y recientemente las tiorredoxinas.

Palacin et al: "Wheat lipid transfer protein is a major allergen associated with baker's asthma", *Journal of allergy and Clinical Immunology*, Mosby, Inc, US, vol. 120, núm. 5, 1 de noviembre de 2007 (01-11-2007), páginas 1132-1138, XP022321003 describe la Proteína de Transferencia de Lípido (LTP), que también es conocida como "Tri a 14", como alérgeno inhalante de trigo principal asociado con el asma de panadero causada por harina de trigo. Ninguno

40 de los 40 pacientes con asma de panadero tenía síntomas después de ingerir productos derivados de trigo, por lo tanto este alérgeno no está asociado con la alergia alimentaria.

Bittner et al: "Identifications of wheat gliadins as an allergen family related to baker's asthma, *Journal of allergy and Clinical Immunology*, Mosby, Inc, US, vol. 121, núm. 3, 26 de noviembre de 2007 (26-11-2007), páginas 744-749, XP022506341 describe gliadinas de trigo como alérgenos relacionados con el asma de panadero, y sugiere el uso

45 de pruebas de IgE para la gliadina en el diagnóstico de la misma.

La Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2007/044171 describe polipéptidos recombinantes de *Triticum Aestivum*. Los polinucleótidos recombinantes y los polipéptidos recombinantes de la presente invención encuentran numerosos usos, por ejemplo en constructos de ADN recombinantes, en matrices físicas de moléculas, para su uso como marcadores de cultivo de plantas, y para su uso en sistemas informáticos de almacenamiento y análisis.

50 La Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2007/277269 describe polinucleótidos aislados, polipéptidos codificados de ese modo, y su uso para la elaboración de organismos transgénicos, tales como plantas, bacterias, levaduras, hongos y mamíferos, dependiendo de las características deseadas. Los genes y polinucleótidos de la presente invención tienen interés debido a que cuando son expresados erróneamente (es decir, cuando son expresados en exceso en una localización no natural o en una cantidad mayor) o cuando permiten el silenciamiento

55 de genes endógenos, producen plantas con importantes características modificadas como se comenta más abajo. Estos rasgos se pueden utilizar para explotar o maximizar los productos vegetales o para minimizar las características no deseadas.

De un modo similar al documento USP 2007/277269 comentado más arriba, la Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2007/039067 describe polinucleótidos aislados, polipéptidos codificados de ese modo, y su uso para elaborar organismos transgénicos. Los genes y polinucleótidos producen plantas con importantes características modificadas útiles para explotar o maximizar los productos vegetales.

- 5 La Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2006/107345 describe polinucleótidos, tales como secuencias de ADNc completas y/o secuencias de ADN genómico que abarcan genes completos, fragmentos de genes, y/o elementos reguladores de genes y/o regiones con otras funciones y/o regiones intergénicas de diferentes especies de plantas, particularmente maíz, trigo, soja, arroz y *Arabidopsis thaliana*, y otras plantas y/o mutantes, variantes, fragmentos o fusiones de dichos SDF y polipéptidos o proteínas derivados de los mismos.
- 10 El diagnóstico basado en el extracto de harina de trigo no discrimina entre los pacientes que sufren alergia respiratoria o alergia alimentaria al trigo. Por lo tanto, el diagnóstico preciso todavía depende de la exposición por inhalación específica en caso de alergia respiratoria a la harina de trigo y de la exposición alimentaria doble ciego controlada con placebo (DBPCFC en sus siglas en inglés) en caso de sospecha de alergia alimentaria y la cuestión está abierta y radica en si es posible identificar alérgenos que pueden ser utilizados para el diagnóstico selectivo y el
- 15 tratamiento de las diversas manifestaciones de la alergia inducidas por el trigo, tales como el asma de panadero, la alergia alimentaria y la polinosis. Por lo tanto, existe la necesidad de identificar nuevos alérgenos de trigo y establecer métodos y pruebas de diagnóstico para identificar específicamente pacientes que sufren alergia mediada por IgE, tales como alergias respiratorias, por ejemplo asma de panadero, con el fin de discriminarlos de los pacientes que sufren alergia alimentaria y/o alergia al polen. Además, existe la necesidad de utilizar tales nuevos
- 20 alérgenos de trigo para su uso en el tratamiento de la alergia mediada por IgE. La presente invención trata estas necesidades proporcionando nuevos alérgenos de trigo y su uso en terapia y diagnóstico. Además, la presente invención proporciona el uso de péptidos y proteínas conocidos en terapia y diagnóstico. Algunos de estos péptidos son conocidos de Gennaro S.D. et al., Biological Chemistry, abril 2005, 386:383-389; Número de acceso UNIPROT P82977; Número de acceso UNIPROT Q6W8Q2; documento US 7.214.786 y documento US2006/0107345.

25 **Compendio de la invención**

Como se ha indicado anteriormente, los pocos alérgenos de harina de trigo que se han identificado y caracterizado incluyen miembros de la familia de inhibidores de alfa-amilasa, acil-CoA-oxidasa, peroxidasa, fructosa-bifosfato aldolasa y tiorredoxinas. Hasta el momento no se han identificado alérgenos que puedan utilizarse para el diagnóstico y el tratamiento selectivos de diversas manifestaciones de la alergia inducidas por el trigo, tales como el

30 asma de panadero, la alergia alimentaria y la polinosis. Esto llevó a los autores de la presente invención a buscar nuevos alérgenos de trigo aún no identificados.

La presente invención satisface al menos parcialmente las necesidades de la técnica anterior proporcionando nuevos alérgenos de trigo y métodos para el diagnóstico y tratamiento de la alergia mediada por IgE en mamíferos.

En un primer aspecto, la invención se refiere a polipéptidos que representan nuevos alérgenos de trigo aislados de trigo o producidos de manera recombinante y fragmentos o variantes de los mismos que comparten epítopos para anticuerpos. Los polipéptidos aislados comprenden una secuencia de aminoácidos del clon núm. 10.

35

En un segundo aspecto, la invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la invención, teniendo los ácidos nucleicos la secuencia de nucleótidos del clon núm. 10.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que tiene identidad de clon núm. 38 para su uso en terapia o diagnóstico, preferiblemente terapia y diagnóstico de alergia mediada por IgE, tal como la alergia respiratoria a la harina de trigo, p.ej., asma de panadero. Además, la invención se refiere a un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos del clon núm. 37 para su uso en terapia o diagnóstico, preferiblemente terapia y diagnóstico de alergia mediada por IgE, tal como la alergia respiratoria a la harina de trigo, p.ej. asma de panadero.

40

En otro aspecto más, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido que tiene identidad con el clon núm. 10, núm. 38, núm. 126 o núm. 37 modificados para anular o atenuar su respuestas de unión a IgE, a la vez que es capaz de provocar una respuesta de IgG, y opcionalmente excipientes, portadores, tampones y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Dicha forma hipoalérgica de un polipéptido que tiene identidad con el clon núm. 10, núm. 38, núm. 126 o núm. 37 puede ser modificada por fragmentación, truncamiento o formación de tándems de la molécula, delección de segmentos internos, reordenamiento del dominio, sustitución de

45

50 residuos de aminoácidos, interrupción de puentes disulfuro.

También se describe una composición alérgica "reforzada" con un polipéptido que tiene identidad con el clon núm. 10, núm. 38, núm. 112, núm. 126 o núm. 37. Semejante composición alérgica puede ser un extracto alérgico o una mezcla de componentes alérgicos purificados o recombinantes que tienen un contenido nulo o bajo del polipéptido de la invención, en donde el polipéptido se añade para la unión a IgE de pacientes cuya IgE no se uniría o se uniría escasamente a los otros componentes alérgicos de la composición. También se describe un método para producir tal composición, cuyo método comprende la etapa de añadir un polipéptido que tiene identidad con el clon núm. 10, núm. 38, núm. 112, núm. 126 o núm. 37 a una composición alérgica, tal como un extracto alérgico (opcionalmente reforzado con otros componentes) o una mezcla de componentes alérgicos nativos

55

purificados o recombinantes.

Asimismo se describe una composición alergénica obtenible por el método anterior.

5 La invención se refiere adicionalmente a un método para el diagnóstico *in vitro* de la alergia mediada por IgE que comprende las etapas de llevar una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de sangre, plasma o suero, de un mamífero que se sospecha que tiene alergia mediada por IgE, tal como alergia respiratoria a la harina de trigo, p.ej. asma del panadero, en contacto con el polipéptido que tiene identidad con el clon núm. 10, núm. 38, núm. 126 o núm. 37, y detectar la presencia en la muestra de anticuerpos IgE que se unen específicamente a los polipéptidos de la invención. La presencia de tales anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido que tiene la identidad con el clon núm. 10, núm. 38, núm. 126 o núm. 37 es indicativa de alergia mediada por IgE. Una realización de tal método comprende llevar a cabo el método mediante análisis de micro-matrices.

10 En un aspecto adicional la invención proporciona un kit de diagnóstico para llevar a cabo el método de diagnóstico *in vitro* de la alergia mediada por IgE, tal como la alergia respiratoria a la harina de trigo, p.ej. asma de panadero, comprendiendo dicho kit un polipéptido que tiene identidad con el clon núm. 10 y métodos para detectar la unión a IgE de dicho polipéptido, tal como un soporte sólido, p.ej. una membrana de nitrocelulosa o una micromatriz que tiene un polipéptido con identidad con el clon núm. 10 unido a ellas.

15 También se describe un método para el tratamiento de una alergia mediada por IgE en un mamífero, tal como alergia respiratoria, p.ej. asma de panadero. El método comprende administrar a un individuo susceptible de tal tratamiento un polipéptido que tiene identidad con el clon núm. 10, núm. 38, núm. 112, núm. 126 o núm. 37 o un fragmento o una variante de los mismos que comparte epítomos para anticuerpos. El método comprende administrar a un individuo susceptible de tal tratamiento una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente.

Definiciones

Tabla A

Definición de clones

| Clon | Secuencia de ácido nucleico | Secuencia de aminoácidos |
|----------|-----------------------------|--------------------------|
| Núm. 10 | SEQ ID NO: 1 | SEQ ID NO: 2 |
| Núm. 37 | SEQ ID NO: 3 | SEQ ID NO: 4 |
| Núm. 38 | SEQ ID NO: 5 | SEQ ID NO: 6 |
| Núm. 112 | SEQ ID NO: 7 | SEQ ID NO: 8 |
| Núm.126 | SEQ ID NO: 9 | SEQ ID NO: 10 |

25 Las variantes y fragmentos de un polipéptido de la invención se deben interpretar como proteínas o péptidos con una longitud de al menos 10 aminoácidos, más preferiblemente al menos 25, incluso más preferiblemente al menos 50 ó 75 residuos de aminoácidos y una identidad de secuencia con dicho polipéptido de al menos 50%, preferiblemente más de 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Se debe considerar que un polipéptido ha sido modificado químicamente o genéticamente para cambiar sus propiedades inmunológicas, p.ej. como se ilustra en relación con la inmunoterapia.

30 Las variantes y fragmentos de un polipéptido que comparte epítomos para anticuerpos con dicho polipéptido deben interpretarse como aquellos fragmentos y variantes cuya unión a anticuerpos IgE de una muestra de suero de un paciente representativo sensibilizado con el polipéptido de la invención puede ser inhibida significativamente por el polipéptido. Semejante análisis de inhibición se puede realizar, por ejemplo, de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 4.

35 Un polipéptido modificado hipoalergénico o variante o fragmento de un polipéptido debe ser interpretado como un polipéptido modificado o una variante o fragmento de un polipéptido que no es capaz de unirse a anticuerpos IgE reactivos con dicho polipéptido a partir de una muestra de suero de un paciente sensibilizado con polipéptido representativo, como se determina, p.ej. mediante el protocolo de acuerdo con el Ejemplo 1 o que no muestra actividad biológica alergénica o muestra una actividad biológica alergénica significativamente reducida, como se determina mediante un análisis de activación celular tal como el análisis de liberación de histamina basófila.

Breve descripción de las tablas y figuras

La Tabla I muestra las características demográficas, clínicas y serológicas de pacientes que padecen asma de panadero.

La Tabla II muestra las características demográficas, clínicas y serológicas de pacientes que padecen alergia alimentaria al trigo (F1-F4) y alergia al polen de gramíneas (G1-G4).

La Tabla III muestra el porcentaje de identidades de secuencias de aminoácidos entre el alérgeno derivado del clon 10 y las proteínas homólogas, en donde las proteínas numeradas de 1 a 30 son las siguientes: 1. gi | 122065237 (*Triticum aestivum*), 2. gi | 66356278 (*Triticum aestivum*), 3. gi | 124122 (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*), 4. gi | 48093360 (*Zea diploperennis*), 5. gi | 48093418 (*Tripsacum dactyloides*), 6. gi | 75994161 (*Zea mays* subsp. *parviglumis*), 7. gi | 58396945 (*Oryza sativa* [grupo cultivar japonica]), 8. gi | 115649132 (*Strongylocentrotus purpuratus*), 9. gi | 37904392 (*Brachypodium distachyon*), 10. gi | 26224744 (*Citrus x paradise*), 11. gi | 224447 (*Vicia faba*), 12. gi | 124395862 (*Paramecium tetraurelia*), 13. gi | 50262213 (*Cucurbita maxima*), 14. gi | 547743 (*Nicotiana sylvestris*), 15. gi | 54610713 (*Lumbricus terrestris*), 16. gi | 169491 (*Solanum tuberosum*), 17. gi | 218290 (*Nicotiana glauca x Nicotiana langsdorffii*), 18 gi | 124121 (*Vigna angularis*), 19. gi | 603890 (*Sambucus nigra*), 20. gi | 14718445 (*Ipomoea batatas*), 21. gi | 114950 (*Momordica charantia*), 22. gi | 109138554 (*Fagopyrum esculentum*), 23. gi | 18404883 (*Arabidopsis thaliana*), 24. gi | 27734408 (*Canavalia lineate*), 25. gi | 37901103 (*Hevea brasiliensis*), 26. gi | 92874842 (*Medicago truncatula*), 27. gi | 13959383 (*Linum usitatissimum*), 28. gi | 22759723 (*Zinnia elegans*), 29. gi | 37359345 (*Vitis vinifera*) y 30. gi | 6453287 (*Amaranthus hypochondriacus*).

La Tabla IV muestra datos clínicos para los pacientes con asma de panadero del Ejemplo 2.

La Tabla V muestra los datos clínicos de los pacientes alérgicos a alimentos y polen de gramíneas del Ejemplo 2.

La Tabla VI muestra cebadores de PCR utilizados para la amplificación de ADNc para los clones núm. 10, núm. 38, núm. 112, núm. 123 núm. 126 y núm. 37.

20 Tabla VII. Características demográficas, clínicas y serológicas de pacientes que padecen asma de panadero

Tabla VIII. Características demográficas, clínicas y serológicas de pacientes que padecen alergia al polen de gramíneas

Tabla IX. Características demográficas, clínicas y serológicas de pacientes que padecen alergia alimentaria al trigo

25 La Figura 1 ilustra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida del alérgeno derivado del clon 10 (SEQ ID NO: 1). La región codificante y no codificante se encuentran en letras mayúsculas y minúsculas, respectivamente, los codones de inicio (ATG) y de parada están subrayados. Los aminoácidos de la firma de la familia I del inhibidor de patata se imprimen con fondo de color gris. Los números a la izquierda son para los nucleótidos y los números a la derecha para los aminoácidos. La secuencia se ha enviado a GenBank con el número de acceso (EU051824).

30 La Figura 2 ilustra la caracterización del alérgeno de tipo inhibidor de serina proteinasa purificado. A, SDS-PAGE teñida con azul brillante de Coomassie que contiene alérgeno derivado del clon 10 purificado. En el lado izquierdo se muestra un marcador de peso molecular (kDa). B, Espectrometría de masas (MS) del alérgeno derivado del clon 10 purificado. La razón masa/carga se muestra en el eje x y la intensidad se muestra en el eje y como un porcentaje de la señal más intensa obtenida en el intervalo de masa investigado. C, Análisis del dicroísmo circular (CD) ultravioleta lejano del alérgeno derivado del clon 10 purificado. Los espectros se expresan como las elipticidades medias de los residuos (θ) (eje y), registradas a 25°C (línea en negrita), 95°C (línea regular) y a 25°C después del enfriamiento (línea punteada) a longitudes de onda dadas (eje x).

35 La Figura 3 ilustra la reactividad de IgE de pacientes que padecen asma de panadero, alergia al polen de gramíneas y alergia alimentaria. Se puntuaron en tiras de membrana de nitrocelulosa el alérgeno derivado de clon 10 purificado, HSA, rPhl p 1, rPhl p 5, rPhl p 7, rPhl p 12, extracto de polen de trigo y extracto de semilla de trigo y se incubaron con sueros de 22 pacientes de asma de panadero (1-22), cuatro sueros alérgicos de polen de hierba (G1-G4), cuatro sueros de pacientes con alergia al trigo (F1-F4), un individuo no alérgico (NC) y tampón sin adición de suero (B). Los anticuerpos IgE unidos se detectaron con anticuerpos anti-IgE humanos marcados con ¹²⁵I y se visualizaron por autorradiografía.

45 La Figura 4 es una representación de diagramas de cajas de las reactividades de la subclase de IgG al alérgeno derivado del clon 10. Las reactividades de la subclase IgG₁₋₄ al alérgeno derivado del clon 10 se determinaron por medio de ELISA para los pacientes que padecían asma de panadero (n = 22) y se muestran como diagramas de cajas donde 50% de los valores están dentro de las cajas y los valores no anómalos entre las barras. Las líneas dentro de las cajas indican los valores de la mediana, los círculos son valores anómalos y los asteriscos valores extremos.

50 La Figura 5 ilustra la actividad alérgica del alérgeno derivado del clon 10. Las células RBL se cargaron con IgE de suero de tres pacientes con asma de panadero (núm. 2, núm. 4, núm. 12) o con suero de un paciente no alérgico (NC) y a continuación se expusieron al alérgeno derivado del clon 10 recombinante o alérgeno de polen de hierba timotea rPhl p 1. Las liberaciones medias de β -hexosaminidasa se muestran en el eje y como porcentaje de la liberación total después de restar los porcentajes para la liberación espontánea.

55 La Figura 6 muestra la expresión del alérgeno de tipo inhibidor de serina proteinasa en las semillas durante la

maduración de la semilla. Se sondeó extracto de trigo transferido a nitrocelulosa de semillas de trigo inmaduras (día 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35) y maduro (M) con anticuerpos de conejo específicos para el alérgeno derivado del clon 10, y como control, con el suero pre-inmune correspondiente. Los pesos moleculares se indican en el lado izquierdo en kiloDalton (kDa).

5 La Figura 7 muestra la identificación del alérgeno derivado del clon 10 en polen de trigo y extractos de semillas. Los extractos transferidos a nitrocelulosa se sondearon con anticuerpos de conejo específicos para el alérgeno derivado del clon 10 (20), anticuerpos específicos para la profilina de trigo (I núm. 123), para un alérgeno de ácaros (NC) o con tampón sin adición de anticuerpos de conejo (B). Los sueros preinmunes correspondientes se denominan P núm. 10 y P núm. 123, respectivamente. Los anticuerpos IgG unidos se detectaron con anticuerpos anti-conejo de burro marcados con ¹²⁵I y se visualizaron por autorradiografía. Los marcadores de peso molecular (en kDa) se indican a la izquierda.

15 La Figura 8 ilustra la detección del alérgeno de tipo inhibidor de serina proteinasa en extractos de semillas de trigo, arroz, maíz, judía y patata. A, gel teñido con azul de Coomassie que contiene extractos de trigo (W), arroz (R) y maíz (M), judía común (B) y patata (P). B, Los extractos transferidos a nitrocelulosa se expusieron a suero preinmune de conejo y C, Anticuerpos de conejo específicos para el alérgeno derivado del clon 10. Las masas moleculares (kDa) están indicadas en el lado izquierdo.

20 La Figura 9 muestra la localización del alérgeno derivado del clon 10 mediante microscopía electrónica de transmisión con inmunomarcaje con oro (Immunogold) en una semilla de trigo. A y B, Sección transversal de un grano de trigo a un aumento bajo (A) y alto (B). A muestra el fruto y la cubierta de la semilla (C), la capa de aleurona (AL) y el comienzo del endospermo amiláceo (SE). El rectángulo en A indica un área comparable al área mostrada en B, es decir, frontera entre capa de aleurona y el endospermo amiláceo. Los rectángulos en B indican áreas mostradas con gran aumento en C, D y E, F, respectivamente. C y D, Detalle de una célula de aleurona de semilla de trigo sondeada con anti-Ig derivada de clon 10 de conejo (C) o Ig preinmune (D). E y F, Micrografía de gran aumento del endospermo amiláceo después de la localización de la proteína de trigo 10 por inmunomarcaje con oro de anti-Ig derivada de clon 10 de conejo (E) o Ig preinmune (F). Los anticuerpos de conejo unidos se detectaron con un antisuero anti-conejo de cabra conjugado con oro (partículas de oro = puntos negros). Las flechas apuntan a partículas de oro coloidal. Las barras representan: A, 20 µm; B, 5 µm; C-F, 0,5 µm. AG, grano de aleurona; AL, capa de aleurona; C, fruto multicapa y cubierta de la semilla; CY, materiales citoplásmicos; L, cuerpo lipídico; M, mitocondria; SE, endospermo amiláceo; SG, grano de almidón; W, pared celular.

30 Figura 10. Transferencia Puntual de IgE de pacientes que padecen asma de panadero.

Figura 11. Transferencia Puntual de IgE de pacientes que padecen alergia alimentaria al trigo y alergia al polen de gramíneas.

