

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 389**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**C07K 14/415** (2006.01)

**A61K 39/35** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2018 E 18156555 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 3364193**

54 Título: **Ensayo mejorado para el diagnóstico de alergia al cacahuete**

30 Prioridad:

**15.02.2017 EP 17000245**

**26.06.2017 EP 17001081**

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

**21.10.2020**

73 Titular/es:

**EUROIMMUN MEDIZINISCHE  
LABORDIAGNOSTIKA AG (100.0%)**

**Seekamp 31  
23560 Lübeck, DE**

72 Inventor/es:

**SUER, WALTRAUD;  
ROHWER, STEFANIE;  
BRIX, BETTINA;  
WEIMANN, ALF;  
WEIMANN, YVONNE y  
KLINGE, MARCO**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 788 389 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

Ensayo mejorado para el diagnóstico de alergia al cacahuete

La presente invención se refiere a un vehículo útil para el diagnóstico que comprende un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8 en una muestra de un sujeto a un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8; un procedimiento que comprende la etapa de detectar en una muestra de un sujeto la presencia o ausencia de un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal del Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8.

Entre las alergias alimentarias, las relacionadas con el cacahuete (*Arachis hypogea*) han atraído la mayor atención de la investigación porque son relativamente comunes, típicamente permanentes, y con frecuencia severas. Los registros de mortalidad por anafilaxia alimentaria en los Estados Unidos implican al cacahuete como desencadenante en el 59 % de 63 muertes e indican que los adolescentes y los adultos jóvenes corren el mayor riesgo, con factores de riesgo adicionales como asma y retraso en la inyección de epinefrina durante la anafilaxia. El cacahuete es un alimento ubicuo y los pacientes afectados, que a menudo reaccionan a pequeñas dosis, se enfrentan a numerosos obstáculos para evitar la ingestión y experimentan un efecto negativo en la calidad de vida.

La alergia al cacahuete se sospecha principalmente en dos circunstancias: cuando un paciente muestra reacciones alérgicas severas o en el contexto de controlar afecciones alérgicas a otros alimentos o aeroalérgenos. Cuando la sensibilización al cacahuete se descubre mediante una prueba de punción cutánea (PPC) positiva o ensayos de IgE específicos para el cacahuete, cuya fiabilidad diagnóstica, en relación con la enfermedad clínica, es actualmente insuficiente, el paciente es derivado a un centro especializado que proporciona un diagnóstico basado en una exposición alimentaria de doble ciego controlada con placebo (DBPCFC, por sus siglas en inglés). Este procedimiento es el estándar de oro para el diagnóstico de alergia alimentaria, pero su aplicación requiere hospitalización y es costosa. Además, incluso bajo el control de médicos capacitados, la DBPCFC con cacahuete puede causar reacciones graves o incluso mortales.

Por lo tanto, existe un gran interés en mejorar los ensayos para el diagnóstico de alergias al cacahuete basadas en la detección de anticuerpos específicos en muestras de sujetos sospechosos de padecer alergia al cacahuete.

Los ensayos descritos en el estado de la técnica se basan en la detección de los principales alérgenos del cacahuete, como Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 y Ara h 6 utilizando alérgenos naturales o recombinantes (Flinterman, A. E., van Hoffen, E., den Hartog, Jager C. F., Koppelman, S., Pasmans, S. G., Hoekstra, M. O., Bruijnzeel-Koomen, C. A., Knulst, A. C., Knol, E. F. (2007): Children with peanut allergy recognize predominantly Ara h 2 and Ara h 6, which remains stable over time, *Clin Exp Allergy* 2007;37: 1221-1228; de Leon, M. P., Drew, A. C., Glaspole, I. N., Suphioglu, C., O'Hehir, R. E., Rolland, J. M. (2007): IgE cross-reactivity between the major peanut allergen Ara h 2 and tree nut allergens, *Mol Immunol* 2007; 44: 463-471).

Ara h 2 y Ara h 6 son proteínas de almacenamiento 2S del tipo conglutina y pertenecen a la superfamilia de prolamina. Los miembros de esta familia se caracterizan por la presencia de un patrón conservado de seis u ocho restos de cisteína ubicados dentro de una secuencia de aproximadamente 100 restos de aminoácidos que forman tres o cuatro enlaces disulfuro intramoleculares. Son estables al procesamiento térmico y a la proteólisis.

Ara h 2 es un alérgeno importante del cacahuete y se presenta en dos isoformas con diferentes pesos moleculares (PM), que se deben a una inserción de 12 aminoácidos con un PM de 1.414 Da. En su secuencia proteica primaria, Ara h 6 presenta una identidad con Ara h 2 del 53 % y, en comparación con Ara h 2, posee diez en lugar de ocho cisteínas pero ningún sitio de N-glucosilación. Como Ara h 2, Ara h 6 es resistente a la digestión y estable al calentamiento, especialmente en procedimientos de cocción. La estructura terciaria de Ara h 6 se dilucidó y se identificaron al menos cuatro estructuras  $\alpha$ -helicoidales y los parámetros de ubicación de los enlaces disulfuro. En experimentos de digestión en condiciones fisiológicas, Ara h 2 y Ara h 6 forman fragmentos estables incluso en condiciones reductoras. Esto apoya la idea de que las reactividades cruzadas entre Ara h 2 y Ara h 6 están mediadas por epítopos conformacionales reactivos a IgE (Schmidt, H., Krause, S., Gelhaus, C., Petersen, A., Janssen, O., y Becker, W. M. (2010): Detection and structural characterization of natural Ara h 7, the third peanut allergen of the 2S albumin family, *J Proteome Res* 2010; 9: 3701-709.).

Ara h 7 es otro alérgeno del cacahuete, y su isotipo Ara h 7.0101 fue identificado por primera vez por el sistema de presentación en fago y se clonó, pero inicialmente el homólogo natural no se encontró en el extracto de cacahuete, esta es una de las razones por las cuales su impacto en la alergia se describe en el estado de la técnica como bajo.

Schmidt y col. (2008, Detection and Structural Characterization of Natural Ara h 7, the Third Peanut Allergen of the 2S Albumin Family) descubrieron que existe otro isotipo (Ara h 7.0201), Ara h 7.0 es otro isotipo publicado en la base de datos UNIPROT además del 7.0101). Sin embargo, Schmidt y col. no mencionan aplicaciones de diagnóstico; el suyo es un estudio puramente proteómico.

Lo que es más, solo cinco de los seis sueros de pacientes utilizados por Schmidt y col., que habían sido preseleccionados por su reactividad a Ara h 7.0101, presentaron unión positiva a IgE con Ara h 7.0201, lo que sugiere que este último es de hecho menos (!) reactivo y, por lo tanto, tiene un valor diagnóstico aún menor que Ara h 7.0101. Por lo tanto, Ara h 7.0201 no se ha utilizado para el diagnóstico habitual hasta ahora hasta donde los inventores saben.

5 Además, varios estudios han evaluado una gama de parámetros inmunológicos utilizando proteínas de cacahuete purificadas (Ara h 1-3, Ara h 6) y descubrieron una correlación de la gravedad clínica con el reconocimiento de Ara h 2 y 6 a bajas concentraciones, y Ara h 1 y 3 a mayores concentraciones, lo que indica un evidente aumento de la potencia de Ara h 2 (Peeters, K. A., Koppelman, S. J., van Hoffen, E., van der Tas, C. W., den Hartog, Jager C. F., Penninks, A. H., Hefle, S. L., Bruijnzeel-Koomen, C. A., Knol, E. F., y Knulst, A. C. (2007): Does skin prick test reactivity to purified allergens correlate with clinical severity of peanut allergy? Clin Exp Allergy. Enero de 2007; 37(1):108-15.).