35 Figura 12. Micromatrices de alérgenos. A, Esquema de aplicación de proteínas dispuestas en micromatrices y extracto de polen de trigo. Las proteínas de trigo recombinantes se designan como: 10, 37, 38, 112, 123, 126; WP: extracto de polen de trigo; alérgenos de polen de hierba timotea recombinante: Phl p 1, Phl p 5, Phl p 7 y Phl p 12. Los números en la caja en la parte inferior indican marcadores de posición. B y C, Imágenes de micromatrices después de la incubación con suero y detección de puntos reactivos con IgE con anticuerpos anti-IgE conjugados con fluoróforo. B, Imagen después de la incubación con suero de un individuo no alérgico. C, Imágenes después de la incubación con suero de un paciente representativo que padece asma de panadero (1: B4), alergia alimentaria inducida por trigo (2: F26), alergia al polen de gramíneas (3: G16). Los puntos en la parte inferior de los portaobjetos indican marcadores de posición que son anticuerpos IgE purificados detectados con anticuerpos anti-IgE conjugados con fluoróforo.

45 Figura 13. Prevalencia de la reactividad de IgE con proteínas de semilla de trigo, extracto de polen de trigo y alérgenos de polen de gramíneas. Los porcentajes de pacientes con reactividad de IgE se muestran para asma de panadero (A) (n=23), alergia alimentaria al trigo (B) (n=38) y alergia al polen de gramíneas (C) (n = 17) en el eje y. El eje x muestra las proteínas de trigo recombinantes sometidas a ensayo núm. 10, núm. 37, núm. 38, núm. 112, núm. 123 y núm. 126, extracto de polen de trigo, alérgenos de polen de gramíneas recombinante Phl p 1, Phl p 5, Phl p 7 y Phl p 12, una "Mezcla de Trigo" que comprende todas las proteínas de trigo recombinantes, harina de trigo y CAP de hierba timotea utilizados para medir la reactividad de IgE.

50 Descripción detallada de la invención

Los ejemplos siguientes ilustran la presente invención con el aislamiento y uso del polipéptido de la invención. Los ejemplos son sólo ilustrativos y no deben considerarse limitantes de la invención, que está definida por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. El clon núm. 123 mencionado en los Ejemplos es profilina, conocida, p.ej. del documento US 7.214.786.

55 Ejemplo 1 El nuevo clon núm. 10 de alérgeno de trigo

El Ejemplo 1 muestra la identificación y caracterización de un nuevo alérgeno de semilla de trigo, el clon núm. 10, perteneciente a la familia de inhibidores de la patata, una familia de inhibidores de serina proteasa, que junto con

otros inhibidores de proteasa son referidos como proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), familia PR6. El clon núm. 10 es el primer alérgeno identificado y descrito para la familia PR6. Además, el Ejemplo 1 muestra la expresión y purificación de un alérgeno derivado de clon 10 recombinante.

5 El clon núm. 10 fue reconocido específicamente por la IgE sérica de pacientes con asma de panadero pero no mostró reactividad con IgE cuando se sometió a ensayo con sueros de pacientes que padecían alergia al trigo, enfermedad celíaca o alergia al polen de gramíneas. Por lo tanto, el alérgeno derivado del clon 10 junto con otros alérgenos de trigo se puede utilizar para establecer ensayos de diagnóstico que permitan identificar específicamente pacientes que padecen asma de panadero mediada por IgE y para discriminar a estos pacientes de pacientes alérgicos con alergia a alimentos o a polen.

10 Técnicas

Materiales biológicos, sueros y anticuerpos de pacientes

Se obtuvieron semillas de trigo de *Triticum aestivum* cv. Michael de la Osterreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH y se plantaron en un invernadero. Las semillas inmaduras se cosecharon 7, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 días después del inicio de la polinización directamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso. El polen de trigo se obtuvo de Allergon (Vålinge, Suecia). El arroz, el maíz, las judías y las patatas se compraron en un mercado local. Se adquirieron Phl p 1, Phl p 5, Phl p 7 y Phl p 12 recombinantes de BIOMAY (Viena, Austria) y albúmina de suero humano (HSA) de Behring (Marburg, Alemania). Los sueros se obtuvieron de 22 pacientes con asma de panadero. El asma de panadero se diagnosticó sobre la base de un historial clínico positivo, IgE específica para harina de trigo y de centeno por el Sistema CAP-FEIA (Phadia, Uppsala, Suecia) y se incluyeron ensayos específicos de exposición por inhalación para la confirmación de una sensibilización clínicamente relevante (1). Los datos demográficos, clínicos y serológicos de estos pacientes se resumen en la Tabla I. Además, se incluyeron en los experimentos suero de un individuo no alérgico, sueros de 4 pacientes que padecían alergia alimentaria al trigo y 4 pacientes alérgicos al polen de gramíneas sin asma de panadero, pero con reactividad de IgE del suero con harina de trigo y centeno (Tabla II). Los sueros de pacientes alérgicos al polen de gramíneas se analizaron para determinar los niveles de IgE sérica total y de IgE específica de polen de hierba timotea por el Sistema CAP-FEIA (Phadia) y los pacientes con alergia alimentaria al trigo se han caracterizado como se ha descrito anteriormente (2). La especificidad del alérgeno derivado del clon 10 para el asma de panadero se confirmó mediante un ensayo adicional de 20 sueros de pacientes con enfermedad celíaca, 119 pacientes con alergia alimentaria, 23 sueros de pacientes alérgicos al polen de gramíneas y 25 pacientes con asma de panadero mediante análisis de chips (Constantin et al. no publicado).

Se originaron anticuerpos de conejo específicos contra el alérgeno derivado del clon 10 mediante inmunización de un conejo a intervalos mensuales con alérgeno derivado del clon 10 purificado (200 µg por inyección) utilizando una vez adyuvante completo de Freund y dos veces IFA (Charles River, Kisslegg, Alemania). Se obtuvo suero preinmune del conejo antes de la inmunización. Para fines de control, se utilizaron un suero inmune de conejo específico para un alérgeno de ácaros del polvo doméstico y antisuero de conejo específico para profilina de trigo.

Construcción de una biblioteca de ADNc de *λgt11* a partir de semillas de trigo

El ARN total se extrajo de acuerdo con Yeh (3) a partir de semillas de trigo, cosechadas veinticinco días después del inicio de la polinización, y almacenadas a -80°C. A continuación, el sedimento de ARN se disolvió en tampón de isotiocianato de guanidinio (isotiocianato de guanidinio 4 M, 0,83% v/v acetato de sodio 3M, pH 6, β-mercaptoetanol 11 mM) y se purificó por ultracentrifugación con gradiente de densidad de cloruro de cesio (4). Se aisló el ARN Poli-A⁺ mediante cromatografía de afinidad en celulosa con oligo-dT (Nucleo Trap mRNA; Machery-Nagel) y se sintetizó ADNc de doble cadena con un kit de síntesis de ADNc (cDNA synthesis System; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Después de la metilación con metilasa de *EcoRI* (New England Biolabs, Beverly, MA), se añadieron conectores *EcoRI* (New England Biolabs) al ADNc. El ADNc conectado se digirió con *EcoRI* (Roche Diagnostics). Los conectores digeridos se retiraron con una columna Nick (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y el ADNc se ligó en los brazos de *λgt11* (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.). El producto de ligación se empaquetó *in vitro* (Gigapack III Gold Cloning Kit, Stratagene) dando como resultado una biblioteca de ADNc de expresión en *λgt11* con 2,43 x 10⁶ UFP.

Aislamiento y caracterización de clones reactivos con IgE de una biblioteca de ADNc de semilla de trigo

50 Se infectaron *E. coli* Y1090 con 7x10⁵ UFP de fagos recombinantes y se sometieron a inmunoescrutinio con IgE de suero de cuatro pacientes (núm. 1, núm. 2, núm. 4, núm. 12) que padecían asma de panadero como se ha descrito (5). Se seleccionaron quince clones de fago reactivos con IgE para volver a clonar adicionalmente y su ADN se amplificó por PCR utilizando Platinum PCR Supermix (Invitrogen, Life Technologies) con cebadores de *λgt11* y se secuenció (MWG, Ebersberg, Alemania). Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias presentadas a la base de datos GenBank en el Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI). El alineamiento de secuencias múltiples se realizó utilizando la base de datos GenBank en el NCBI. Para las identidades de las secuencias de aminoácidos se utilizó la herramienta de alineamiento múltiple Clustal W. Se realizó una búsqueda de motivos con la herramienta PROSITE del servidor proteómico ExpASY, para la composición de aminoácidos se

utilizó la herramienta ProtParam de ExPASy. La predicción de accesibilidad a los disolventes y de la estructura secundaria se calculó utilizando el soporte lógico PROT del Centro de Bioinformática de la Universidad de Columbia. Se reconstruyó un árbol filogenético basado en la secuencia de aminoácidos del alérgeno derivado del clon 10 y proteínas homólogas utilizando el soporte lógico de "Alineamiento Múltiple y Reconstrucción de Árbol Filogenético" proporcionado por el Instituto Max Planck para Genética Molecular.

Expresión y purificación del alérgeno recombinante derivado del clon 10

La región codificante del ADNc del clon 10 se amplificó mediante PCR utilizando el siguiente par de cebadores: directo 5'-CATATGAGCCCTGTGGTGAAGAAGCCGGAGGGA-3' e inverso, 5'-GAATTCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGGCCGACCCTGGGGAC-3' (MWG). El producto de PCR contenía sitios de restricción *NdeI* (cursiva), *EcoRI* (subrayado) y una secuencia que codificaba una etiqueta de hexahistidina (en negrita). El producto de PCR se subclonó en un vector AccepTor (Novagen, Madison, WI) y se secuenció de nuevo (MWG). A continuación, el inserto se cortó del vector AccepTor con *NdeI* y *EcoRI* (Roche Diagnostics), se purificó en gel (Promega, Madison, WI, EE.UU.) y se subclonó en el plásmido de expresión pET 17b (Novagen). La secuencia de ADN se confirmó mediante secuenciación de ambas hebras de ADN (Microsynth, Balgach, CH). El constructo pET 17b-clon 10 se transformó en *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene) y se hizo crecer en medio Caldo Luria (17) que contenía 100 mg/l de ampicilina a 37°C hasta una DO (600 nm) de 0,8-1. La expresión de la proteína se indujo por la adición de isopropil β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0,5 mM y crecimiento de las bacterias durante 3 h adicionales. Las bacterias se cosecharon por centrifugación y se homogeneizaron en imidazol 25 mM, pH 7,5, Triton X-100 al 0,1% (v/v) con Ultraturax (IKA, Stauffen, Alemania). El ADN se digirió por adición de ADNasa I, se agitó durante 10 minutos adicionales a 20°C, se detuvo la reacción con 200 µl de NaCl 5 M y después se centrifugó a 4°C (6000 xg, 20 min). La mayoría del alérgeno derivado del clon 10 se encontró en la fracción insoluble del extracto bacteriano. El alérgeno derivado del clon 10 se purificó a partir del sedimento que contenía el cuerpos de inclusión en condiciones de desnaturalización utilizando columnas de afinidad de resina Ni-NTA de acuerdo con el manual QIAexpressionist (QIAGEN, Hilden, Alemania). Las fracciones que contenían el alérgeno recombinante se reunieron y se sometieron a diálisis frente a NaH₂PO₄ 10 mM a pH 7,5. La concentración de proteína se determinó con un Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL).

ELISA

El alérgeno derivado del clon 10 se disolvió en PBS a una concentración de 5 µg/ml y se aplicó como recubrimiento sobre placas ELISA (Nunc Maxisorb, Roskilde, Dinamarca). Después de bloquear con BSA al 1% (p/v) en PBS, Tween 20 al 0,05% (v/v) (PBST), las placas se incubaron con sueros diluidos a 1:50 en PBST, BSA al 0,5% (p/v) para la medición de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 como se ha descrito (6). Los anticuerpos unidos se detectaron incubando primero con anticuerpos monoclonales de subclase anti-IgG humana de ratón (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) diluidos 1:1000 en PBST, BSA al 0,5% (p/v) y después con un antisuero anti-ratón de oveja acoplado a peroxidasa rábano picante (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) diluido 1:2000 en PBST, BSA al 0,5% (p/v) como se describió anteriormente (2). Todas las determinaciones se realizaron como duplicados y los resultados se expresaron como valores medios.

Extractos de proteínas, SDS-PAGE e inmunotransferencias

Se prepararon extractos de proteína-SDS de semillas maduras e inmaduras de trigo, arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*), judía común (*Phaseolus vulgaris*) y patata (*Solanum tuberosum*) por homogeneización de 3 gramos de tejido en 32 ml de tampón de muestra 6) y posterior ebullición durante 10 minutos. Con el fin de eliminar las partículas insolubles, los extractos se centrifugaron a 10.000 xg durante 10 min a 4°C y los sobrenadantes se almacenaron en alícuotas a -20°C. Además, se preparó un extracto de proteína-PBS de semillas de trigo como se describió anteriormente (2). Se extrajo polen de *Triticum aestivum* (500 mg) a 4°C durante la noche en 5 ml de PBS, EDTA 2 mM, PMSF 1 mM. Después de la centrifugación durante 1 h a 13.000 xg a 4°C, se determinó la concentración de proteína del sobrenadante con Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce) y se almacenaron alícuotas a -20°C hasta su uso. Se separaron cantidades iguales de extractos de proteína-SDS por medio de geles de poliacrilamida-SDS preparativos al 14% (7). Se utilizó como patrón un marcador de peso molecular de proteína (Rainbow Marker, GE Healthcare, Precision Plus Protein Standard, BioRad, Herkules, CA, Page Remed Pre-stained Protein Ladder, Fermentas, Burlington, Ontario). Después de la separación electroforética, las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie o se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa (Schleich & Schuell, Dassel, Alemania) (8). Las membranas se bloquearon en tampón A (tampón de fosfato sódico 50 mM, pH 7,4, BSA al 0,5% p/v, Tween 20 al 0,5% v/v, NaN₃ al 0,05% p/v) dos veces durante 10 min y una vez durante 30 min y se incubaron durante la noche a 4°C con un antisuero de conejo específico para el alérgeno derivado del clon 10, el suero preinmune correspondiente, y para fines de control, con un antisuero de conejo específico para un antígeno no relacionado o tampón solo. Los sueros de conejo se diluyeron a 1:50.000 en tampón A. Se detectaron los anticuerpos unidos con anticuerpos anti-conejo de burro marcados con ¹²⁵I diluidos en tampón A 1:2000 (GE Healthcare) durante 2h a temperatura ambiente y se visualizaron en películas Kodak XOMAT con filtros intensificadores (Kodak, Heidelberg, Alemania) a -70°C. Para los experimentos de transferencia puntual de IgE, se aplicaron 100 ng de alérgeno derivado del clon 10 recombinante y alérgenos de polen de gramíneas recombinantes, Phl p 1, Phl p 5, Phl p 7 y Phl p 12, así como 3 µg de extracto de polen de trigo y 2 µg de extracto en PBS de semilla de trigo madura sobre una membrana de nitrocelulosa. Las tiras de nitrocelulosa se bloquearon con tampón A y se expusieron a los sueros del paciente a

una dilución 1:10 en tampón A durante la noche a 4°C. Los anticuerpos IgE unidos se detectaron con anticuerpos anti-IgE humana marcados con I^{125} (RAST RIA, Demeditec Diagnostics, Alemania) diluidos 1:20 en tampón A durante la noche a la temperatura ambiente y se visualizaron mediante autorradiografía utilizando películas Kodak XOMAT con filtros intensificadores (Kodak) a -70°C.

5 Análisis de MS y CD del Clon 10 recombinante

So obtuvieron los espectros de masas de desorción láser en un modo lineal con un aparato TOF Compact MALDI II (Kratos, Manchester, Reino Unido, piCHEM, Research and Development, Graz, Austria). Las muestras se disolvieron en acetonitrilo al 10% (ácido trifluoroacético al 0,1%) y se utilizó como matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (disuelto en acetonitrilo al 60%, ácido trifluoroacético al 0,1%). Para la preparación de la muestra se depositó una mezcla 1/1 de proteína y solución de matriz sobre la diana y se secó al aire.

Las mediciones de CD se realizaron con un alérgeno derivado de clon 10 purificado (en H_2O) a una concentración de proteína de 0,1 mg/ml en un espectropolarímetro Jasco J-810 (Tokio, Japón) utilizando una cubeta rectangular de cuarzo con una longitud de la trayectoria de 0,2 cm. Los espectros de CD del UV lejano se registraron de 190 nm a 260 nm con una resolución de 0,5 nm a una velocidad de barrido de 50 nm/min y fueron el resultado del promedio de tres barridos. Los resultados se expresan como la elipticidad media de residuos (θ) a una longitud de onda dada. Los barridos de temperatura se realizaron de acuerdo con un procedimiento de barrido por etapas, en el que la muestra se calentó de 25°C a 95°C con una velocidad de calentamiento de 2°C/min y se enfrió de nuevo a 25°C a la misma velocidad. Todos los espectros de longitud de onda continua de 5°C se registraron con los parámetros especificados. Además, los barridos de temperatura se registraron a 215 nm con una resolución por etapas de 0,5°C. Los resultados se expresan como la elipticidad media de residuos molares (θ_{MRE}) a una longitud de onda dada. Los espectros finales se corrigieron restando el correspondiente espectro del momento inicial obtenido en condiciones idénticas. El contenido de la estructura secundaria del alérgeno derivado del clon 10 se calculó utilizando el programa de estimación de la estructura secundaria CDSSTR (9).

Análisis de leucemia basófila humana en rata (huRBL)

Para la cuantificación de las reacciones de tipo inmediato, mediadas por Ab IgE, se llevaron a cabo análisis de liberación de mediador celular de huRBL. Las células RBL (clon RBL-703/21) transfectadas con Fc ϵ RI humano (10) se cultivaron en RPMI 1640 con un suplemento de FCS al 5%, L-Glutamina 4 mM y 1 mg/ml de sulfato de G418. Se recogieron las células después de la incubación con tripsina/EDTA, se lavaron, se re-suspendieron en medio de cultivo, y la concentración celular se ajustó a 2×10^6 células/ml. Se añadieron alícuotas de cincuenta μ l de la solución de células a los pocillos de una microplaca de 96 pocillos de fondo plano (la densidad de células/pocillo fue de 1×10^5 células). Los sueros humanos se diluyeron 1:10 en medio de cultivo, se añadieron a las células y se incubaron durante la noche a 37°C, CO_2 al 7%, 95% de humedad relativa. El medio se eliminó y las placas se lavaron 3 veces con 200 μ l/pocillo de tampón de Tyrode + BSA al 0,1%. Para el entrecruzamiento de IgE, se añadieron a las células 100 μ l del alérgeno derivado del clon 10 o rPhl p 1, (0,3 μ g/ml), se diluyeron en tampón de Tyrode que contenía D_2O al 50% y BSA al 0,1% (p/v). Para la liberación espontánea, se añadió a los pocillos tampón de Tyrode sin proteína. La liberación total se determinó mediante la adición de tampón de Tyrode que contenía Triton X-100 al 10%. Después de la incubación a 37°C, CO_2 al 7%, 95% de humedad relativa durante 1 hora se recogieron las células por centrifugación y se transfirieron 50 μ l de sobrenadante a una nueva placa, y se añadieron 50 μ l de solución de análisis (Ácido Cítrico o Citrato de Sodio 0,1M, pH 4,5 y 4-metil-umbeliferil-N-acetil- β -D-glucosaminida 160 μ M) por pocillo. Después de otra incubación de una hora, la reacción se detuvo añadiendo 100 μ l de tampón de glicina (glicina 0,2 M, NaCl al 0,2%, pH 10,7) a cada pocillo. La fluorescencia se midió a λ_{ex} : 360/ λ_{em} : 465 en un lector de microplacas de fluorescencia. La liberación espontánea se determinó a partir de los pocillos de control que no habían sido lisados por Triton X-100. La liberación específica se calculó utilizando la fórmula: (muestra-espontánea/total-espontánea) x 100.

45 Microscopía electrónica con inmunomarcaje con oro

Los granos secos de trigo se cortaron en trozos pequeños (cubos de aproximadamente 0,5 mm de tamaño) con una cuchilla afilada. Con el fin de preservar el estado seco de las células, los cubos se fijaron de forma anhidra en vapor de acroleína durante 5 días a temperatura ambiente. Se transfirieron a temperatura ambiente durante 1 día a dimetoxipropano (DMP) para eliminar cualquier agua residual y se incrustaron en Resina Lowicryl K4M utilizando series ascendentes de DMP:etanol y etanol:Lowicryl K4 M monomérico como etapas intermedias. La polimerización se realizó a -35°C.

Se cortaron secciones ultrafinas de tejidos del grano tanto periféricos como centrales y se colocaron sobre rejillas de plata para los procedimientos de inmunomarcaje.

El marcaje para el alérgeno derivado del clon 10 se realizó en una cámara húmeda a temperatura ambiente (tampón PBS + BSA al 1% (p/v), pH 7,4, tampón Tris + BSA al 1% (p/v), pH 8,2) como sigue: BSA al 1,5% (p/v) en tampón PBS, 15 minutos; 2. Anticuerpos de conejo anti-proteína de trigo 10 y anticuerpos pre-inmunes, diluidos 1:35 en tampón PBS, 2 horas; 3. Tampón PBS, 5 minutos, tampón Tris, 2 x 5 minutos; 4. anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo acoplados a partículas de oro coloidal de un tamaño de 10 nm (BioCell, Piano, Wetzlar, Alemania), diluidos

1:20 en tampón Tris; 5. Tampón Tris, 1 x 5 minutos, agua destilada, 2 x 5 minutos. Las secciones se tiñeron utilizando acetato de uranilo (5 minutos) y citrato de plomo (10 segundos).

Las muestras se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión EM 410 (FEI, Eindhoven, Países Bajos).

Resultados

5 Aislamiento y caracterización de un ADNc de trigo que codifica un alérgeno de tipo inhibidor de serina proteinasa

Se escrutó una biblioteca de expresión de ADNc de semilla de trigo con anticuerpos IgE de cuatro pacientes que padecían asma de panadero. El marco de lectura abierto del ADNc del clon 10 reactivo con IgE contenía 262 nucleótidos que codificaban un polipéptido de 84 aminoácidos (Fig. 1). Se calculó una masa molecular de 9,4 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de 6,08 de acuerdo con la secuencia de aminoácidos deducida para el alérgeno derivado del clon 10. El análisis de la composición de aminoácidos mostró un alto contenido de residuos de valina (15,5%) y ausencia de residuos de cisteína. De acuerdo con el análisis de la estructura secundaria asistido por ordenador, el alérgeno derivado del clon 10 consiste principalmente en espirales aleatorias y láminas beta y un dominio alfa-helicoidal. De acuerdo con los cálculos de accesibilidad del disolvente, casi 80% de los aminoácidos están expuestos al disolvente. Una búsqueda de motivos de secuencia reveló la presencia de un potencial sitio de fosforilación de caseína quinasa II (aminoácido 32), dos sitios de miristoilación N-terminal (aminoácidos 11, 55) y una firma de la familia de inhibidor I de patata (Fig. 1: los aminoácidos 25-36 están recuadrados). Una comparación de la secuencia de aminoácidos derivada del clon 10 con secuencias depositadas en la base de datos de NCBI mostró que el alérgeno es casi idéntico a un precursor de WSCI del inhibidor de subtilisina-quimotripsina de *Triticum aestivum* (núm. de acceso gi | 122065237) y al inhibidor de la proteína WSCI de *T. aestivum* (núm. de acceso gi | 66356278) y exhibe homologías de secuencia significativas con un grupo de inhibidores de serina proteinasa presentes en plantas y animales. Estos inhibidores de serina proteinasa constituyen una familia denominada inhibidores I de la patata y se caracterizan por un patrón de secuencia consenso típico que se conserva en cada una de las proteínas. Los inhibidores de serina proteinasa pertenecientes a la familia del inhibidor I de la patata son pequeñas proteínas de 60-90 aminoácidos que carecen de enlaces disulfuro y contienen solo un único sitio inhibidor. Las secuencias de los inhibidores de serina proteinasa del trigo muestran un grado significativo de conservación de la secuencia con respecto a los inhibidores de proteinasas de otras plantas monocotiledóneas como la cebada (*Hordeum vulgare*), el maíz (*Zea mays*, *Zea diploperennis*), el maicillo oriental (*Tripsacum dactyloides*) y el arroz (*Oryza sativa*), plantas dicotiledóneas y gusanos (Tabla III). La Tabla III muestra los porcentajes de identidad de secuencia entre cada uno de los inhibidores de serina proteinasa.

30 Expresión, purificación y caracterización fisicoquímica del alérgeno de tipo inhibidor de serina proteinasa

El alérgeno derivado del clon 10 se expresó en *E. coli* BL21 (DE3) con una etiqueta de hexahistidina C-terminal. Aproximadamente 25 mg/l de cultivo líquido de alérgeno de tipo inhibidor de serina proteinasa podría ser purificado por cromatografía en níquel (Fig. 2A). El análisis MALDI-TOF de la proteína 10 recombinante purificada dio como resultado un pico de masa de 9970,8 Da (Fig. 2B). El espectro de CD en el UV lejano del alérgeno derivado del clon 10 recombinante purificado (Fig. 2C) indica que la proteína se pliega y contiene una cantidad considerable de láminas β y un contenido bajo de hélice α . El espectro se caracteriza por un mínimo a 204 nm y un máximo a 190nm. El análisis de la estructura secundaria utilizando el programa CDSSTR con el conjunto de datos de referencia 7 proporcionó 8% de hélices α , 23% de láminas β , 14% de giros β y 53% de espirales aleatorias. El valor NRMSD de 0,033 demostró un buen ajuste entre los espectros calculados y los obtenidos experimentalmente. Tras el calentamiento a 95°C, se observó un ligero desplazamiento del mínimo del espectro de CD (de 204 nm a 201 nm), indicando una desnaturalización parcial de la proteína. Tras el enfriamiento a 25°C, la proteína se replegó (Fig. 2C). Sin embargo, el mínimo a 204 nm fue menor que antes del calentamiento, lo que sugiere un reordenamiento de las láminas β . En resumen, los espectros observados durante el barrido de temperatura indican una alta estabilidad térmica del alérgeno derivado del clon 10.

45 El alérgeno recombinante derivado del clon 10 es un nuevo alérgeno de tipo inhibidor de serina proteinasa del trigo

El alérgeno derivado de clon 10 purificado se sometió a ensayo para determinar la reactividad de IgE utilizando sueros de pacientes que padecían asma de panadero, alergia al polen de gramíneas y alergia alimentaria al trigo mediante análisis por transferencia puntual (Fig. 3). El alérgeno derivado del clon 10 recombinante reaccionó con anticuerpos IgE de 3 (núm. 1, núm. 4, núm. 12) de 22 pacientes que padecían asma de panadero (13,6%). El paciente núm. 1 que tenía solamente niveles bajos de IgE específica para el alérgeno principal del trigo, el inhibidor de la alfa-amilasa, mostró una fuerte reactividad de IgE al alérgeno de tipo inhibidor de serina proteinasa. Curiosamente, el alérgeno derivado del clon 10 fue reconocido exclusivamente por anticuerpos IgE de pacientes con asma de panadero, pero no por pacientes que padecían alergia alimentaria mediada por IgE al trigo o pacientes que padecían alergia al polen de gramíneas. Varios sueros de cada uno de los tres grupos de pacientes mostraron reactividad de IgE a alérgenos de polen de hierba timotea recombinante debido a la co-sensibilización al polen de gramínea. La reactividad de IgE específica del alérgeno derivado del clon 10 por los pacientes con asma de panadero se confirmó en un análisis con chip utilizando 20 sueros adicionales de pacientes con enfermedad celíaca, 119 pacientes con alergias alimentarias, 23 sueros de pacientes alérgicos al polen de gramíneas y 25 pacientes con asma de panadero (Constantin et al. datos no publicados, no mostrados).

El análisis de reactividades de las subclases de IgG al alérgeno derivado del clon 10 en el grupo de pacientes con asma de panadero mostró la presencia IgG₁ específica del alérgeno y en un grado inferior de niveles de IgG₄ específica del alérgeno, ambos indicativos de una respuesta Th₂, mientras que no se detectó reactividad de IgG₂ e IgG₃ relevante específica para el alérgeno derivado del clon 10 (Fig. 4).

- 5 Para estudiar la actividad alérgica de los anticuerpos IgE específicos para el alérgeno de tipo inhibidor de serina-proteinasa, se cargaron las células RBL que expresan FcεRI humano con IgE de suero de pacientes con y sin anticuerpos IgE específicos y posteriormente se expusieron al alérgeno (Fig. 5). Las células RBL cargadas con IgE de suero del paciente núm. 1 mostraron la desgranulación más fuerte tras la exposición al alérgeno (51% de la liberación total de β-hexosaminidasa). Se obtuvo una desgranulación más baja con células RBL que habían sido cargadas con IgE de los pacientes núm. 4 y núm. 12 (22% y 19%, respectivamente), lo cual se correspondía con la intensidad del reconocimiento de IgE en las transferencias puntuales (Fig. 3). Casi no se observó desgranulación cuando las células RBL fueron cargadas con suero de una persona no alérgica (Fig. 5: NC). El principal alérgeno del polen de hierba timotea rPhl p 1 indujo una fuerte desgranulación en las células RBL cargadas con IgE de suero del paciente núm. 12 y una desgranulación leve cuando las células RBL se cargaron con sueros de los pacientes núm. 1 y núm. 4 (Fig. 5). De hecho, los pacientes núm. 1, núm. 4 y núm. 12 padecían también alergia al polen de gramínea (Tabla I).

El alérgeno de tipo inhibidor de serina proteasa se acumula en semillas de trigo durante la maduración

- Se utilizaron anticuerpos de conejo, específicos para el alérgeno derivado del clon 10, para investigar la expresión de la proteína durante la maduración de la semilla de trigo (Fig. 6). Las láminas de nitrocelulosa que contenían extractos de semillas de trigo recogidas en diferentes puntos temporales de maduración de la semilla se sondearon con anticuerpos de conejo específicos e Ig pre-inmune. Los anticuerpos específicos del clon 10 reaccionaron con una proteína de 40 kDa, que representaba un tetrámero de los alérgenos de tipo inhibidor de serina proteinasa (Fig. 6) (11). La expresión de la proteína se hizo detectable en semillas de 15 días de antigüedad y continuó aumentando durante la maduración adicional de las semillas (Fig. 6). No se encontró inmunorreactividad cuando las transferencias se incubaron con la Ig preinmune del mismo conejo (Fig. 6).

El alérgeno de tipo inhibidor de serina proteinasa se detecta preferentemente en semillas de trigo.

- Cuando los autores de la presente invención compararon el polen y las semillas, encontraron que el alérgeno de tipo inhibidor de serina proteinasa se expresaba preferentemente en las semillas (Fig. 7), mientras que sólo se obtenía una señal débil a aproximadamente 65 kDa en el extracto de polen de trigo. El panalérgeno profilina se detectó con anticuerpos anti-profilina de semilla de trigo de conejo en semillas y polen de trigo (Fig. 7: núm. 123). No se encontró reactividad con Ig pre-inmune (Fig. 7).

- A continuación los autores de la presente invención utilizaron anticuerpos específicos de alérgenos de tipo inhibidor de serina proteinasa para buscar estructuras con reactividad cruzada en arroz, maíz, judía común y patata para los cuales se han descrito proteínas homólogas con una identidad de secuencia de 50% (judía), 49% (maíz, arroz) y 33% (patata) (Tabla III).

El alérgeno de tipo inhibidor de serina proteinasa se detectó de nuevo como tetrámero en las semillas de trigo, se detectó una banda de aproximadamente 23 kDa en el arroz, pero no se encontró reactividad en el maíz, la judía común o la patata (Fig. 8C) aunque se habían sometido a SDS-PAGE cantidades comparables de cada extracto (Fig. 8A). No se observó reactividad cuando las transferencias se incubaron con la Ig pre-inmune (Fig. 8B).

- 40 Localización del alérgeno de tipo serina proteinasa en la capa de aleurona y entre gránulos de almidón de un grano de trigo por medio de microscopía electrónica con inmunomarcaje con oro

- La Fig. 9 A muestra una sección ultra-fina a través de un grano de trigo a bajo aumento en el microscopio electrónico de transmisión. Los tres componentes morfológicos principales del grano son visibles: un fruto de múltiples capas externas y cubierta de la semilla (C), la capa de aleurona (AL) y el comienzo del voluminoso interior del grano, el endospermo amiláceo (SE). El rectángulo marca un área comparable con el área mostrada en B. La Figura 9B muestra el límite entre una célula de aleurona y el endospermo amiláceo adyacente con mayor aumento. La célula de aleurona está llena de granos de aleurona (AG) (vacuolas proteínicas) que están rodeadas por pequeñas vesículas lipídicas (L). Ambos componentes están incluidos en la matriz citoplásmica de la célula. El endospermo amiláceo consiste en gránulos de almidón de tamaño variable, estrechamente empaquetados, dejando pequeños espacios intermedios de material citoplasmático amorfo. Los rectángulos indican áreas mostradas con gran aumento en C, D y E, F, respectivamente. La Figura 9C muestra la localización del alérgeno derivado del clon 10 en una célula de aleurona utilizando Ab originados contra la proteína de trigo 10. Las partículas de oro (flechas) indican la presencia de proteína de trigo 10 predominantemente en la matriz citoplasmática entre los orgánulos celulares pero también en las partes periféricas de las vesículas lipídicas (L). En la región del almidón, la proteína de trigo 10 está asociada con el material citoplasmático amorfo (CY) entre los gránulos de almidón (SG) (Figura 9E). Los experimentos de control con Ab pre-inmunes mostraron un grado muy bajo de marcaje no específico (Fig. 9, D y F).

Ejemplo 2 Expresión y purificación de alérgenos recombinantes

El Ejemplo 2 muestra la identificación y caracterización de seis alérgenos de semillas de trigo reactivos con IgE denominados clones núm. 10, núm. 37, núm. 38, núm. 112, núm. 123 y núm. 126. Además, el Ejemplo 2 muestra un método para la expresión y purificación de alérgenos recombinantes de dichos clones

Materiales biológicos, sueros de pacientes

- 5 Se obtuvieron semillas de trigo de *Triticum aestivum* cv. Michael de la Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH y se plantaron en un invernadero. Las semillas inmaduras se cosecharon directamente en nitrógeno líquido después de un período de 25 días hasta que comenzó la polinización y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Se obtuvieron sueros de 24 pacientes que padecían asma de panadero (Tabla IV). El asma de panadero se diagnosticó basándose en el historial clínico, los niveles de IgE total en suero, la IgE específica para el trigo y el centeno por medio del sistema CAP-FEIA (Phadia, Uppsala, Suecia) y después de ensayos de exposición por inhalación específicos (1) (Fig. 10). Se ha analizado el suero de los pacientes alérgicos al polen de gramíneas para determinar los niveles de IgE total en suero y de IgE específica para polen de hierba timotea por medio del sistema CAP-FEIA (Phadia) y los pacientes con alergia alimentaria al trigo se han caracterizado como se describió anteriormente (2) (Fig. 11). Los datos clínicos de estos pacientes se resumen en la tabla V. Para fines de control, se incluyó en los experimentos el suero de un individuo no alérgico.

Construcción de una biblioteca de ADNc en *lgt11* de semillas de trigo

- Se extrajo el ARN total de semillas de trigo almacenadas a -80°C de acuerdo con Yeh [3]. A continuación, el sedimento de ARN se disolvió en tampón de isotiocianato de guanidinio (isotiocianato de guanidinio 4 M, acetato de sodio 3M al 0,83% v/v, pH 6, β -mercaptoetanol 0,11 M) y se purificó mediante ultrafiltración en un gradiente de densidad de cloruro de cesio. Se aisló ARN Pol-A⁺ mediante cromatografía de afinidad con oligo-dT celulosa (Nucleo Trap mRNA; Machery-Nagel) y se sintetizó ADNc de doble hebra por medio de un kit de síntesis de ADNc (cDNA synthesis System; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Después de la metilación con la metilasa de *EcoRI* (New England Biolabs, Beverly, MA), se añadieron conectores para *EcoRI* (New England Biolabs) al ADNc. El ADNc conectado se digirió con *EcoRI* (Roche Diagnostics). Los conectores digeridos se retiraron con una columna Nick (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y el ADNc se ligó en los brazos de *lgt11* (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.). El producto de ligación se empaquetó *in vitro* (Gigapack III Gold Cloning Kit, Stratagene) dando como resultado una biblioteca de ADNc de expresión en *lgt11* con $2,43 \times 10^6$ UFP (unidades formadoras de placas).

Aislamiento y caracterización de clones reactivos con IgE de una biblioteca de ADNc de semilla de trigo

- Se infectaron *E. coli* Y1090 con 7×10^5 UFP de fagos recombinantes y se sometieron a inmunoescrutinio con IgE de suero de cuatro pacientes (núm. 1, núm. 2, núm. 5, núm. 13) que padecían asma de panadero como se ha descrito [5]. Se seleccionaron seis clones de fagos reactivos con IgE para su posterior re-clonación y su ADN se amplificó por PCR utilizando Platinum PCR Supermix (Invitrogen, Life Technologies) con cebadores *lgt11* y se secuenciaron (MWG, Ebersberg, Alemania). Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias presentadas a la base de datos GenBank en el Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI).

- 35 Expresión y purificación de alérgenos recombinantes

- La región codificante de los clones se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores enumerados en la tabla VI. Los productos de la PCR se subclonaron en un vector AccepTor (Novagen, Madison, WI) y se secuenciaron de nuevo (MWG). A continuación, se digirió el inserto que contenía los Vectores AccepTor con *NdeI* y *EcoRI* (Roche Diagnostics), los insertos se purificaron en gel (Promega, Madison, WI, EE.UU.) y se subclonaron en el plásmido de expresión pET 17b (Novagen). Las secuencias de ADN se confirmaron secuenciando ambas hebras de ADN (Microsynth, Balgach, CH). Los constructos del inserto de pET 17b se transformaron en *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene) y se hicieron crecer en medio de Caldo Luria (LB) que contenía 100 mg/l de ampicilina a 37°C a una DO (600 nm) de 0,8-1. La expresión de la proteína se indujo mediante la adición de isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0,5 mM y el crecimiento de las bacterias durante 3 h más. Después se recogieron las bacterias por centrifugación y se homogeneizaron en imidazol 25 mM, pH 7,5, Triton X-100 al 0,1% (v/v) con Ultraturax (IKA, Stauffen, Alemania). El ADN se digirió por medio de la adición de ADNasa I, se agitó durante 10 minutos adicionales a 20°C, se detuvo con 200 μ l de NaCl 5 M y a continuación se centrifugó a 4°C (6000g, 20 minutos). El alérgeno derivado del clon 10 se purificó a partir del sedimento que contenía los cuerpos de inclusión en condiciones de desnaturalización sobre columnas de afinidad de resina Ni-NTA de acuerdo con el manual QIAexpressionist, protocolo 17 (QIAGEN, Hilden, Alemania). Las fracciones que contenían el alérgeno recombinante se reunieron y se sometieron a diálisis frente a NaH_2PO_4 10 mM pH 7,5. Las proteínas recombinantes núm. 37, núm. 38, núm. 112, núm. 123 y núm. 126 se purificaron a partir del sedimento del producto lisado de células bacterianas en condiciones nativas sobre columnas de afinidad de resina Ni-NTA de acuerdo con el manual QIAexpressionist, Protocolo 12 (QIAGEN). Las fracciones que contenían las proteínas recombinantes se reunieron y se sometieron a diálisis frente a NaH_2PO_4 10 mM pH 7,5. Las muestras de proteínas se analizaron para determinar su pureza sobre un gel de SDS-PAGE al 14% y se visualizaron mediante tinción con azul brillante de Coomassie. Las concentraciones de proteína se determinaron con Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL).

Ejemplo 3: Matriz de alérgenos

El Ejemplo 3 muestra una micro-matriz de alérgenos que revela que los alérgenos de semillas de trigo recombinantes, preparados como se describe en el ejemplo 2, son específicamente reconocidos por IgE del suero de pacientes con asma de panadero, pero no de pacientes con alergia alimentaria al trigo o alergia al polen de gramíneas. Por lo tanto, los alérgenos recombinantes son específicos para la alergia respiratoria a la harina de trigo. Además, el Ejemplo 3 muestra el uso de alérgenos marcadores de polen de hierba timotea phi p 1 y Phl p 5 y polen de trigo en la matriz para mejorar el diagnóstico *in vitro* de la alergia respiratoria.

Técnicas

Pacientes y sueros

Se obtuvieron sueros de pacientes españoles que padecían asma de panadero (B1-B23), austríacos (F1-F26) y alemanes (F27-F38) que padecían alergia alimentaria inducida por el trigo y pacientes austríacos (G1-G17) que padecían alergia al polen de gramíneas. Los pacientes fueron seleccionados de acuerdo con un historial clínico positivo, ensayos de exposición por inhalación específicos para la confirmación de una sensibilización clínicamente relevante en caso de asma de panadero (1) y exposición alimentaria controlada por placebo, doble ciego (DBPCFC) en pacientes lactantes con alergia alimentaria al trigo. Se ha analizado el suero de todos los pacientes para determinar los niveles de IgE total en suero e IgE específica para la harina de trigo y el polen de hierba timotea por medio del sistema CAP-FEIA (Phadia, Uppsala, Suecia). Los datos demográficos, clínicos y serológicos de estos pacientes se resumen en las Tablas VII, VIII y IX. Para fines de control, se incluyeron en todos los experimentos sueros de individuos sanos.

Materiales biológicos

Las proteínas recombinantes de trigo núm. 10, núm. 37, núm. 38, núm. 112, núm. 123 y núm. 126 derivadas de una biblioteca de ADNc mediante escrutinio con sueros de pacientes con asma de panadero se expresaron en *E. coli* y se purificaron como se ha descrito (12). El polen de trigo se adquirió de Allergon (Vällinge, Suecia) y Phl p 1, Phl p 5, Phl p 7, Phl p 12 recombinantes de BIOMAY (Viena, Austria).

Extracto de proteína

Se extrajo polen de *Triticum aestivum* (500 mg) a 4°C durante la noche en 5 ml de PBS, EDTA 2 mM, PMSF 1 mM. Después de la centrifugación durante 1 h a 13.000 xg 4°C, se determinó la concentración de proteína del sobrenadante con Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL) y se almacenaron alícuotas a -20°C hasta su uso.

Análisis de micromatrices de alérgenos

Se aplicaron con un Nano Plotter NP2 (Gesellschaft für Silizium-Mikrosysteme mbH, Großerkmannsdorf, Alemania), extracto de polen de trigo, 1-1,5 ng/aplicación, proteínas de trigo recombinantes y purificadas y alérgenos de polen de gramínea recombinantes, 0,1-0,15 ng/aplicación, sobre membranas de nitrocelulosa que se anclaron a portaobjetos de vidrio de microscopio como se ha descrito (13). Se utilizó IgE humana purificada como marcador de posición (14). Las micromatrices aplicadas se prelavaron con 30 µl de tampón de análisis (tampón de fosfato débil, pH 7,5) y se incubaron con 30 µl de sueros no diluidos de pacientes alérgicos o de controles. Después del lavado con 30 µl de tampón de análisis, los anticuerpos IgE unidos se detectaron con 20 µl de anticuerpo anti-IgE conjugado con fluoróforo y se midieron las intensidades de fluorescencia (FI) a una longitud de onda de 635 nm (GenePix 4000B fran Axon). El nivel de corte se ajustó a FI = 300 basándose en los valores obtenidos con albúmina de suero humano.