10 El documento WO2014182932 desvela un procedimiento para probar la especificidad de una reacción alérgica al penetrar en la piel de un individuo con una aguja de micromatriz.

15 La reactividad del anticuerpo IgE a los alérgenos de cacahuete Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6 y Ara h 7 también se ha investigado en pacientes alérgicos al cacahuete utilizando alérgenos recombinantes. Codreanu y col. evaluaron el rendimiento de las proteínas en el diagnóstico de alergia al cacahuete en 2 grandes cohortes de pacientes alérgicos al cacahuete. Las mediciones de IgE específica se realizaron utilizando una plataforma UniCAP con pruebas de ImmunoCAP. Documentaron que Ara h 2 es el alérgeno al que los pacientes alérgicos al cacahuete se sensibilizan con mayor frecuencia, con anticuerpos IgE detectables presentes en el 77-100 % de los casos, seguido de Ara h 6 (38-80 % de los casos). Por el contrario, sus datos sugieren que ningún paciente es monosensible a Ara h 7 (Codreanu, F., Collignon, O., Roitel, O., Thouvenot, B., Sauvage, C., Vilain, A. C., Cousin, M. O., Decoster, A., Renaudin, JM., Astier, C., Monnez, JM., Vallois, P., Morisset, M., Moneret-Vautrin, D. A., Brulliard, M., Ogier, V., Castelain, M. C., Kanny, G., Bihain, B. E., y Jacquenet, S. (2011): A novel immunoassay using recombinant allergens simplifies peanut allergy diagnosis, Int Arch Allergy Immunol, 2011;154(3):216-26.). Los hallazgos de que ningún paciente es monosensible a Ara h 7 han sido otra razón para no utilizar ningún isotipo de Ara h 7 para el diagnóstico habitual, ya que se creía que no aumenta la sensibilidad de las pruebas de diagnóstico para identificar pacientes alérgicos al cacahuete.

20 Actualmente, una serie de pacientes alérgicos al cacahuete no se pueden diagnosticar como alérgicos basándose en los resultados de las pruebas convencionales. No en lo más mínimo en vista de la gravedad de los síntomas asociados con la alergia al cacahuete, existe una demanda cada vez mayor de diagnósticos que tengan el mayor grado de sensibilidad.

30 El problema subyacente a la presente invención es superar cualquier deficiencia asociada con los ensayos de diagnóstico de vanguardia basada en la detección de anticuerpos contra los alérgenos de cacahuete.

Otro problema subyacente a la presente invención es proporcionar un nuevo antígeno, un nuevo ensayo, nuevos reactivos y un nuevo procedimiento que permita el diagnóstico de alergia en pacientes que no serían diagnosticados o que serían mal diagnosticados utilizando sistemas de ensayo convencionales.

Otro problema subyacente a la presente invención es proporcionar un antígeno mejorado para la detección de anticuerpos IgE en pacientes que padecen alergias a los frutos secos, preferentemente alergias al cacahuete.

Otro problema subyacente a la presente invención es proporcionar un procedimiento alternativo y reactivos alternativos para diagnosticar alergias a los frutos secos, preferentemente alergias al cacahuete.

40 Otro problema subyacente a la presente invención es proporcionar un procedimiento y reactivos que, cuando se usan en combinación con procedimientos y reactivos conocidos para el diagnóstico de alergias a los frutos secos, preferentemente alergias al cacahuete, aumenta la fiabilidad general del diagnóstico, en particular, la sensibilidad.

45 Otro problema subyacente a la presente invención es proporcionar un procedimiento y reactivos que, con mínima inversión en recursos, en particular, de tiempo y del número de antígenos utilizados, permita el diagnóstico de alergias a los frutos secos, preferentemente alergias al cacahuete, con la máxima fiabilidad global del diagnóstico, en particular, la sensibilidad.

El problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante el tema de las reivindicaciones independientes y dependientes adjuntas.