40 Resultados

Descripción de los pacientes

Los autores de la presente invención analizaron pacientes que padecían asma de panadero, alergia alimentaria inducida por el trigo o alergia al polen de gramíneas. El grupo de pacientes con asma de panadero consistía en 23 personas (4 mujeres, 19 varones: edad media 39 años, intervalo 22-60 años) con exposición ocupacional a harina de trigo. Noventa y uno por ciento de los pacientes con asma de panadero padecieron asma debido a la inhalación de harina de trigo y 94% se quejaron de los síntomas de rinoconjuntivitis. Se encontró sensibilización a otras fuentes de alérgenos respiratorios (p. ej., gato, cucaracha, perro, polen de gramínea, caballo, ácaros del polvo doméstico, moho y/o polen de olivo) en 70% de los pacientes con asma del panadero y en 48% de los pacientes que padecían alergia al polen de gramíneas (Tabla VII). Curiosamente, ninguno de los pacientes con asma de panadero presentó alergia a los alimentos y los síntomas se limitaron a manifestaciones respiratorias.

El grupo de pacientes que padecían alergia alimentaria inducida por el trigo comprendía 38 individuos (25 mujeres, 13 varones: edad media 13 años, intervalo 0,5-65 años) (Tabla VIII). Nuevamente los autores de la presente invención encontraron que 71% están sensibilizados a otras fuentes alérgicas respiratorias (p.ej., polen de abedul, polen de gramíneas, ácaros del polvo doméstico y polen de artemisa) y 58% también estaban sensibilizados a alérgenos alimenticios (p.ej., zanahoria, leche de vaca, avellana, huevo de gallina, malta, nueces, naranja, ciruela,

arroz, soja, apio, mariscos, camarones y/o especias) (Tabla VIII). La sensibilización mediada por IgE al polen de gramíneas se encontró en 55% de estos pacientes. Los síntomas de estos pacientes variaron desde síntomas respiratorios (p.ej., asma, bronquitis, tos, conjuntivitis, disnea, congestión nasal, rinorrea, rinoconjuntivitis) hasta síntomas gastrointestinales (p.ej., dolor abdominal, diarrea, flatulencia, garganta irritada, y vómitos) y síntomas cutáneos (p.ej., eczema, prurito y urticaria) (Tabla VIII).

El grupo de pacientes alérgicos al polen de gramíneas consistió en 17 pacientes (5 mujeres, 12 varones: edad media 13 años, intervalo 0,5-65 años). Setenta y uno por ciento de estos pacientes padecían también alergia a otras fuentes alergénicas respiratorias (p.ej., polen de abedul, gato, perro, ácaros del polvo doméstico, conejo y polen de artemisa) (Tabla IX). De acuerdo con la serología, 65% exhibió reactividad de IgE a la harina de trigo y 23% contenía IgE contra otros alérgenos alimentarios. Sin embargo, sólo un paciente sufrió de urticaria y no se pudo registrar ningún síntoma de alergia alimentaria para estos pacientes. Los síntomas respiratorios tales como el asma, la conjuntivitis, la disnea, la rinoconjuntivitis y la rinitis predominaron en los pacientes alérgicos al polen de gramíneas.

Composición de la matriz de alérgenos

Se aplicaron seis alérgenos de semillas de trigo recombinantes denominados núm. 10, núm. 37, núm. 38, núm. 112, núm. 123 y núm. 126 sobre portas de vidrio recubiertos de nitrocelulosa (Fig. 12, A). Las proteínas de trigo recombinantes se expresaron en *Escherichia coli* basándose en ADNc que se habían aislado de una biblioteca de ADNc de semilla de trigo con sueros de pacientes con asma de panadero como se ha descrito (15). De acuerdo con la homología con secuencias depositadas en la base de datos NCBI, los alérgenos de trigo se pueden describir como sigue: el núm. 10 tiene una homología de 96% con un precursor WSCI del inhibidor de la subtilisina-quimotripsina de *Triticum aestivum* (núm. de acceso gi|122065237), el núm. 37 es una tiorredoxina H de *T. aestivum* (núm. de acceso gi|27461140), el núm. 38 es una glutatión transferasa de *T. aestivum* (núm. de acceso gi|20067419), el núm. 112 tiene una homología de 99% con una 1-Cys-peroxirredoxina de *T. aestivum* (núm. de acceso gi|34539782), el núm. 123 tiene una homología de 96% con profilina de *T. aestivum* (núm. de acceso gi|1346803) y el núm. 126 tiene una homología de 69% con deshidrina 11 de *Hordeum vulgare* (núm. de acceso gi|4105101).

Además de los alérgenos de trigo recombinantes, también se aplicaron extracto de polen de trigo, alérgenos de polen de hierba timotea recombinantes (rPhl p 1, rPhl p 5, rPhl p 7 y rPhl p 12) (16-19) e IgE sobre los portas (Fig. 12, A). Las imágenes representativas de micromatrices de alérgenos después de la incubación con los sueros se muestran en la Fig. 12, B-C. En el chip sondeado con suero de una persona no alérgica, no se detectó reactividad con ningún alérgeno y sólo se detectaron los marcadores de IgE aplicados con el producto conjugado anti-IgE (Fig. 12, B). Las figuras en 12, C muestran imágenes representativas de chips de micromatrices incubados con sueros de un paciente con asma de panadero (1), un paciente que padece alergia alimentaria inducida por trigo (2) y un paciente alérgico al polen de gramíneas (3). El paciente con asma del panadero (1: Tabla I: B4) muestra una fuerte reactividad de IgE a los alérgenos de trigo recombinantes núm. 10 y reactividades débiles al núm. 126 y al núm. 112. Para el paciente con alergia alimentaria (2: Tabla VIII: F26), se observaron una fuerte unión de IgE a profilina recombinante de trigo núm. 123 y a polen de hierba timotea rPhl p 12 y una unión débil al extracto de polen de trigo y rPhl p 1. La imagen del chip de un paciente alérgico al polen de gramíneas (3: G 16) muestra señales fuertes a rPhl p 5 y rPhl p 12 y señales más débiles con la profilina de trigo núm. 123, extracto de polen de trigo y rPhl p 1.

Identificación de alérgenos de semillas de trigo específicamente reconocidos por anticuerpos IgE de pacientes con asma de panadero

Noventa y uno por ciento de los pacientes con asma de panadero fueron positivos en el CAP de harina de trigo (Tabla VII). Utilizando los alérgenos de trigo aplicados, se pudo establecer el perfil de reactividad de IgE para 62% de los pacientes con asma de panadero. Los alérgenos núm. 126 (30%), núm. 10 (26%), núm. 123 (22%) y núm. 122 (17%) fueron los componentes más frecuentemente detectados mientras que el núm. 37 y el núm. 38 reaccionaron sólo con 4% de los sueros. (Fig. 13, A). Curiosamente, los dos pacientes que fueron negativos en el CAP de harina de trigo (B5, B18: Tabla VII) reaccionaron con el alérgeno núm. 126. Cuarenta y ocho por ciento de los pacientes con asma de panadero mostraron reactividad de IgE al extracto de polen de hierba timotea y cada uno de estos pacientes también fue diagnosticado con una combinación de rPhl p 1 y rPhl p 5 aplicados. El Phl p 12 (35%) recombinante fue siempre más fuerte y más frecuentemente reconocido que la profilina de trigo núm. 123 (22%). El alérgeno de polen rPhl p 7 que presentaba reacción cruzada reaccionó con 13% de los sueros.

Los alérgenos de semilla de trigo recombinantes reconocidos por los pacientes con asma de panadero no son dianas para los anticuerpos IgE de pacientes que padecen alergia alimentaria inducida por trigo

Todos los pacientes con alergia alimentaria al trigo fueron positivos en el CAP de harina de trigo, pero las proteínas de trigo recombinantes apenas fueron reconocidas (5%) (Fig. 13, B). Los dos pacientes que presentaron reacción cruzada positiva para profilina de polen de hierba timotea, también tenían una señal positiva para profilina de trigo núm. 123 en la micromatriz. Cincuenta y cinco por ciento de los pacientes con alergia alimentaria inducida por trigo mostraron reactividad de IgE en el CAP de *Phleum*, pero sólo 18% fueron positivos para el extracto de polen de trigo en el chip y 26% en la combinación de rPhl p 1 y rPhl p 5 aplicados. rPhl p 1 y rPhl p 5 solos fueron reconocidos por 18% y 16% de los sueros respectivamente, los alérgenos rPhl p 7 y rPhl p 12 que presentaron reacción cruzada,

reaccionaron con 13% y 26% de los sueros.

rPhl p 1 y rPhl p 5 son alérgenos marcadores de diagnóstico para la alergia al polen de gramíneas, mientras que la profilina es reconocida por pacientes con asma de panadero y con alergia alimentaria al trigo

5 Sesenta y cinco por ciento de los pacientes alérgicos al polen de gramíneas dieron positivo en el CAP de harina de trigo. De las proteínas de trigo recombinante sometidas a ensayo en la micromatriz, sólo la proteína de trigo recombinante núm. 123 fue reconocida por 23,5% de los pacientes (Fig. 13, C). Cada uno de estos pacientes también fue positivo para la profilina rPhl p 12 de polen de hierba timotea que presentaba reacción cruzada. Pero rPhl p 12 fue siempre reconocida más fuertemente y más frecuentemente (35%) que el número 123. Todos los
10 pacientes que padecían alergia al polen de gramíneas fueron positivos en el CAP de polen de hierba timotea y en la combinación de rPhl p 1 y rPhl p 5 aplicados. El Phl p 1 recombinante solo fue más frecuentemente reconocido (94%) que rPhl p 5 (88%) por los pacientes con alergia al polen de gramíneas. El extracto de polen de trigo reaccionó con 82% de los sueros y rPhl p 7 que presentó reacción cruzada con 29%.

15 Todos los pacientes alérgicos al polen de gramíneas y los pacientes con asma de panadero con alergia al polen de gramíneas fueron positivos en la combinación de rPhl p 1 y rPhl p 5 en la micromatriz y en el CAP de Phleum (Fig. 13, A; C). Estos hallazgos están de acuerdo con datos previamente publicados que muestran que la alergia al polen de gramíneas puede ser diagnosticada por la reactividad de IgE a rPhl p 1 y rPhl p 5 (20, 21). Sin embargo, entre los pacientes con alergia alimentaria inducida por trigo, sólo 26% reaccionó con rPhl p 1 y rPhl p 5 en la micromatriz, pero más del doble (55%) fueron positivos en el CAP de Phleum (Fig. 13, B). Además, aquellos pacientes que
20 reaccionaban con el extracto de polen de gramíneas en el sistema CAP y con profilina de polen de hierba timotea (rPhl p 12) en la micromatriz también fueron positivos a la profilina de trigo (22) debido a la reactividad cruzada de las profilinas de las plantas (23). Sin embargo, la frecuencia y la intensidad del reconocimiento de IgE fueron siempre más fuertes para rPhl p 12 que para la profilina de trigo (22).

Ejemplo 4

25 El analito se inmoviliza en un soporte sólido, tal como ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Suecia). Se incuban muestras de suero de al menos tres pacientes humanos representativos sensibilizados al alérgeno y que muestran reactividad de IgE a ese alérgeno durante 3 h a temperatura ambiente con el alérgeno a una concentración final de 100 µg/mL y, en paralelo como controles negativos, con tampón solo y la proteína de unión a maltosa (MBP) no alérgica de *E. coli*. A continuación se analizan las muestras para determinar la unión de IgE a los ensayos ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Suecia) que llevan analito inmovilizado para estudiar si la preincubación con alérgeno inhibe o reduce
30 significativamente la unión a IgE.

Tabla I. Características demográficas, clínicas y serológicas de pacientes que padecen asma de panadero

| Pacientes | Edad | Sexo | Asma | Exposición ocupacional | Conc. IgE kU/l | | | SPT para polen de gramíneas | IgE total kU/l | PC20 | mg/ml |
|-----------|------|------|------|------------------------|----------------|---------|-------|-----------------------------|----------------|------|-------|
| | | | | | Trigo | Centeno | Soja | | | | |
| 1 | 35 | m | + | + | 74,2 | 20,7 | n.d. | 0,63 | 163 | + | 0,29 |
| 2 | 29 | m | + | + | 18 | 7,9 | 6,1 | 1,5 | 271 | + | 2 |
| 3 | 36 | m | + | + | 1,66 | 1,24 | <0,35 | <0,35 | 353 | + | 0,31 |
| 4 | 39 | m | + | + | 25,8 | 15,6 | 1,36 | 18,6 | 1387 | + | 0,25 |
| 5 | 54 | m | + | + | <0,35 | <0,35 | <0,35 | 3,21 | 30,1 | + | n.d. |
| 6 | 35 | m | + | + | 24,3 | 39,6 | 5,73 | 2,29 | 416 | + | 0,25 |
| 7 | 28 | m | + | + | 2,58 | 3,77 | <0,35 | 5,39 | 248 | + | 0,25 |
| 8 | 27 | m | - | + | 7,86 | 7,4 | 3,19 | 32,2 | 1773 | + | 0,47 |
| 9 | 24 | m | + | + | 2,35 | 2,32 | 1,62 | n.d. | 204 | + | 0,09 |
| 10 | 60 | m | + | + | 3,44 | 4,08 | <0,35 | 1,15 | 73,3 | + | 0,44 |
| 11 | 22 | m | + | + | 3 | 2 | <0,35 | <0,35 | 2509 | + | 3,38 |
| 12 | 26 | m | + | + | >100 | >100 | 10,7 | 7,63 | 321 | + | 0,5 |
| 13 | 54 | m | + | + | 2,48 | 0,6 | 0,71 | <0,35 | 480 | + | 0,12 |
| 14 | 60 | m | + | + | 31,8 | 31,1 | n.d. | <0,35 | 629 | + | 0,15 |
| 15 | 27 | m | + | + | 5,06 | n.d. | n.d. | <0,35 | 278 | + | 0,079 |
| 16 | 42 | f | + | + | 3,71 | 2,71 | 1,69 | <0,35 | 271 | + | 0,187 |
| 17 | 54 | m | + | + | 1,68 | 1,13 | <0,35 | <0,35 | 79,2 | + | 16 |
| 18 | 59 | m | + | + | <0,35 | <0,35 | <0,35 | 5 | 673 | + | 0,23 |
| 19 | 26 | m | + | + | 74,6 | 58,4 | <0,35 | <0,35 | 17,7 | + | 1,16 |
| 20 | 43 | m | + | + | 13,8 | 26,9 | 0,77 | <0,35 | 538 | + | 0,25 |
| 21 | 34 | f | + | + | 2,05 | 1 | <0,35 | <0,35 | n.d. | + | 0,5 |
| 22 | 41 | f | + | + | 1,77 | 0,75 | <0,35 | <0,35 | 23,4 | + | 0,23 |

m: varón, f: mujer; +: positivo, -: negativo, n.d.: no realizado, kUAl kilounidades de antígeno por litro, SPT: prueba cutánea de alergia, PC20: Exposición por inhalación de metacolina

Tabla II. Características demográficas, clínicas y serológicas de pacientes que padecen alergia alimentaria a trigo y alergia a polen de gramíneas

| Pacientes | Edad | Sexo | RC | AD | Asma | IgE kUAI | | IgE total kU/l |
|-----------|------|------|----|----|------|----------|---------|----------------|
| | | | | | | Trigo | Centeno | |
| F1 | 34 | f | - | + | + | 18,6 | 13,4 | >2000 |
| F2 | 34 | m | + | - | - | 3,1 | 3,08 | 155 |
| F3 | 24 | f | - | + | - | 1,3 | n.d. | 336 |
| F4 | 15 | f | - | + | - | 5,91 | 5,3 | 915 |
| G1 | 45 | m | + | - | + | 1,76 | 2 | 175 |
| G2 | 39 | m | + | - | + | 11,1 | 10,3 | 401 |
| G3 | 55 | f | - | - | - | 3,16 | 1 | 157 |
| G4 | 54 | m | + | - | + | n.d. | n.d. | 1528 |

F: alergia alimentaria, G: alergia al polen de gramíneas, m: varón, f: mujer, RC: rinoconjuntivitis, AD: dermatitis atópica, +: positivo, -: negativo, n.d.: no realizado, kUAI: kilounidades de antígeno por litro

Tabla III. Porcentaje de identidades de secuencias de aminoácidos

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | | | | | | | | | |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Con núm.10 | 100 | 96 | 94 | 85 | 54 | 49 | 52 | 43 | 43 | 35 | 50 | 43 | 41 | 32 | 35 | 33 | 32 | 34 | 31 | 38 | 35 | 36 | 32 | 46 | 31 | 30 | 30 | 34 | 35 | 28 | | | | | | | | | |
| 1 | 100 | 97 | 96 | 55 | 50 | 50 | 53 | 44 | 44 | 35 | 50 | 44 | 41 | 32 | 36 | 33 | 32 | 34 | 31 | 38 | 35 | 36 | 32 | 46 | 31 | 30 | 30 | 34 | 35 | 28 | | | | | | | | | |
| 2 | | 100 | 84 | 55 | 48 | 47 | 50 | 44 | 43 | 38 | 46 | 41 | 40 | 30 | 30 | 33 | 30 | 32 | 31 | 37 | 35 | 34 | 30 | 43 | 28 | 31 | 28 | 32 | 35 | 27 | | | | | | | | | |
| 3 | | | 100 | 55 | 50 | 50 | 53 | 44 | 44 | 38 | 50 | 44 | 43 | 30 | 40 | 29 | 30 | 32 | 31 | 35 | 35 | 37 | 34 | 43 | 32 | 34 | 31 | 35 | 35 | 30 | | | | | | | | | |
| 4 | | | | 100 | 86 | 87 | 76 | 35 | 62 | 33 | 50 | 41 | 40 | 27 | 47 | 31 | 37 | 37 | 36 | 36 | 42 | 33 | 41 | 44 | 32 | 34 | 30 | 32 | 36 | 30 | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | 100 | 87 | 73 | 37 | 60 | 33 | 50 | 40 | 40 | 30 | 44 | 30 | 38 | 45 | 41 | 41 | 45 | 44 | 32 | 37 | 33 | 34 | 28 | 25 | 30 | 30 | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | 100 | 73 | 37 | 60 | 33 | 50 | 40 | 40 | 30 | 44 | 30 | 38 | 45 | 41 | 41 | 45 | 44 | 32 | 37 | 33 | 34 | 28 | 25 | 30 | 30 | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | 100 | 100 | 100 | 32 | 41 | 37 | 46 | 40 | 34 | 47 | 34 | 37 | 38 | 32 | 40 | 35 | 34 | 40 | 30 | 30 | 27 | 35 | 35 | 27 | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | 100 | 100 | 32 | 41 | 37 | 46 | 40 | 34 | 47 | 34 | 37 | 38 | 32 | 40 | 35 | 34 | 40 | 30 | 30 | 27 | 35 | 35 | 27 | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | | 100 | 32 | 41 | 37 | 46 | 40 | 34 | 47 | 34 | 37 | 38 | 32 | 40 | 35 | 34 | 40 | 30 | 30 | 27 | 35 | 35 | 27 | | | | | | | | | |
| 10 | | | | | | | | | | 100 | 43 | 46 | 52 | 40 | 34 | 39 | 36 | 31 | 46 | 42 | 42 | 54 | 49 | 54 | 48 | 51 | 54 | 57 | 68 | 56 | 51 | | | | | | | | |
| 11 | | | | | | | | | | | 100 | 37 | 46 | 41 | 45 | 35 | 40 | 89 | 43 | 48 | 41 | 37 | 40 | 79 | 38 | 37 | 30 | 38 | 38 | 33 | 33 | | | | | | | | |
| 12 | | | | | | | | | | | | 100 | 35 | 37 | 46 | 41 | 45 | 35 | 40 | 41 | 34 | 34 | 35 | 40 | 35 | 40 | 35 | 32 | 34 | 34 | 32 | | | | | | | | |
| 13 | | | | | | | | | | | | | 100 | 35 | 37 | 46 | 41 | 45 | 35 | 40 | 41 | 34 | 34 | 35 | 40 | 35 | 40 | 35 | 32 | 34 | 34 | 32 | | | | | | | |
| 14 | | | | | | | | | | | | | | 100 | 25 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 30 | 33 | 28 | 26 | 33 | 26 | 26 | 23 | 31 | 31 | 24 | | | | | | | | |
| 15 | | | | | | | | | | | | | | | 100 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | 56 | | | | | | | |
| 16 | | | | | | | | | | | | | | | | 100 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | | | | | | | |
| 17 | | | | | | | | | | | | | | | | | 100 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | | | | | | | |
| 18 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 100 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | | | | | | | |
| 19 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 100 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | | | | | | | |
| 20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 100 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | | | | | | | |
| 21 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 100 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | | | | | | | |
| 22 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 100 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | | | | | | | |
| 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 100 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | | | | | | |
| 24 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 100 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | | | | | | |
| 25 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 100 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | | | | | |
| 26 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 100 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | | | | |
| 27 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 100 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | | | |
| 28 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 100 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | | |
| 29 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 100 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | |
| 30 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 100 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 |