50 En un primer aspecto, el problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante un vehículo útil para el diagnóstico que comprende un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal del Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8, en el que

55 en otra realización preferida del primer aspecto, el vehículo comprende además un medio para capturar específicamente un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales del grupo que comprende Ara h 2, Ara h 6, Ara h 1, Ara h 3, Ara h 9, Ara h 8 y Ara h 5, más preferentemente del grupo que comprende Ara h 2, Ara h 6, Ara h 1, Ara

h 3, Ara h 9, más preferentemente, un anticuerpo contra Ara h 2 y/o un anticuerpo contra Ara h 6.

5 El vehículo útil para el diagnóstico se selecciona del grupo que comprende una perla, una tira de prueba, una placa de microtitulación, una micromatriz, un polímero sólido derivado de la celulosa, un análisis por transferencia del grupo que comprende el análisis por transferencia de línea y el análisis por transferencia de punto, una superficie de vidrio, un biochip y una membrana, y lo más preferentemente, una placa de microtitulación o un análisis por transferencia de línea.

10 En un segundo aspecto, el problema subyacente a la presente invención se resuelve con un kit que comprende un vehículo útil para el diagnóstico que comprende un medio para capturar específicamente un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8 en una muestra de un sujeto, preferentemente, que comprende además un medio para capturar específicamente un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales, más preferentemente del grupo Ara h 2, Ara h 6, Ara h 1, Ara h 3, Ara h 9, Ara h 8 y Ara h 5, más preferentemente del grupo que comprende Ara h 2, Ara h 6, Ara h 1, Ara h 3, Ara h 9, más preferentemente, un anticuerpo contra Ara h 2 y/o un anticuerpo contra Ara h 6, opcionalmente, así como un medio para detectar específicamente un anticuerpo capturado.

15 En otra realización preferida del segundo aspecto, el vehículo útil para el diagnóstico comprende además un medio para capturar específicamente un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales del grupo que comprende Ara h 2, Ara h 6, Ara h 1, Ara h 3, Ara h 9, Ara h 8 y Ara h 5, en el que los medios para capturar específicamente un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8 y los medios para capturar específicamente un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales están en vehículos separados.

20 En una realización preferida del segundo aspecto, el vehículo útil para el diagnóstico comprende además un medio para capturar específicamente un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales del grupo que comprende Ara h 2, Ara h 6, Ara h 1, Ara h 3, Ara h 9, Ara h 8 y Ara h 5, en el que los medios para capturar específicamente un anticuerpo contra Ara h 7 isotipo 7.0201, preferentemente, la SEQ ID NO 6, más preferentemente a una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, lo más preferentemente para la SEQ ID NO 8, y los medios para capturar específicamente un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales están en un vehículo, preferentemente, unidos covalentemente a un vehículo.

30 En un tercer aspecto, el problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante un procedimiento, preferentemente para diagnosticar o ayudar al diagnóstico de una alergia a los frutos secos, más preferentemente una alergia al cacahuete, que comprende la etapa de detectar, en una muestra de un sujeto, la presencia de un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8.

35 En una realización preferida del tercer aspecto, el procedimiento comprende además detectar, en una muestra de un sujeto, la presencia de un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales, preferentemente seleccionados del grupo que comprende Ara h 2, Ara h 6, Ara h 1, Ara h 3, Ara h 9, Ara h 8 y Ara h 5, más preferentemente del grupo que comprende Ara h 2, Ara h 6, Ara h 1, Ara h 3 y Ara h 9, más preferentemente, Ara h 2 y/o Ara h 6.

40 En otra realización preferida del tercer aspecto, la presencia de un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8 y la presencia de un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales, preferentemente Ara h 2 y/o Ara h 6, se detecta de manera simultánea.

45 En otra realización preferida del tercer aspecto, la presencia de un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8 y la presencia de un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales, preferentemente Ara h 6 y/o Ara h 2, se detecta en reacciones de unión espacialmente separadas.