Tabla IV Pacientes con asma de panadero

| Paciente núm. | Edad al donar sangre | Sexo | Asma | Exposición ocupacional | Conc. IgE kUAI | | | | IgE total | PC20 mg/ml |
|------------------|----------------------------|------|------|---------------------------|----------------|---------|------|---------|-----------|------------|
| | | | | | Trigo | Centeno | Soja | Amilasa | | |
| 1 | 35 | m | + | + | 74,2 | n.d. | n.d. | 0,63 | 163 | + 0,29 |
| 2 | 29 | m | + | + | 18 | n.d. | 6,1 | 1,5 | 271 | + 2 |
| 3 | 36 | m | + | + | 1,66 | 1,24 | 0 | 0 | 353 | + 0,31 |
| 5 | 39 | m | + | + | 25,8 | 15,6 | 1,36 | 18,6 | 1387 | + 0,25 |
| 6 | 54 | m | + | + | 0 | 0 | 0 | 3,21 | 30,1 | n.d. |
| 7 | 35 | m | + | + | 24,3 | 39,6 | 5,73 | 2,29 | 416 | + 0,25 |
| 8 | 28 | m | + | + | 2,58 | 3,77 | 0 | 5,39 | 248 | + 0,25 |
| 9 | 27 | m | + | + | 7,86 | 7,4 | 3,19 | 32,2 | 1773 | + 0,47 |
| 10 | 24 | m | - | + | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 204 | + 0,09 |
| 11 | 60 | m | + | + | 3,44 | 4,08 | 0 | 1,15 | 73,3 | + 0,44 |
| 12 | 22 | m | + | + | 3 | 2 | 0 | 0 | 2509 | + 3,38 |
| 13 | 26 | m | + | + | >100 | >100 | 10,7 | 7,63 | 321 | + 0,5 |
| 14 | 54 | m | + | + | 2,48 | 0,6 | 0,71 | 0 | 480 | + 0,12 |
| 15 | 60 | m | + | + | 31,8 | 31,1 | n.d. | 0 | 629 | + 0,15 |
| 16 | 27 | m | + | + | 5,06 | n.d. | n.d. | 0 | 278 | + 0,079 |
| 17 | 42 | f | + | + | 3,71 | 2,71 | 1,69 | 0 | 271 | + 0,187 |
| 18 | 54 | m | + | + | 1,68 | 1,13 | 0 | 0 | 79,2 | + 16 |
| 19 | 59 | m | + | + | 0 | 0 | 0 | 5 | 673 | + 0,23 |
| 20 | 26 | m | + | + | 74,6 | 58,4 | 0 | 0 | 17,7 | + 1,16 |
| 21 | 43 | m | + | + | 13,8 | 26,9 | 0,77 | 0 | 538 | + 0,25 |
| 22 | 34 | f | + | + | 2,05 | 1 | 0 | 0 | n.d. | + 0,5 |
| 23 | 41 | f | + | + | 1,77 | 0,75 | 0 | 0 | 23,4 | + 0,23 |
| 24 | 53 | f | - | - | 0,41 | 2,21 | 0 | 0 | 469 | n.d. |

PC20: Exposición por inhalación de metilcolina, m: varón, f: mujer, +: positivo, -: negativo, n.d.: no realizado

Tabla V Pacientes alérgicos a alimentos y al polen de gramíneas

| Grupo de pacientes | Edad en el momento de la donación de sangre | Sexo | RC | AD | Asma | Conc. IgE kUAI | | IgE total |
|------------------------|---|------|----|----|------|----------------|---------|-----------|
| | | | | | | Trigo | Centeno | |
| Alérgico alimentario 1 | 32 | m | + | - | - | 3,1 | 3,08 | 155 |
| Alérgico alimentario 2 | 34 | f | - | - | + | 18,6 | n.d. | >2000 |
| Alérgico alimentario 3 | 24 | f | - | + | - | 1,3 | n.d. | 336 |
| Alérgico alimentario 4 | 15 | f | - | + | - | 5,91 | 5,3 | 915 |
| | | | | | | | | |
| Alérgico gramíneas 1 | 45 | m | + | - | + | n.d. | n.d. | n.d. |
| Alérgico gramíneas 2 | 39 | m | + | - | + | n.d. | n.d. | 401 |
| Alérgico gramíneas 3 | 55 | f | - | - | - | n.d. | n.d. | n.d. |
| Alérgico gramíneas 4 | 54 | m | + | - | + | n.d. | n.d. | 1528 |

m: varón, f: mujer, +: positivo, -: negativo, n.d.: no realizado

Tabla VI

Cebadores de PCR utilizados para la amplificación de los ADNc

| Cebador | Secuencia |
|-------------|--|
| 10 directo | 5' CAT ATG AGC CCT GTG ATG AAG CCG GAG GGA 3' |
| 10 inverso | 5' <u>GAATTC</u> TTA GTG ATG GTG ATG GCC GAC CCT GGG GAC 3' |
| 37 directo | 5' CAT ATG GCC GCC GAG GAG GGA GCC GTG ATA 3' |
| 37 inverso | 5' <u>GAATTC</u> TTA GTG ATG GTG ATG GGC AGA TGC AGA ACC 3' |
| 38 directo | 5' CAT ATG GCG GGC GAG AAG GGC CTG GTG CTG 3' |
| 38 inverso | 5' <u>GAATTC</u> TTA GTG ATG GTG ATG GAT GCC GTA CTT 3' |
| 112 directo | 5' CAT ATG CCG GGC CTC ACC ATC GGC GAC ACC GTC 3' |
| 112 inverso | 5' <u>GAATTC</u> TTA GTG ATG GTG ATG GAC CTT GGT GAA GCG 3' |
| 123 directo | 5' CAT ATG TCG TGG CAG ACG TAC GTC GAC GAC 3' |
| 123 inverso | 5' <u>GAATTC</u> TTA GTG ATG GTG ATG GAA ACC CTG CTC GAC 3' |
| 126 directo | 5' CAT ATG GCG GAC TAC GGT GGA GAG TAC GGG 3' |
| 126 inverso | 5' <u>GAATTC</u> TTA GTG ATG GTG ATG TCC AGG GAG CTT 3' |

directo: directo; inverso: inverso; los sitios de restricción de *NdeI* se muestran en cursiva, los sitios de restricción de *EcoRI* están subrayados, las etiquetas de hexa-histidina se muestran en negrita

Tabla VII Características demográficas, clínicas y serológicas de pacientes que padecen asma de panadero

| Paciente | Sexo | Edad | Harina de trigo IgE kUA/l | Phleum pratense IgE kUA/l | IgE total kU/l | Trabajo | Años exp. | Síntomas | Otras alergias | PC20 mg/ml | SIC trigo mg/ml |
|----------|------|------|------------------------------|---------------------------------|-------------------|--------------------|--------------|----------|-----------------|------------|--------------------|
| B1 | m | 35 | 74,2 | 5,25 | 163 | Respostero | 20 | A, RC | g | 0,29 | 0,039 |
| B2 | m | 29 | 18 | 53,5 | 271 | Repostero | 12 | A, RC | g | 2 | n.d. |
| B3 | m | 36 | 1,66 | <0,35 | 353 | Panadero | 8 | A, RC | n.k. | 0,31 | n.d. |
| B4 | m | 39 | 25,8 | 0,73 | 1387 | Panadero-Repostero | 20 | A, RC, U | g | 0,25 | n.d. |
| B5 | m | 54 | <0,35 | <0,35 | 30,1 | Panadero | 42 | RC, A | n.k. | n.d. | n.d. |
| B6 | m | 35 | 24,3 | 4,67 | 416 | Panadero | 12 | RC, A | g | 0,25 | n.d. |
| B7 | m | 28 | 2,58 | <0,35 | 248 | Panadero | 14 | A, RC | c, d, h, hdm | 0,25 | n.d. |
| B8 | m | 27 | 7,86 | >100 | 1773 | Panadero | 2,6 | A, RC | n.k. | 0,47 | 0,625 |
| B9 | m | 24 | 2,35 | >100 | 204 | Panadero | 18 | RC | c, d, g, h, hdm | 0,09 | n.d. |
| B10 | m | 60 | 3,44 | <0,35 | 73,3 | Respostero | 46 | A, RC | hdm, m | 0,44 | n.d. |
| B11 | m | 22 | 3 | <0,35 | 2509 | Panadero | 5 | A, RC, U | n.k. | 3,38 | 0,0015 |
| B12 | m | 26 | >100 | >100 | 321 | Panadero-Repostero | 5 | A, RC | g | 0,5 | n.d. |
| B13 | m | 54 | 2,48 | <0,35 | 480 | Repostero | 25 | A, RC | n.k. | 0,12 | n.d. |
| B14 | m | 60 | 31,8 | <0,35 | 629 | Panadero | 13 | A | c, cr, d | 0,15 | 0,002 |
| B15 | m | 27 | 5,06 | 42,2 | 278 | Repostero | 10 | A, RC | c, cr, d, g | 0,079 | 0,078 |
| B16 | f | 42 | 3,71 | 2,15 | 271 | Pizza | 12 | A, RC, U | g | 0,187 | 0,625 |
| B17 | m | 54 | 1,68 | <0,35 | 79,2 | Repostero | 38 | A | hdm | 16 | n.d. |
| B18 | m | 59 | <0,35 | <0,35 | 673 | Panadero-Repostero | 22 | A, RC | n.k. | 0,23 | n.d. |
| B19 | m | 26 | 74,6 | 57,4 | 17,7 | Repostero | 16 | A, RC | g | 1,16 | 0,15 |
| B20 | m | 43 | 13,8 | 11 | 538 | Panadero | 19 | A | g, o | 0,25 | EAR |
| B21 | f | 34 | 2,05 | <0,35 | 229 | Repostero | 2 | A | hdm, o | 0,5 | DAR |
| B22 | f | 41 | 1,77 | <0,35 | 23,4 | Cocina/pasteletero | 1 | A | o | 0,23 | EAR |
| B23 | f | 53 | 0,41 | <0,35 | 469 | Ama de casa | n.k. | n.k. | n.k. | n.d. | n.d. |

m: varón, f: mujer, kUA/l: kilounidad de antígeno por litro, n.k.: no conocido, A: asma, RC: Rinoconjuntivitis, U: urticaria, c: gato, cr: cucaracha, d: perro, g: polen gramíneas, h: caballo, hdm: ácaros del polvo doméstico, m: mohos, o: olivo, PC20: Exposición por inhalación de metacolina (positivo si <16 mg/ml), SIC: exposición por inhalación específica, EAR: respuesta asmática temprana, DAR: respuesta asmática dual, LAR: respuesta asmática tardía, n.d.: no realizado

Tabla VIII Características demográficas, clínicas y serológicas de pacientes que padecen alergia alimentaria

| Paciente | Sexo | Edad | Harina de trigo IgE kUAI | Phleum pratense IgE kUAI | IgE total KU/I | Síntomas | DBPCFC | Otras alergias |
|----------|------|------|--------------------------|--------------------------|----------------|--------------------------------|--------|-------------------|
| F1 | f | 56 | 0,74 | <0,35 | 820 | U | n.d. | s |
| F2 | f | 50 | 0,76 | <0,35 | 275 | Ab, C, J, Di, P | n.d. | hdm |
| F3 | f | 49 | >100 | 0,65 | 1794 | dieta sin síntomas | n.d. | g, hdm, n, sh |
| F4 | f | 72 | 5,99 | <0,35 | 325 | E, D, P | n.d. | he, n, s |
| F5 | f | 11 | 2,15 | 3,28 | 11 | A, C, Ri | n.d. | g, n, s, o |
| F6 | f | 40 | 1,9 | <0,35 | 19,3 | C, C, J, S | n.d. | n.k. |
| F7 | m | 11 | 0,92 | 1,21 | 118 | n.k. | n.d. | g, n, s |
| F8 | m | 24 | 5,76 | <0,35 | 111 | C, C, J, N, R | n.d. | n.k. |
| F9 | f | 21 | 1,22 | 25,8 | 94,8 | C, N, P, R | n.d. | g |
| F10 | f | 5 | 1,93 | 34,3 | 453 | RC | n.d. | a, b, cm, g, n |
| F11 | f | 29 | 1,55 | 10,4 | 101 | De, Ri | n.d. | c, b, g, p |
| F12 | f | 45 | 5,72 | 1,12 | 30,1 | A, C, D, ampollas en la lengua | n.d. | g, n, s, r |
| F13 | m | 7 | 2,8 | >100 | <2000 | B, RC | n.d. | a, b, g |
| F14 | f | 1 | 0,81 | n.d. | 46,3 | n.k. | n.d. | cm, he |
| F15 | f | 28 | 1,27 | >100 | 616 | n.k. | n.d. | a, cm, g, l, m |
| F16 | m | 50 | 7,57 | 22,6 | 450 | A, C, D, N, RC | n.d. | b, g |
| F17 | f | 61 | 3,97 | 5,12 | 44,1 | Di, F | n.d. | f, g, n |
| F18 | f | 43 | 1,03 | 58,3 | 338 | C | n.d. | b, g, h, n, s |
| F19 | f | 19 | 20,5 | <0,35 | 949 | A, C, D, R | n.d. | n.k. |
| F20 | f | 57 | 17,6 | <0,35 | 174 | n.k. | n.d. | n.k. |
| F21 | m | 12 | 0,81 | 1,47 | 769 | A, RC | n.d. | he, g, w |
| F22 | f | 65 | 2,11 | <0,35 | 152 | Dieta sin síntomas | n.d. | n, sea |
| F23 | m | 43 | 4,24 | 2,41 | 207 | n.k. | n.d. | n.k. |
| F24 | f | 33 | 1,65 | <0,35 | 253 | n.k. | n.d. | n.k. |
| F25 | m | 51 | 1,64 | >100 | 45 | n.k. | n.d. | n.k. |
| F26 | m | 27 | 6,11 | 67,7 | 974 | C, C, J, D, Ri, en el pasado A | n.d. | ca, he, g, ce, sp |
| F27 | f | 9 | 6,47 | >100 | 1233,5 | E, Ri | + | n.k. |
| F28 | m | 0,5 | 7,39 | <0,35 | 65,2 | E, U, sibilancias | + | n.k. |
| F29 | f | 1 | 33,5 | <0,35 | 201 | Irritación, picor | + | cm, he |
| F30 | f | 1 | 10 | n.d. | 25,5 | U, picor | + | cm, he, s |
| F31 | m | 1 | 18,6 | n.d. | 1343 | U | + | s |
| F32 | m | 1 | 35,1 | 0,83 | 325 | U, Ri, picor | + | g, s |
| F33 | f | 1 | 4,27 | <0,35 | 38,4 | U, Ri, Irritación | + | n.k. |
| F34 | f | 0,5 | 21,3 | <0,35 | 1511 | U | + | Cm |
| F35 | f | 1 | 5,21 | n.d. | 1718 | AD, G, U | + | Cm |
| F36 | m | 1 | 61,4 | 0,69 | 876 | Irritación, picor | + | g, cm |
| F37 | m | 1 | 52 | 0,38 | 254 | Ri, U | + | cm, he, g |
| F38 | f | 0,5 | 94,4 | 1,9 | 1524 | De, Ri | + | n.k. |

m: varón, f: mujer, n.k.: no conocido, n.d.: no realizado, kUAI: kilounidad de antígeno por litro, A: asma, Ab: Abdominalgia, B: Bronquitis, C: Tos, C, J: Conjuntivitis, Disnea, De: Dermatitis, Di: Diarrea, E: Eczema, F: Flatulencia, G: Síntomas gastrointestinales, N: Congestión nasal, P: Prurito, R: Rinoconjuntivitis, RC: Rinoconjuntivitis, R: Rinitis, S: Irritación de garganta, U: urticaria, V: Vértigo, Vo: Vómitos, DBPCFC: Exposición alimentaria controlada por placebo, doble ciego, a: artemisa, b: polen de abedul, c: gato, ca: zanahorias, cm: leche de vaca, f: formaldehído, g: polen gramineas, h: avellana, he: huevos de gallina, hdm: ácaros del polvo doméstico, l: látex, m: malta, n: nueces, o: naranja, p: ciruela, r: arroz, s: soja, ce: aplo, sea: marisco, sh: langostinos, sp: especias, w: avispa

Tabla IX: Características demográficas, clínicas y serológicas de pacientes que padecen alergia a gramíneas

| Paciente | Sexo | Edad | Phleum pratense IgE kUA/l | Harina de trigo IgE kUA/l | IgE total kU/l | Sintomas | Otras alergias |
|----------|------|------|------------------------------|------------------------------|----------------------|----------|--------------------|
| G1 | m | 22 | 37,8 | 1,13 | 529 | D, RC, U | c, b, d, hdm, s |
| G2 | m | 30 | 44,6 | 0,52 | 290 | D, RC | b, a, hdm, d |
| G3 | f | 25 | 59,8 | <0,35 | 1004 | RC | b, d, hdm, h, ce |
| G4 | m | n.k. | 25,9 | 3,62 | 140 | RC | a, b |
| G5 | f | 22 | 37,2 | <0,35 | 566 | R | b, c, hdm |
| G6 | f | 22 | 22,4 | <0,35 | 77,4 | RC | hdm, r |
| G7 | m | 24 | 30,8 | <0,35 | 60,8 | n.k. | n.k. |
| G8 | m | 35 | 9,92 | <0,35 | 88,8 | D | b |
| G9 | m | 36 | 20,7 | 0,45 | 128 | R | ap, b, hdm |
| G10 | f | 22 | >100 | 4,13 | >5000 | RC | b, c, hdm, centeno |
| G11 | m | 41 | 49,3 | 4,01 | >2000 | A, CJ | a, b, c, hdm |
| G12 | m | 37 | n.d. | 1,11 | 243 | n.k. | n.k. |
| G13 | m | 28 | 39,3 | 1,06 | 144 | RC | b, a |
| G14 | f | 27 | >100 | <0,35 | 260 | A, RC | n.k. |
| G15 | m | 39 | >100 | 11,1 | 401 | n.k. | n.k. |
| G16 | m | 54 | >100 | 9,93 | 1528 | A, CJ | n.k. |
| G17 | m | 45 | n.d. | 1,76 | 175 | RC | d, hdm, s, p |

m: varón, f: mujer, n.k.: no conocido, n.d.: no realizado, kUA/l: kilounidad de antígeno por litro, A: Asma, C.J: Conjuntivitis, D: Disnea, RC: Rinoconjuntivitis, R: Rinitis, U: Urticaria, a: artemisa, ap: manzana, b: polen de abedul, c: gato, d: avezana, hdm: ácaros del polvo doméstico, r: conejo, s: soja, ce: apio, p: patata

Referencias

1. Quirce, S., M. Fernandez-Nieto, C. Escudero, J. Cuesta, M. de Las Heras, y J. Sastre. 2006. Bronchial responsiveness to bakery-derived allergens is strongly dependent on specific skin sensitivity. *Allergy* 61:1202-1208.
- 5 2. Constantin, C, W. D. Huber, G. Granditsch, M. Weghofer, y R. Valenta. 2005. Different profiles of wheat antigens are recognised by patients suffering from coeliac disease and IgE-mediated food allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 138:257-266.
3. Yeh, K., R. Juang, y J. Su. 1991. A rapid and efficient method for a RNA isolation from plants with high carbohydrate content. *Focus* 13:102- 103.
- 10 4. Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
5. Breiteneder, H., K. Pettenburger, A. Bito, R. Valenta, D. Kraft, H. Rumpold, O. Scheiner, y M. Breitenbach. 1989. The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *Embo J* 8:1935-1938.
- 15 6. Stern, D. A., J. Riedler, D. Nowak, C. Braun-Fahrlander, I. Swoboda, N. Balic, K. W. Chen, S. Vrtala, H. Gronlund, M. van Hage, R. Valenta, S. Spitzauer, E. Von Mutius, y D. Vercelli. 2007. Exposure to a farming environment has allergen-specific protective effects on TH2-dependent isotype switching in response to common inhalants. *J Allergy Clin Immunol* 119:351-358.
7. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- 20 8. Towbin, H., T. Staehelin, y J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.
9. Whitmore, L., y B. A. Wallace. 2004. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* 32:W668-673.
- 25 10. Kaul, S., D. Luttkopf, B. Kastner, L. Vogel, G. Holtz, S. Vieths, y A. Hoffmann. 2007. Mediator release assays based on human or murine immunoglobulin E in allergen standardization. *Clin Exp Allergy* 37:141- 150.
11. Richardson, M., y L. Cossins. 1974. Chymotryptic inhibitor I from potatoes: the amino acid sequences of subunits B, C, and D. *FEBS Lett* 45:11-13.
- 30 12. Vrtala S, Fischer S, Grote M, Vangelista L, Pastore A, Sperr WR, et al. 1999. Molecular, immunological, and structural characterization of Phl p 6, a major allergen and P-particle-associated protein from Timothy grass (*Phleum pratense*) pollen. *J Immunol* 163:5489-96.
13. Nystrand M. 2006. A multiplexed immunoassay for the rapid detection of specific IgE in allergy diagnosis. *IVDT* 2006:61.
14. Nilsson K, Bennich H, Johansson SG, Ponten J. 1970. Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient. *Clin Exp Immunol* 7:477-89.
- 35 15. Constantin C, Quirce S, Grote M, Touraev A, Swoboda I, Stoecklinger A, et al. Molecular and immunological characterization of a wheat serine proteinase-inhibitor as a novel allergen in baker's asthma. No publicado.
16. Laffer S, Valenta R, Vrtala S, Susani M, van Ree R, Kraft D, et al. 1994. Complementary DNA cloning of the major allergen Phl p I from timothy grass (*Phleum pratense*); recombinant Phl p I inhibits IgE binding to group I allergens from eight different grass species. *J Allergy Clin Immunol* 94:689-98.
- 40 17. Vrtala S, Sperr WR, Reimitzer I, van Ree R, Laffer S, Muller WD, et al. 1993. cDNA cloning of a major allergen from timothy grass (*Phleum pratense*) pollen; characterization of the recombinant Phl pV allergen. *J Immunol* 151:4773-81.
18. Niederberger V, Hayek B, Vrtala S, Laffer S, Twardosz A, Vangelista L, et al. 1999. Calcium-dependent immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound form of a cross-reactive two EF-hand timothy grass pollen allergen, Phl p 7. *Faseb J* 13:843-56.
- 45 19. Valenta R, Ball T, Vrtala S, Duchene M, Kraft D, Scheiner O. 1994. cDNA cloning and expression of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen profilin in *Escherichia coli*: comparison with birch pollen profilin. *Biochem Biophys Res Commun* 199:106-18.
- 50 20. Kazemi-Shirazi L, Niederberger V, Linhart B, Lidholm J, Kraft D, Valenta R. 2002. Recombinant marker allergens: diagnostic gatekeepers for the treatment of allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 127:259-68.