50 En otra realización preferida del tercer aspecto, la presencia de un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8, y la presencia de un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales, preferentemente Ara h 6 y/o Ara h 2, se detecta en una reacción one-pot.

55 En otra realización preferida del tercer aspecto, el procedimiento comprende la etapa de poner en contacto el vehículo útil para el diagnóstico de acuerdo con la presente invención con una muestra del sujeto.

En otra realización preferida de cualquier aspecto, el sujeto padece o se sospecha que padece una alergia, preferentemente una alergia a un fruto seco, más preferentemente, a un cacahuete.

En otra realización preferida de cualquier aspecto, el anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo que comprende la SEQ ID NO 8 es un anticuerpo monoespecífico para Ara h 7 isotipo 7.0201, más preferentemente, para una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, más preferentemente

para la SEQ ID NO 8.

En una realización preferida, el polipéptido en el vehículo o usado de acuerdo con la presente invención que es un polipéptido que comprende la SEQ ID NO 8, más preferentemente una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 6, la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, más preferentemente, la SEQ ID NO 6, más preferentemente, Ara h 7 isotipo 7.0201, o una variante del mismo que está inmovilizada, purificada, y/o una proteína de fusión, preferentemente purificada, más preferentemente inmovilizada y purificada, más preferentemente purificada y es recombinante e inmovilizada.

En un 5° aspecto, el problema se resuelve mediante el uso de un polipéptido que comprende la SEQ ID NO 8, más preferentemente una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 6, la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, más preferentemente, la SEQ ID NO 6, más preferentemente Ara h 7 isotipo 7.0201, o una variante del mismo, el vehículo o el kit de acuerdo con la presente invención para el diagnóstico de alergia al cacahuete, en el que preferentemente se aumenta la sensibilidad.

En un 6° aspecto, el problema se resuelve mediante el uso de un polipéptido que comprende la SEQ ID NO 8, más preferentemente una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 6, la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, más preferentemente, la SEQ ID NO 6, más preferentemente Ara h 7 isotipo 7.0201, o una variante del mismo según la presente invención para la fabricación de un kit para el diagnóstico de alergia al cacahuete, en el que preferentemente se aumenta la sensibilidad del diagnóstico.

Preferentemente, el polipéptido que comprende la SEQ ID NO 8, más preferentemente una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 6, la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, más preferentemente, la SEQ ID NO 6, lo más preferentemente, Ara h 7 isotipo 7.0201 o una variante del mismo es una composición que comprende dicho polipéptido y Ara h 2 y/o Ara h 6 o una variante de los mismos.

En un 7° aspecto, el problema se resuelve con un anticuerpo, preferentemente, un anticuerpo de clase IgE que se une específicamente a la SEQ ID NO 6, más preferentemente, una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, más preferentemente a la SEQ ID NO 8, que es preferentemente un anticuerpo aislado. El anticuerpo se puede aislar mediante cromatografía de afinidad usando protocolos estándar de una muestra de paciente usando el antígeno como ligando de afinidad.

En un 8° aspecto, el problema se resuelve mediante el uso del anticuerpo según la presente invención para el diagnóstico de alergia al cacahuete o para la fabricación de un kit para el diagnóstico de alergia al cacahuete.

La presente invención se centra en la detección de un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8, más específicamente, su extremo C-terminal sorprendentemente inmunorreactivo, en particular, el epítipo que comprende la SEQ ID NO 8, como parte de un procedimiento de diagnóstico practicado en una muestra de un paciente sospechoso de tener alergia a un fruto seco, más sorprendentemente, algunos pacientes alérgicos solo tienen anticuerpos que son monoespecíficos para Ara h 7 isotipo 7.0201 que comprende la SEQ ID NO 8 y no se unen a los otros isotipos de Ara h 7, más específicamente 7.0101 y Ara h 7.0, y mucho menos Ara h 2 o Ara h 6.

Esto está en marcado contraste con los estudios publicados anteriormente, por ejemplo el de Codreanu y col., que sugiere que la detección de un anticuerpo para cualquier (!) isotipo de Ara h 7 tiene un valor de diagnóstico limitado en comparación con o, en particular, más allá de los datos resultantes de la detección de Ara h 2 y/o Ara h 6. En particular, estos estudios sugieren que no hay pacientes que tengan anticuerpos monoespecíficos para ningún isotipo de Ara h 7.

La invención se refiere a un vehículo útil para el diagnóstico, que es preferentemente un vehículo sólido para poner en contacto un medio para capturar específicamente un anticuerpo, lo que significa que está asociado con dicho operador, con una muestra de fluido corporal de un sujeto, preferentemente un sujeto mamífero, más preferentemente, un sujeto humano. En una realización preferida, el vehículo sólido es un dispositivo de diagnóstico, más preferentemente, seleccionado del grupo que comprende una perla, una tira de prueba, una placa de microtitulación, un análisis por transferencia, una superficie de vidrio, un biochip y una membrana, más preferentemente, del grupo que comprende un análisis por transferencia, una tira de prueba y una membrana. En una realización más preferida, el vehículo útil para el diagnóstico es una placa de microtitulación o un análisis por transferencia de línea (Raoult, D., y Dasch, G. A. (1989), The line blot: an immunoassay for monoclonal and other antibodies. Its application to the serotyping of gram-negative bacteria. J. Immunol. Methods, 125 (1-2), 57-65; documento WO2013041540). En una realización preferida, el término "análisis por transferencia de línea", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una tira de prueba, más preferentemente, basado en membrana, que se ha recubierto con uno o más medios para capturar un anticuerpo, preferentemente un polipéptido cada uno. Si se usan dos o más medios, preferentemente están separados espacialmente en el vehículo. Preferentemente, la anchura de las bandas es de al menos el 30, más preferentemente, el 40, 50, 60, 70 o el 80 %. La anchura de la tira de prueba. La tira de prueba puede comprender una o más bandas de control para confirmar que se ha puesto en contacto con la muestra lo suficientemente larga y en condiciones adecuadas, en particular, en presencia de suero humano, conjugado de anticuerpos, o ambos. Una multitud de análisis por transferencia de línea están disponibles comercialmente, por ejemplo de EUROIMMUN,

Lubeck, Alemania.

La muestra de un sujeto utilizada para poner en práctica la presente invención comprende anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas. Típicamente, la muestra es un fluido corporal que comprende un conjunto representativo de la totalidad de las inmunoglobulinas del sujeto. Sin embargo, la muestra, una vez provista, puede estar sujeta a un procesamiento adicional que puede incluir fraccionamiento, centrifugación, enriquecimiento o aislamiento de la totalidad de las inmunoglobulinas o cualquier clase de inmunoglobulina del sujeto, preferentemente IgE, lo que puede afectar la distribución relativa de las inmunoglobulinas de las diversas clases. La muestra se puede seleccionar del grupo que comprende sangre completa, suero, líquido cefalorraquídeo y saliva y es preferentemente suero. En una realización más preferida, la muestra comprende anticuerpos de clase IgE. En una realización más preferida, la muestra comprende un conjunto representativo de los anticuerpos del sujeto de las clases IgA, IgG e IgE, preferentemente IgG e IgE, más preferentemente IgG1, IgG4 e IgE, en el que, lo más preferentemente, la proporción del número de anticuerpos frente a diferentes antígenos es esencialmente inalterada en comparación con la proporción en la muestra tal como se obtiene del sujeto.