21. Andersson K, Lidholm J. 2003. Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 130:87-107.
22. Sampson HA. 1999. Food allergy. Parte 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol* 103:981-9.
- 5 23. Radauer C, Willeroider M, Fuchs H, Hoffmann-Sommergruber K, Thalhamer J, Ferreira F, et al. 2006. Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis. *Clin Exp Allergy* 36:920-9.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Phadia AB

5 <120> Nuevos alérgenos de trigo

<130> P08081SE00

<140> SE0702680-0

10 <141> 30-11-2007

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1

<211> 418

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

20 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(252)

<223> Clon 10

25 <400> 1

| | |
|--|-----|
| atg agc cct gtg gtg aag aag ccg gag gga ggg aac acc gat act ggt | 48 |
| Met Ser Pro Val Val Lys Lys Pro Glu Gly Gly Asn Thr Asp Thr Gly | |
| 1 5 10 15 | |
| gac cat cac aac cag aag acg gag tgg cca gag ttg gtg ggg aag tcg | 96 |
| Asp His His Asn Gln Lys Thr Glu Trp Pro Glu Leu Val Gly Lys Ser | |
| 20 25 30 | |
| gtg gag gag gcc aag aag gtg att atg cag gac aag tca gag gca cag | 144 |
| Val Glu Glu Ala Lys Lys Val Ile Met Gln Asp Lys Ser Glu Ala Gln | |
| 35 40 45 | |
| atc gta gtt cta ccg gtg ggg aca att gtg acc atg gaa tat cga atc | 192 |
| Ile Val Val Leu Pro Val Gly Thr Ile Val Thr Met Glu Tyr Arg Ile | |
| 50 55 60 | |
| gac cgt gtc cgc ctc ttt gtt gac agt ctc gac aaa att gcc cag gtc | 240 |
| Asp Arg Val Arg Leu Phe Val Asp Ser Leu Asp Lys Ile Ala Gln Val | |
| 65 70 75 80 | |
| ccc agg gtc ggc tagcaagcctt aagatctagc ctgctcctag cgtatatgta | 292 |
| Pro Arg Val Gly | |
| tcgtggccttg ataatctott cttggatata gcaagattga gatatataga tcatatacaa | 352 |
| taagagttga tgcattgaaa gtgaatggat aatagaataa gtcagagagc gcgtaaaaaa | 412 |
| aaaaaa | 418 |

ES 2 634 241 T3

Met Ser Pro Val Val Lys Lys Pro Glu Gly Gly Asn Thr Asp Thr Gly
 1 5 10 15

Asp His His Asn Gln Lys Thr Glu Trp Pro Glu Leu Val Gly Lys Ser
 20 25 30

Val Glu Glu Ala Lys Lys Val Ile Met Gln Asp Lys Ser Glu Ala Gln
 35 40 45

Ile Val Val Leu Pro Val Gly Thr Ile Val Thr Met Glu Tyr Arg Ile
 50 55 60

Asp Arg Val Arg Leu Phe Val Asp Ser Leu Asp Lys Ile Ala Gln Val
 65 70 75 80

Pro Arg Val Gly

<210> 3
 <211> 755
 5 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (49)..(402)
 <223> Clon 37

<400> 3
 ccgcgcacgc accaaaatca ccttcgatct catcaccggg gaaggggg atg gcc gcc 57
 Met Ala Ala
 1

gag gag gga gcc gtg ata gcg tgc cac acc aag caa gag ttc gac acc 105
 Glu Glu Gly Ala Val Ile Ala Cys His Thr Lys Gln Glu Phe Asp Thr
 5 10 15

cac atg gct aat ggc aag gag acc ggc aag ctg gtg atc att gac ttc 153
 His Met Ala Asn Gly Lys Glu Thr Gly Lys Leu Val Ile Ile Asp Phe
 20 25 30 35

act gct tcc tgg tgc ggt cct tgt cgt gtc ata gcc cca gtc ttt gct 201
 Thr Ala Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg Val Ile Ala Pro Val Phe Ala
 40 45 50

gag tac gcc aag aag ttc cct ggc gcc att ttc ctg aag gtg gac gtt 249
 Glu Tyr Ala Lys Lys Phe Pro Gly Ala Ile Phe Leu Lys Val Asp Val
 55 60 65

gac gag ctg aag gac gtc gct gaa gca tac aac gtt gag gca atg ccg 297

ES 2 634 241 T3

Asp Glu Leu Lys Asp Val Ala Glu Ala Tyr Asn Val Glu Ala Met Pro
 70 75 80

acc ttc ctg ttt atc aag gat ggt gcg aag gtg gac act gtt gtc ggt 345
 Thr Phe Leu Phe Ile Lys Asp Gly Ala Lys Val Asp Thr Val Val Gly
 85 90 95

ggc agg aag gat gat atc cat acc aag ata gtg gcc ctc atg ggt tct 393
 Gly Arg Lys Asp Asp Ile His Thr Lys Ile Val Ala Leu Met Gly Ser
 100 105 110 115

gca tct gcc taagaagggga agagtgatgc ccctcttctgtg tcaataagag 442
 Ala Ser Ala

ccagcacctg gtgtaagtag ttatcgctgc agtatgcttt ggcttagtcg tgactgaact 502

ttgtgatgat tcggtttaga gttcagaact tcagacattt gcaccgggtg ttctgaatta 562

cagtacctaa tgttttgcta cagttgcttc gttgtgaagt ttggataact atcctgtctg 622

aatgttaatg caaagccaat atgccgctga cgggaattcca agctgagcgc cggtcgctac 682

cattaccagt tggctctggtg tcaacgggat ccgcgaatca cgaattctgg atccgatacg 742

taacgcgtct gca 755

<210> 4
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

5

<400> 4
 Met Ala Ala Glu Glu Gly Ala Val Ile Ala Cys His Thr Lys Gln Glu
 1 5 10 15

Phe Asp Thr His Met Ala Asn Gly Lys Glu Thr Gly Lys Leu Val Ile
 20 25 30

Ile Asp Phe Thr Ala Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg Val Ile Ala Pro
 35 40 45

Val Phe Ala Glu Tyr Ala Lys Lys Phe Pro Gly Ala Ile Phe Leu Lys
 50 55 60

Val Asp Val Asp Glu Leu Lys Asp Val Ala Glu Ala Tyr Asn Val Glu
 65 70 75 80

Ala Met Pro Thr Phe Leu Phe Ile Lys Asp Gly Ala Lys Val Asp Thr
 85 90 95

Val Val Gly Gly Arg Lys Asp Asp Ile His Thr Lys Ile Val Ala Leu
 100 105 110
 Met Gly Ser Ala Ser Ala

10

115

<210> 5
 <211> 854
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (55)..(720)
 <223> Clon 38

10

<400> 5
 cggaattccc aaacacaaaac acagatcgat cgagatccag agcaaccagg agca atg 57
 Met
 1

gcg ggc gag aag ggc ctg gtg ctg ctg gac ttc tgg gtg agc ccg ttc 105
 Ala Gly Glu Lys Gly Leu Val Leu Leu Asp Phe Trp Val Ser Pro Phe
 5 10 15

ggg cag cgc gtc cgc atc gcg ctg gcg gag aag ggc ctg ccc tac gag 153
 Gly Gln Arg Val Arg Ile Ala Leu Ala Glu Lys Gly Leu Pro Tyr Glu
 20 25 30

tac gcg gag gag gac ctg atg gcc ggc aag agc gac cgc ctc ctc cgc 201
 Tyr Ala Glu Glu Asp Leu Met Ala Gly Lys Ser Asp Arg Leu Leu Arg
 35 40 45

gcc aac ccg gtg cac aag aag atc ccg gtg ctc ctc cac gac ggc cgc 249
 Ala Asn Pro Val His Lys Lys Ile Pro Val Leu Leu His Asp Gly Arg
 50 55 60 65

ccc gtc aac gag tcc ctc atc atc ctc cag tac ctg gag gac gcc ttc 297
 Pro Val Asn Glu Ser Leu Ile Ile Leu Gln Tyr Leu Glu Asp Ala Phe
 70 75 80

ccg gac gcc ccg gca ctg ctc ccc tcc gac ccc tac gcg cgc gcg cag 345
 Pro Asp Ala Pro Ala Leu Leu Pro Ser Asp Pro Tyr Ala Arg Ala Gln
 85 90 95

gcc cgc ttc tgg gcc gac tac gtc gac aag aag gtc tac gac tgc ggc 393
 Ala Arg Phe Trp Ala Asp Tyr Val Asp Lys Lys Val Tyr Asp Cys Gly
 100 105 110

tcc cgc ctc tgg aag ctc aag ggc gag ccg cag gcg cag gcg cgc gcc 441
 Ser Arg Leu Trp Lys Leu Lys Gly Glu Pro Gln Ala Gln Ala Arg Ala
 115 120 125

gag atg ctg gac atc ctc aag acc ctc gac ggc gcg ctc ggg gac aag 489
 Glu Met Leu Asp Ile Leu Lys Thr Leu Asp Gly Ala Leu Gly Asp Lys
 130 135 140 145

ccc ttc ttc ggc ggc gac aag ttc ggg ttc gtc gac gcc gcc ttc gcg 537
 Pro Phe Phe Gly Gly Asp Lys Phe Gly Phe Val Asp Ala Ala Phe Ala
 150 155 160

ES 2 634 241 T3

ccc ttc acc gcg tgg ttc cac agc tac gag agg tac ggc gag ttc agc 585
 Pro Phe Thr Ala Trp Phe His Ser Tyr Glu Arg Tyr Gly Glu Phe Ser
 165 170 175

ctg ccg gag gtg gcg ccc aag atc gcg gcg tgg gcc aag cgc tgc ggc 633
 Leu Pro Glu Val Ala Pro Lys Ile Ala Ala Trp Ala Lys Arg Cys Gly
 180 185 190

gag cgg gag agc gtc gcc aag agc ctc tac tcg ccg gac aag gtg tac 681
 Glu Arg Glu Ser Val Ala Lys Ser Leu Tyr Ser Pro Asp Lys Val Tyr
 195 200 205

gac ttc atc ggc ctg ctc aag aag aag tac ggc atc gag tagccgcgcg 730
 Asp Phe Ile Gly Leu Leu Lys Lys Lys Tyr Gly Ile Glu
 210 215 220

gacggacggg cggccatgca tgcgccatcc cgccggccgg ccaataaatc agggagcgtt 790

tgggtggccc tacagtgcgt acgtttcgga tattgatttc ttcgtggagt ctagtgttcg 850

tgcg 854

<210> 6

<211> 222

5 <212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 6

Met Ala Gly Glu Lys Gly Leu Val Leu Leu Asp Phe Trp Val Ser Pro
 1 5 10 15

Phe Gly Gln Arg Val Arg Ile Ala Leu Ala Glu Lys Gly Leu Pro Tyr
 20 25 30

Glu Tyr Ala Glu Glu Asp Leu Met Ala Gly Lys Ser Asp Arg Leu Leu
 35 40 45

Arg Ala Asn Pro Val His Lys Lys Ile Pro Val Leu Leu His Asp Gly
 50 55 60

Arg Pro Val Asn Glu Ser Leu Ile Ile Leu Gln Tyr Leu Glu Asp Ala
 65 70 75 80

Phe Pro Asp Ala Pro Ala Leu Leu Pro Ser Asp Pro Tyr Ala Arg Ala
 85 90 95

Gln Ala Arg Phe Trp Ala Asp Tyr Val Asp Lys Lys Val Tyr Asp Cys
 100 105 110

Gly Ser Arg Leu Trp Lys Leu Lys Gly Glu Pro Gln Ala Gln Ala Arg
 115 120 125

ES 2 634 241 T3

Ala Glu Met Leu Asp Ile Leu Lys Thr Leu Asp Gly Ala Leu Gly Asp
 130 135 140

Lys Pro Phe Phe Gly Gly Asp Lys Phe Gly Phe Val Asp Ala Ala Phe
 145 150 155 160

Ala Pro Phe Thr Ala Trp Phe His Ser Tyr Glu Arg Tyr Gly Glu Phe
 165 170 175

Ser Leu Pro Glu Val Ala Pro Lys Ile Ala Ala Trp Ala Lys Arg Cys
 180 185 190

Gly Glu Arg Glu Ser Val Ala Lys Ser Leu Tyr Ser Pro Asp Lys Val
 195 200 205

Tyr Asp Phe Ile Gly Leu Leu Lys Lys Lys Tyr Gly Ile Glu
 210 215 220

<210> 7
 <211> 891
 5 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(654)
 <223> Clon 112

<400> 7
 atg ccg ggc ctc acc atc ggc gac acc gtc ccc aac ctg gag ctg gac 48
 Met Pro Gly Leu Thr Ile Gly Asp Thr Val Pro Asn Leu Glu Leu Asp
 1 5 10 15
 tcc acc cat ggc aag atc cgc atc cac gac tac gtc ggc aac ggc tac 96
 Ser Thr His Gly Lys Ile Arg Ile His Asp Tyr Val Gly Asn Gly Tyr
 20 25 30
 gtc atc ctc ttc tcc cac ccc ggt gat ttc acc ccg gtg tgc acg acg 144
 Val Ile Leu Phe Ser His Pro Gly Asp Phe Thr Pro Val Cys Thr Thr
 35 40 45
 gag ctg gcg gcc atg gcc aac tac gcc aag gag ttc gag aag cgg ggc 192
 Glu Leu Ala Ala Met Ala Asn Tyr Ala Lys Glu Phe Glu Lys Arg Gly
 50 55 60
 gtg aag ctg ctc ggc atc tcc tgc gac gac gtg cag tcc cac aag gag 240
 Val Lys Leu Leu Gly Ile Ser Cys Asp Asp Val Gln Ser His Lys Glu
 65 70 75 80
 tgg acc aag gac atc gag gcc tac aag cct ggg agc agg gtg acg tac 288
 Trp Thr Lys Asp Ile Glu Ala Tyr Lys Pro Gly Ser Arg Val Thr Tyr
 85 90 95

ES 2 634 241 T3

ccg atc atg gcg gac ccg gac cgc tcc gcc atc aag cag ctc aac atg 336
 Pro Ile Met Ala Asp Pro Asp Arg Ser Ala Ile Lys Gln Leu Asn Met
 100 105 110

 gtc gac ccg gac gag aag gac ggc cag ggg cag ctg ccg tcc cgc acc 384
 Val Asp Pro Asp Glu Lys Asp Gly Gln Gly Gln Leu Pro Ser Arg Thr
 115 120 125

 ctg cac atc gtg ggg ccg gac aag gtg gtg aag ctg agc ttc ctg tac 432
 Leu His Ile Val Gly Pro Asp Lys Val Val Lys Leu Ser Phe Leu Tyr
 130 135 140

 ccg tcg tgc acg ggg ccg aac atg gac gag gtg gtg ccg gcc gtg gac 480
 Pro Ser Cys Thr Gly Arg Asn Met Asp Glu Val Val Arg Ala Val Asp
 145 150 155 160

 tcg ctg ctg acg gcg gcc aag cac aag gtg gcc acc ccg gcc aac tgg 528
 Ser Leu Leu Thr Ala Ala Lys His Lys Val Ala Thr Pro Ala Asn Trp
 165 170 175

 aag ccc ggg gag tgc gtg gtg atc gcg ccc ggc gtc tcc gac gag gag 576
 Lys Pro Gly Glu Cys Val Val Ile Ala Pro Gly Val Ser Asp Glu Glu
 180 185 190

 gcc aag aag atg ttc ccg cag ggg ttc gag acc gcc gac ctg ccc tcc 624
 Ala Lys Lys Met Phe Pro Gln Gly Phe Glu Thr Ala Asp Leu Pro Ser
 195 200 205

 aag aag ggg tac ctc cgc ttc acc aag gtc taggcgtgcg cccgtgctag 674
 Lys Lys Gly Tyr Leu Arg Phe Thr Lys Val
 210 215

 ctcgtecgcg cttgctcggc tacttcaact gtggcggtct gtgtcatcgt ggtgctgctg 734

 tacttttgtg gtgctttatc tcgttttctc tgtaaatacta ctagcgtcgc cgagctatgt 794

 atgtgtactg tgacttttgt ctctttcatg tgtttcgatc gccggtgtat acatgggtgt 854

 gtggtgggac tgttaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 891

<210> 8
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

5

<400> 8
 Met Pro Gly Leu Thr Ile Gly Asp Thr Val Pro Asn Leu Glu Leu Asp
 1 5 10 15

 Ser Thr His Gly Lys Ile Arg Ile His Asp Tyr Val Gly Asn Gly Tyr
 20 25 30

 Val Ile Leu Phe Ser His Pro Gly Asp Phe Thr Pro Val Cys Thr Thr
 35 40 45

ES 2 634 241 T3

Glu Leu Ala Ala Met Ala Asn Tyr Ala Lys Glu Phe Glu Lys Arg Gly
 50 55 60

Val Lys Leu Leu Gly Ile Ser Cys Asp Asp Val Gln Ser His Lys Glu
 65 70 75 80

Trp Thr Lys Asp Ile Glu Ala Tyr Lys Pro Gly Ser Arg Val Thr Tyr
 85 90 95

Pro Ile Met Ala Asp Pro Asp Arg Ser Ala Ile Lys Gln Leu Asn Met
 100 105 110

Val Asp Pro Asp Glu Lys Asp Gly Gln Gly Gln Leu Pro Ser Arg Thr
 115 120 125

Leu His Ile Val Gly Pro Asp Lys Val Val Lys Leu Ser Phe Leu Tyr
 130 135 140

Pro Ser Cys Thr Gly Arg Asn Met Asp Glu Val Val Arg Ala Val Asp
 145 150 155 160

Ser Leu Leu Thr Ala Ala Lys His Lys Val Ala Thr Pro Ala Asn Trp
 165 170 175

Lys Pro Gly Glu Cys Val Val Ile Ala Pro Gly Val Ser Asp Glu Glu
 180 185 190

Ala Lys Lys Met Phe Pro Gln Gly Phe Glu Thr Ala Asp Leu Pro Ser
 195 200 205

Lys Lys Gly Tyr Leu Arg Phe Thr Lys Val
 210 215

<210> 9
 <211> 987
 5 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (64)..(702)
 <223> Clon 126

<400> 9
 ccttgcaagc caccgccccca aactgtgaaa ccccgtcaga aggaagcacc gtcgagagaa 60

gta atg gcg gac tac ggt gga gag tac ggg cac ccg tac ccg cgc gtc 108
 Met Ala Asp Tyr Gly Gly Glu Tyr Gly His Pro Tyr Pro Arg Val
 1 5 10 15

ES 2 634 241 T3

gac gag tac ggc aac cca gtg ccg ccg gtc gac cag tac ggc aac ccc 156
 Asp Glu Tyr Gly Asn Pro Val Pro Pro Val Asp Gln Tyr Gly Asn Pro
 20 25 30

atc cca agg gaa ccg ggc cag gtt ccg gcg tac acc tcg ggg ggc gcc 204
 Ile Pro Arg Glu Pro Gly Gln Val Pro Ala Tyr Thr Ser Gly Gly Ala
 35 40 45

gct ccg ccc tac agc tct gac ggc gcg ggc gcg gtg acg tcg gcc gac 252
 Ala Pro Pro Tyr Ser Ser Asp Gly Ala Gly Ala Val Thr Ser Ala Asp
 50 55 60

tat gga gcg ggt gtc acg ccg ggc tac ggc ctg agc ggc gcc gtg cac 300
 Tyr Gly Ala Gly Val Thr Pro Gly Tyr Gly Leu Ser Gly Ala Val His
 65 70 75

ccg cag gag agc gtg gta ggc ggt gcc gtt ttc ccg tcc ggc acg gcg 348
 Pro Gln Glu Ser Val Val Gly Gly Ala Val Phe Pro Ser Gly Thr Ala
 80 85 90 95

cac acg cac gag ggc gcg cta agc ggc agc ctc gcc cct ggc gag acc 396
 His Thr His Glu Gly Ala Leu Ser Gly Ser Leu Ala Pro Gly Glu Thr
 100 105 110

acg gca tac gct tat gag ggc atg gtc ggc agt ggc atc ggc acc ggc 444
 Thr Ala Tyr Ala Tyr Glu Gly Met Val Gly Ser Gly Ile Gly Thr Gly
 115 120 125

gac cag atc cag ccc acc aaa gag ggg cac acg acg ctg ggc gag act 492
 Asp Gln Ile Gln Pro Thr Lys Glu Gly His Thr Thr Leu Gly Glu Thr
 130 135 140

ttg cgg cgc tcc tcc agc tct agc tcc agc tcg tcg tcc gag gat gac 540
 Leu Arg Arg Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Asp Asp
 145 150 155

ggg caa ggc ggg agg cag agg aag aag aag agc atg aag gcg aag ata 588
 Gly Gln Gly Gly Arg Gln Arg Lys Lys Lys Ser Met Lys Ala Lys Ile
 160 165 170 175

aag gag aaa ctc ccg ggc agc cac aag cag gag gag cac aag gcc ggc 636
 Lys Glu Lys Leu Pro Gly Ser His Lys Gln Glu Glu His Lys Ala Gly
 180 185 190

cac acg gtg cca ccg gct ggg acg ggg acg cac gag aag atc aag gag 684
 His Thr Val Pro Pro Ala Gly Thr Gly Thr His Glu Lys Ile Lys Glu
 195 200 205

aag ctc cct gga cac cac tgagcaacat caacatctgc ggcgcctcag 732
 Lys Leu Pro Gly His His
 210

ttgacacgga attcgctttc ttggaccatg tacgacctaa attgtcactc gctgggtctg 792

taatgagctc gctatagcct tctgtacaat gattaagggt atttccttct gccttcttcg 852

tgtgtgtgat cgggtgtgat agttgtatga gctagatttg gtggtgttcg tgttggtgta 912

tgcttagagc ctctttggga ctgctctgct tcgtaaaatt cagctccgct tcagaaaaaa 972
 aaaaaaaaaa aaaaa 987

5 <210> 10
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

ES 2 634 241 T3

<400> 10

Met Ala Asp Tyr Gly Gly Glu Tyr Gly His Pro Tyr Pro Arg Val Asp
 1 5 10 15

Glu Tyr Gly Asn Pro Val Pro Pro Val Asp Gln Tyr Gly Asn Pro Ile
 20 25 30

Pro Arg Glu Pro Gly Gln Val Pro Ala Tyr Thr Ser Gly Gly Ala Ala
 35 40 45

Pro Pro Tyr Ser Ser Asp Gly Ala Gly Ala Val Thr Ser Ala Asp Tyr
 50 55 60

Gly Ala Gly Val Thr Pro Gly Tyr Gly Leu Ser Gly Ala Val His Pro
 65 70 75 80

Gln Glu Ser Val Val Gly Gly Ala Val Phe Pro Ser Gly Thr Ala His
 85 90 95

Thr His Glu Gly Ala Leu Ser Gly Ser Leu Ala Pro Gly Glu Thr Thr
 100 105 110

Ala Tyr Ala Tyr Glu Gly Met Val Gly Ser Gly Ile Gly Thr Gly Asp
 115 120 125

Gln Ile Gln Pro Thr Lys Glu Gly His Thr Thr Leu Gly Glu Thr Leu
 130 135 140

Arg Arg Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Asp Asp Gly
 145 150 155 160

Gln Gly Gly Arg Gln Arg Lys Lys Lys Ser Met Lys Ala Lys Ile Lys
 165 170 175

Glu Lys Leu Pro Gly Ser His Lys Gln Glu Glu His Lys Ala Gly His
 180 185 190

Thr Val Pro Pro Ala Gly Thr Gly Thr His Glu Lys Ile Lys Glu Lys
 195 200 205
 Leu Pro Gly His His
 210

5

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con el SEQ ID NO: 2.
- 5 2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que se aísla de trigo o se produce de forma recombinante.
3. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2.
4. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, que tiene la secuencia de nucleótidos de acuerdo con el SEQ ID NO: 1.
5. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, para su uso en terapia.
- 10 6. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, para su uso en la terapia de la alergia mediada por IgE.
7. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con los SEQ ID NO: 4 ó 6, para su uso en terapia.
8. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con los SEQ ID NO: 4 ó 6, para su uso en la terapia de la alergia mediada por IgE.
- 15 9. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con los SEQ ID NO: 2, 4, 6, ó 10 modificado para anular o atenuar su respuesta de unión a IgE a la vez que es capaz de provocar una respuesta de IgG, y opcionalmente excipientes, portadores, tampones y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
- 20 10. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha forma hipoalergénica de dicho polipéptido se modifica por fragmentación, truncamiento o formación de tándems de la molécula, delección de segmentos internos, reordenamiento de dominios, sustitución de residuos de aminoácidos, rotura de puentes disulfuro.
11. Un método para el diagnóstico in vitro de alergia mediada por IgE, que comprende las etapas de
- 25 - poner en contacto una muestra de fluido corporal de un mamífero que se sospecha que tiene alergia mediada por IgE con al menos un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con los SEQ ID NO: 2, 4, 6, ó 10; y
- detectar la presencia, en la muestra, de anticuerpos IgE que se unen específicamente a dicho polipéptido o polipéptidos;
- 30 en donde la presencia de tales anticuerpos que se unen específicamente a dicho polipéptido o dichos polipéptidos es indicativa de alergia mediada por IgE.
12. Método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la alergia mediada por IgE es alergia respiratoria a la harina de trigo.
13. Un kit de diagnóstico para llevar a cabo el método de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, que comprende un polipéptido que tiene el aminoácido de acuerdo con el SEQ ID NO: 2.

35

Secuencia del clon num. 10:

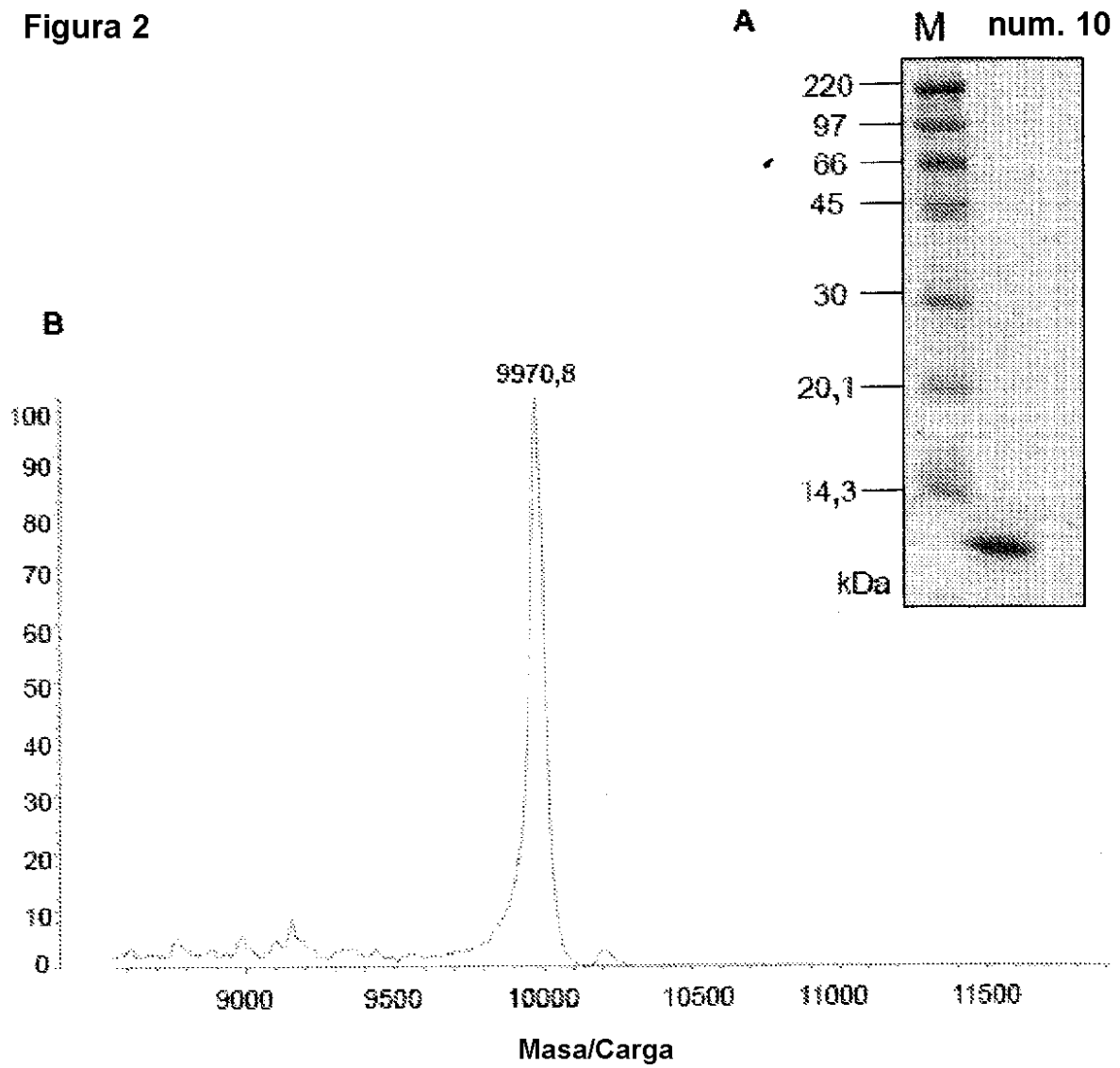
```

1   ATG AGC CCT GTG GTG AAG AAG CCG GAG GGA GGC AAC ACC
    M  S  P  V  V  K  K  P  E  G' G  N  T  13
40  GAT ACT GGT GAC CAT CAC AAC CAG AAG ACG GAG TGG CCA
    D  T  G  D  H  H  N  Q  K  T  E  W  P  26
79  GAG TTG GTG GGG AAG TCG GTG GAG GAG GCC AAG AAG GTG
    E  L  V  G  K  S  V  E  E  A  K  K  V  39
118 ATT ATG CAG GAC AAG TCA GAG GCA CAG ATC GTA GTT CTA
    I  M  Q  D  K  S  E  A  Q  I  V  V  L  52
157 CCG GTG GGG ACA ATT GTG ACC ATG GAA TAT CEA ATC GAC
    P  V  G  T  I  V  T  M  E  Y  R  I  D  65
196 CGT GTC CGC CTC TTT GTT GAC AGT CTC GAC AAA ATT GCC
    R  V  R  L  F  V  D  S  L  D  K  I  A  78
235 CAG GTC CCC AGG GTC GGC tagcaagcttaagatctagecctgctcct
    Q  V  P  R  V  G                                84
281 agcgtatatgtatcgttggettataaatctctcttggatatagcaagattga
333 gatatatagatcatatacaataagagttgatgcatggaaagtgaatggataa
385 tagaataagt cagagagcgcgtaaaaaaaaaaaaaa

```

Figura 1

Figura 2



C

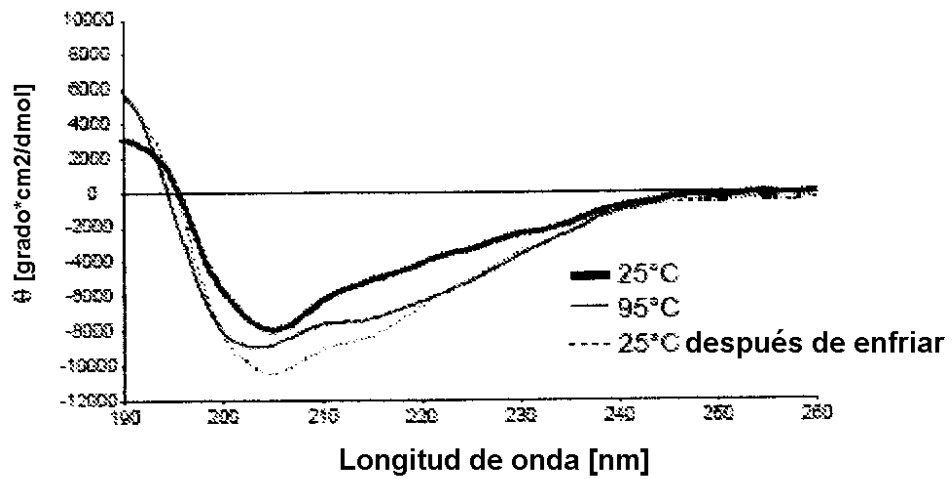


Figura 3

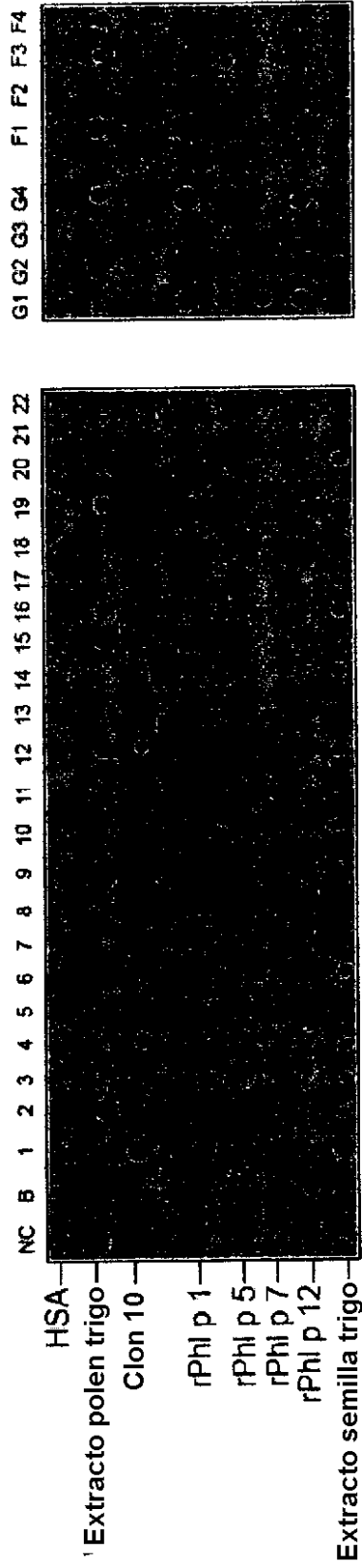


Figura 4

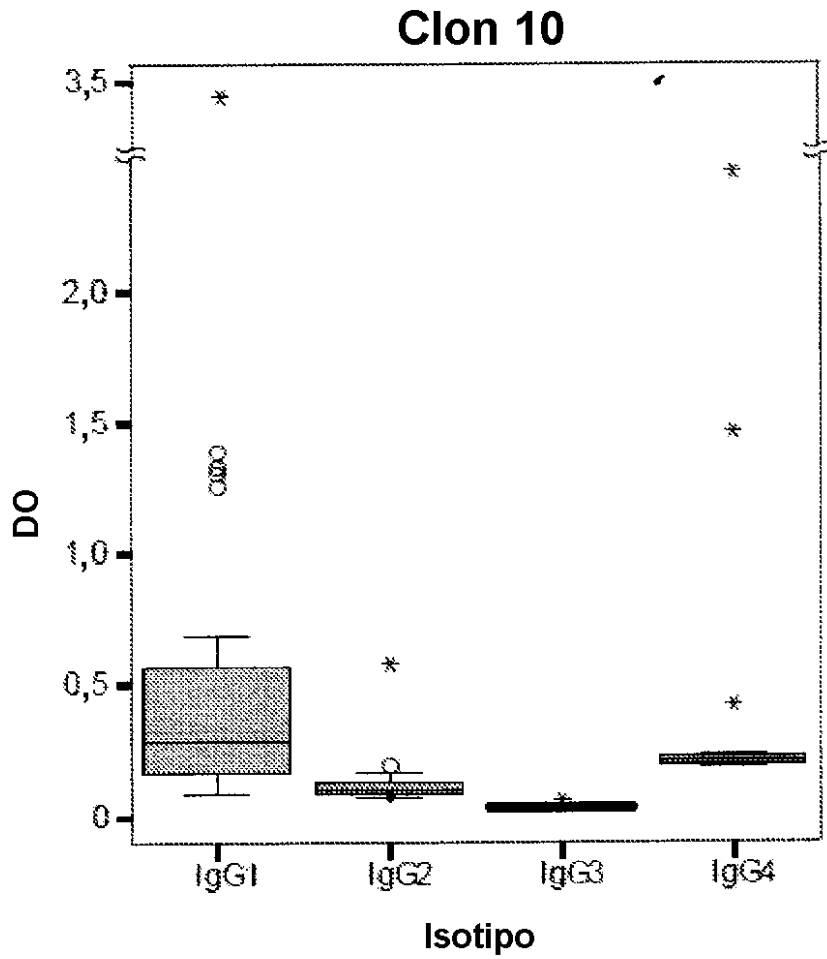


Figura 5

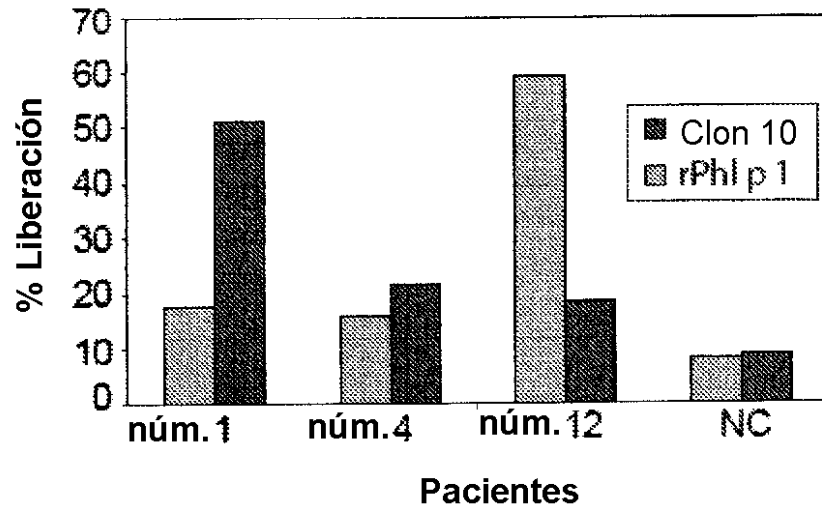


Figura 6

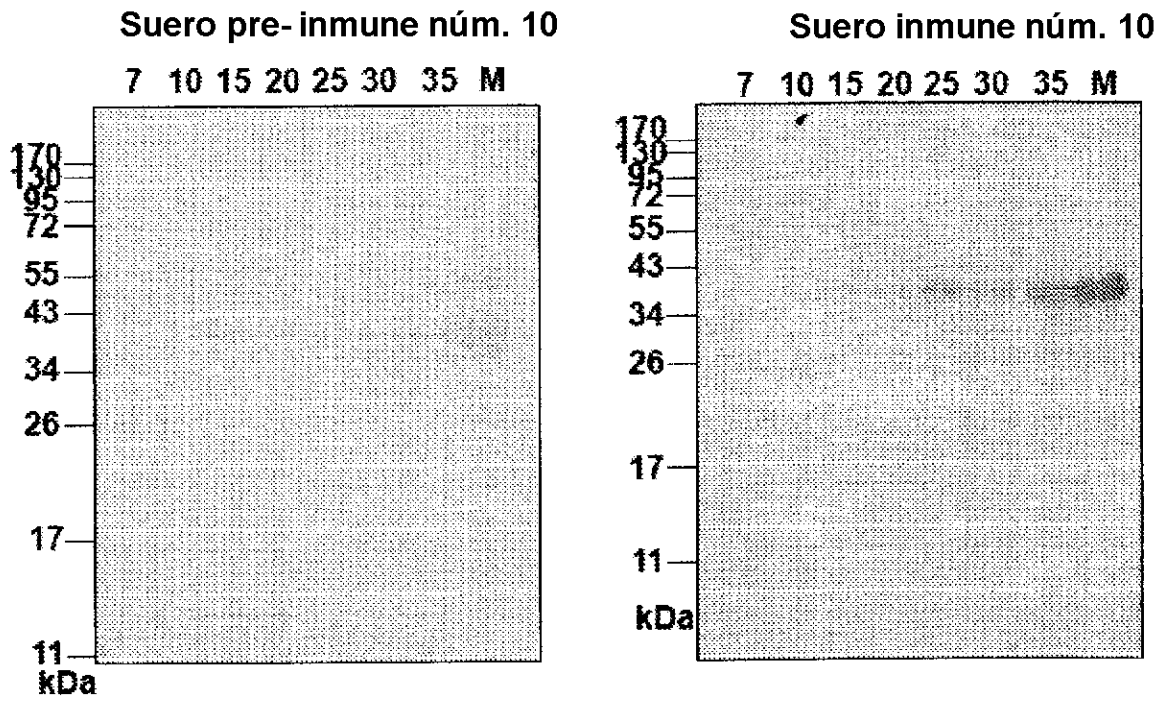


Figura 7

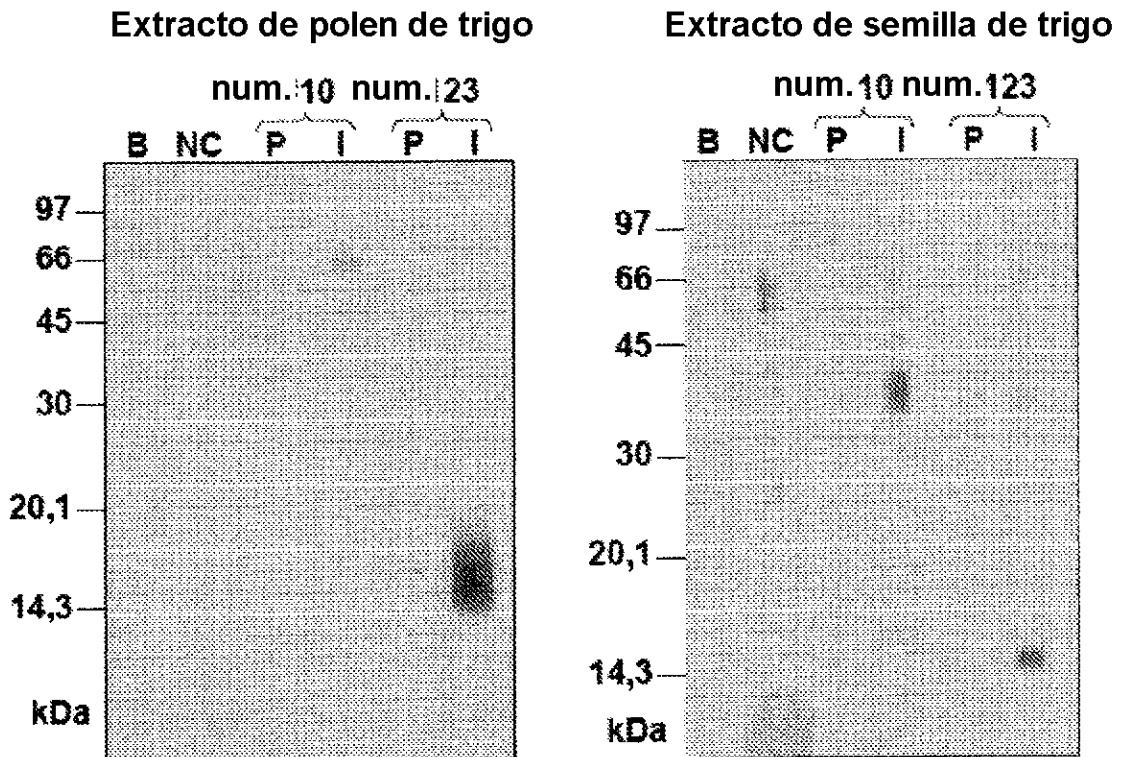
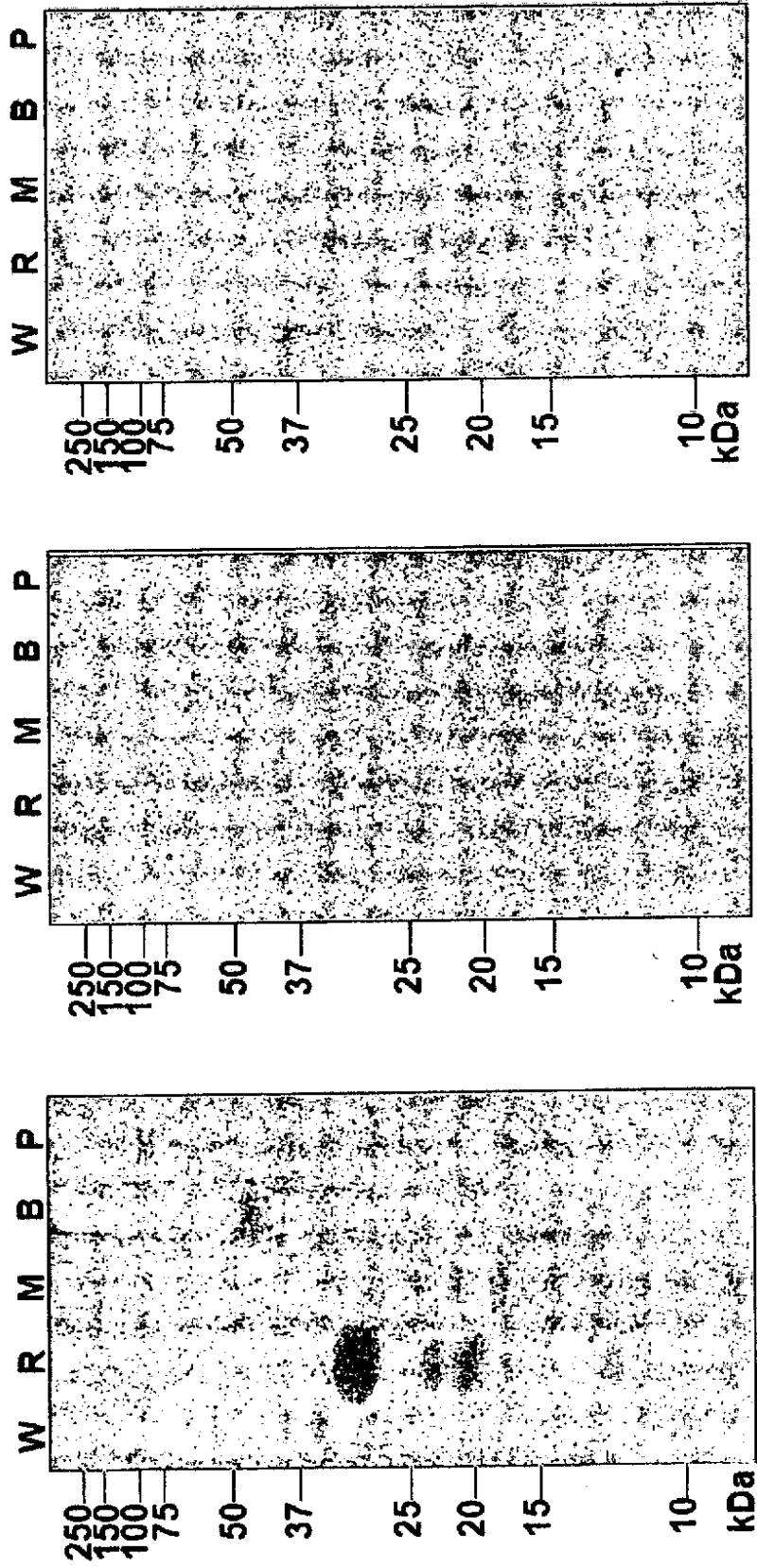


Figura 8



A

B

C

Figura 9

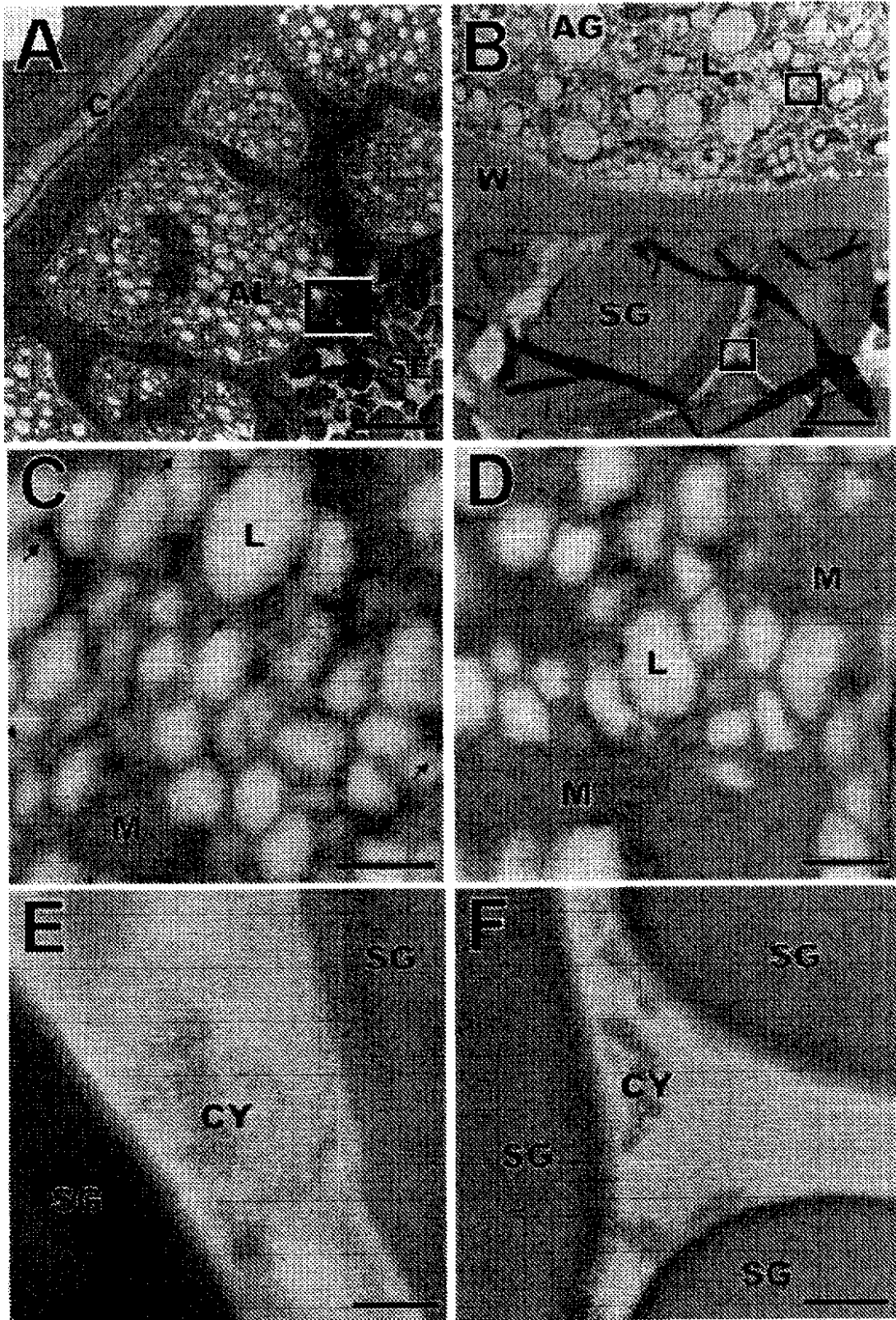
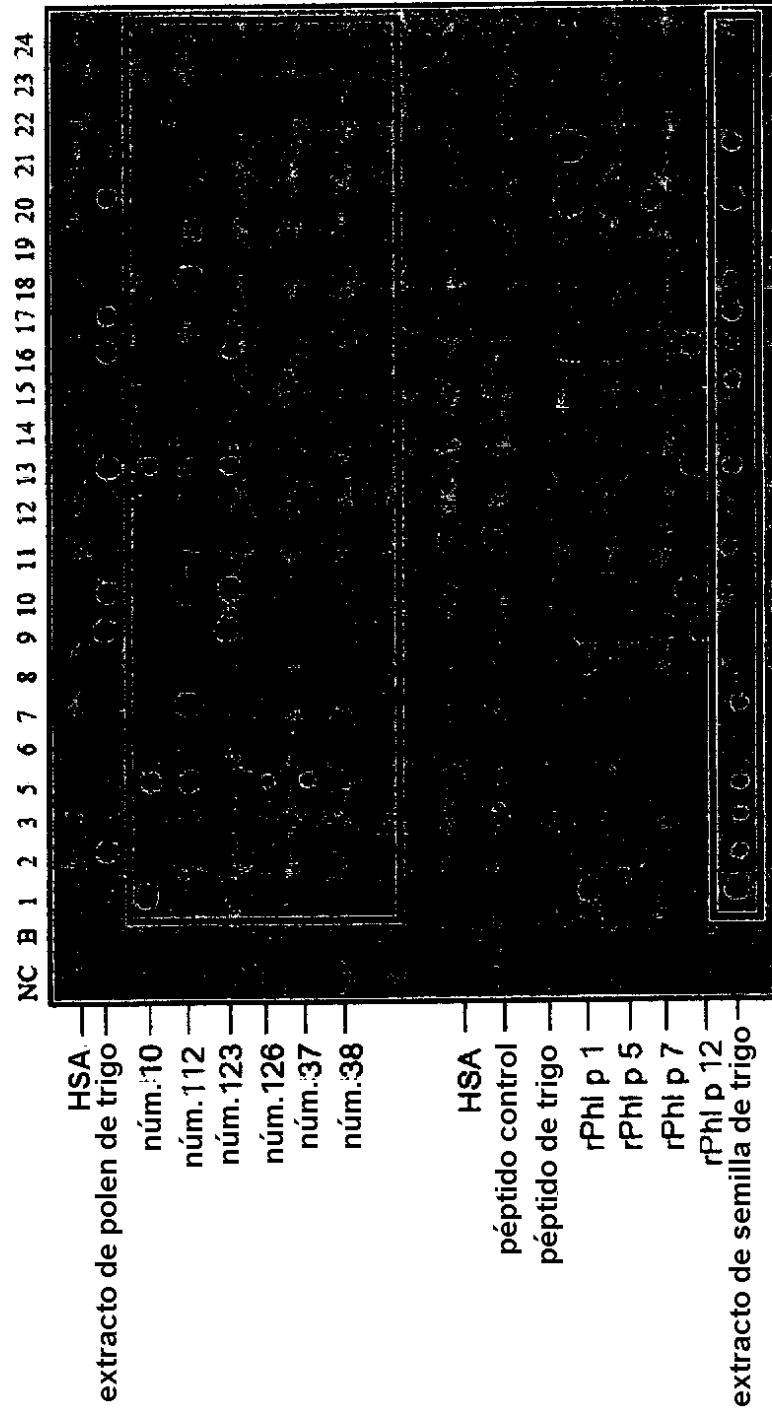


Figura 10

Transferencia puntual de IgE de pacientes que padecen asma de panadero



Transferencia puntual de IgE de pacientes que padecen alergia alimentaria al trigo y alergia al polen de gramíneas

Pacientes alérgicos a polen de gramíneas Pacientes alérgicos a alimentos

B NC 1 2 3 4 5 6 7 8

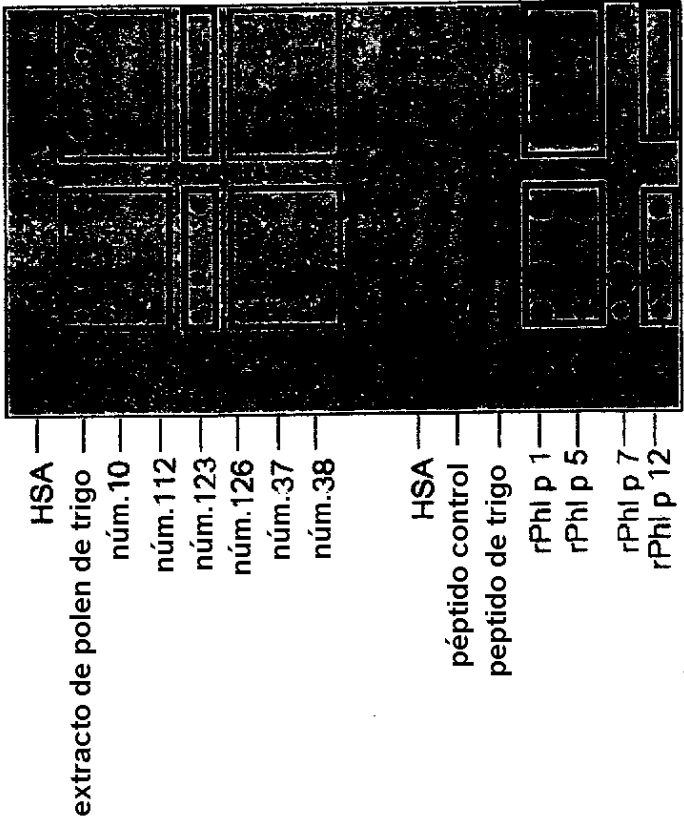


Figura 11

Figura 12

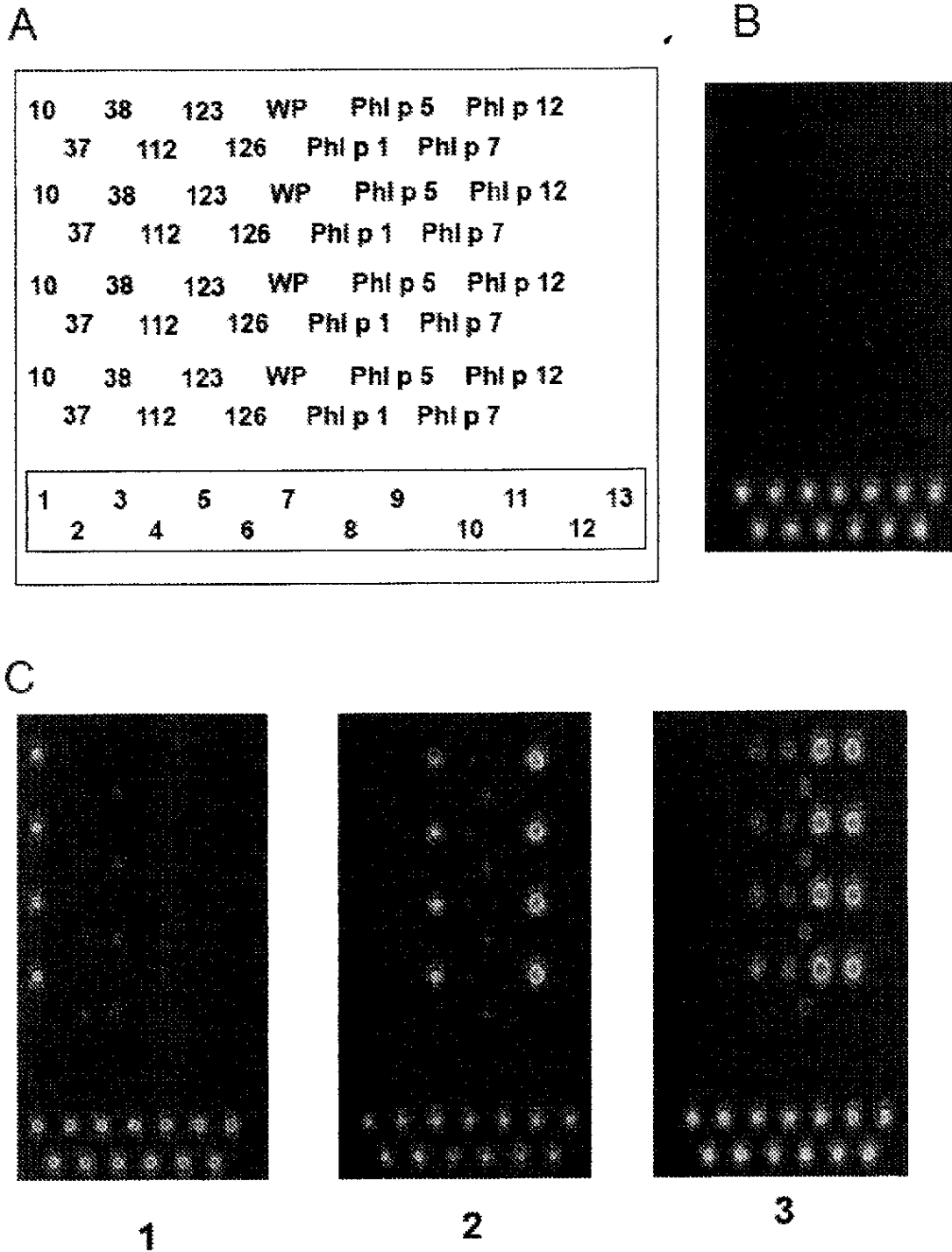


Figura 13A

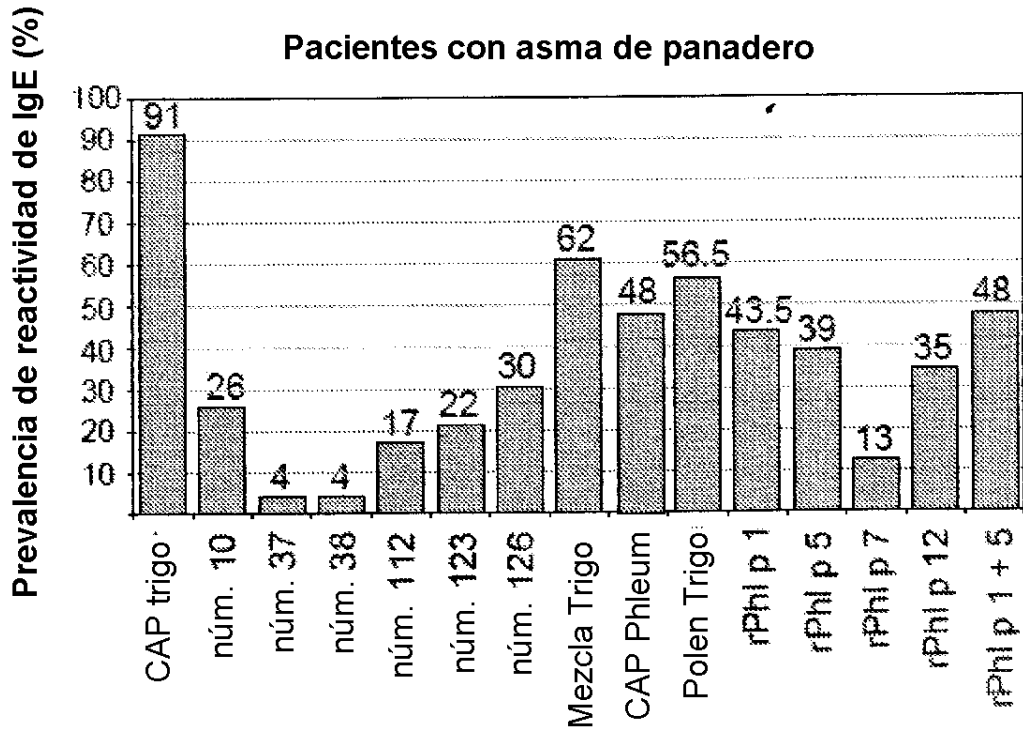


Figura 13B

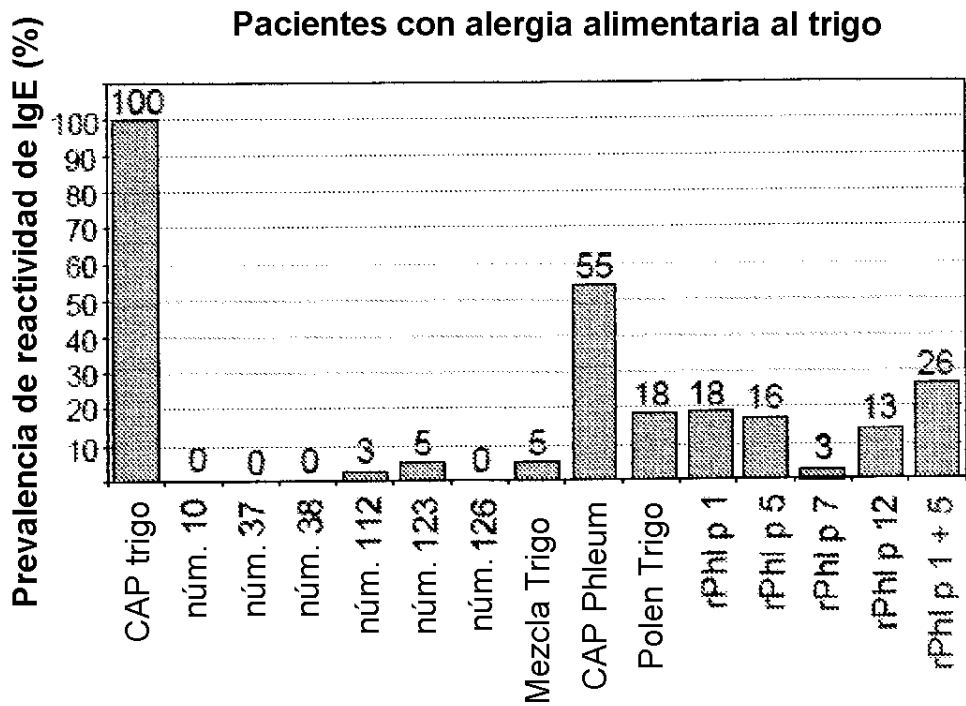


Figura 13C

Pacientes alérgicos a polen de gramíneas