El vehículo útil para el diagnóstico comprende un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8, preferentemente a la SEQ ID NO 8, opcionalmente en combinación con uno o más antígenos adicionales tales como Ara h 2 y/o Ara h 6. En una realización preferida, los términos "Ara h 7 isotipo 7.0201", "Ara h 2", "Ara h 6", "Ara h 1", "Ara h 3", "Ara h 5", "Ara h 8" y "Ara h 9", tal y como se usa en el presente documento, se refieren a los polipéptidos representados por los códigos de base de datos B4XID4 (Ara h 7 isotipo 7.0201, secuencia expresada sin péptido señal: SEQ ID NO 2) y, Q6PSU2 (Ara h 2, secuencia expresada sin péptido señal: SEQ ID NO 4), Q647G9 (Ara h 6, secuencia expresada sin péptido señal: SEQ ID NO 5), P43238 (Ara h 1), O82580 (Ara h 3), Q9SQI9 (Ara h 5), BOYIU5 o Q6VT83 (dos isotipos de Ara h 8), y B6CG41 o B6CEX8 (dos isotipos de Ara h 9) y sus variantes, respectivamente. Preferentemente el término "Ara h 7", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a la totalidad de los tres isotipos de Ara h 7, el término "Ara h 7.0101" se refiere al isotipo que tiene la secuencia de la SEQ ID NO 1, y el término "Ara h 7.0" se refiere al isotipo que tiene la secuencia de la SEQ ID NO 3. Cualquier código de base de datos mencionado en la presente solicitud se refiere a la secuencia de polipéptidos disponible a través de las bases de datos del NCBI en línea en la fecha de prioridad de la presente solicitud. Preferentemente, los anticuerpos se detectan en la muestra que se une a Ara h 7.0201 de acuerdo con la presente invención, pero no a ninguno de los otros isotipos de Ara h 7, más específicamente, Ara h 7.0101 y Ara h 7.0, y los medios para capturar específicamente un anticuerpo para Ara h 7 isotipo 7.0201 están configurados para este fin y es preferentemente un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que comprende la SEQ ID NO 8 o una variante de la misma, preferentemente, una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 6, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, más preferentemente, la SEQ ID NO 6, lo más preferentemente, Ara h 7 isotipo 7.0201 o una variante del mismo.

El anticuerpo contra Ara h 7 isotipo 7.0201 es un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8. Más preferentemente, no se une a ningún epítipo compartido por los tres isotipos de Ara h 7.

En una realización preferida, la expresión "un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra [antígeno] X y un anticuerpo contra [antígeno] Y", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a la suma de un medio que captura específicamente un anticuerpo contra [antígeno] X, pero no uno para [antígeno] Y, y un medio que captura específicamente un anticuerpo contra [antígeno] Y, pero no uno para [antígeno] X.

Por ejemplo, X podría ser Ara h 2 e Y podría ser Ara h 6. En este caso, un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra Ara h 2 y Ara h 6 comprendería un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra Ara h 2 y, además, un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra Ara h 6. Por ejemplo, un análisis por transferencia de línea recubierto con Ara h 2 y Ara h 6, espacialmente separados entre sí, es un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra Ara h 2 y Ara h 6.

De acuerdo con la presente invención, el vehículo comprende uno o más medios para capturar específicamente un anticuerpo, preferentemente uno o más, más preferentemente dos o más, más preferentemente tres o más, más preferentemente cuatro o más de tales medios, cada uno de ellos capaz de capturar específicamente un anticuerpo diferente. En una realización más preferida, el vehículo comprende un medio para detectar específicamente un anticuerpo contra Ara h 2, para un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8 y Ara h 6. Dicho medio está preferentemente inmovilizado en dicho vehículo. En una realización preferida, el medio para capturar específicamente un anticuerpo es un polipéptido que comprende o que consiste en un antígeno al que se une el anticuerpo a capturar o detectar, o una variante del mismo, tal como del grupo que comprende Ara h 2, para un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8 y Ara h 6, preferentemente a un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8 o una variante del mismo. Preferentemente, dicho polipéptido, cuando se usa para la detección de un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo que comprende la SEQ ID NO 8 comprende una secuencia del grupo que comprende la SEQ

ID NO 8, más preferentemente, una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, más preferentemente, la SEQ ID NO 6, lo más preferentemente Ara h 7 isotipo 7.0201, o una variante del mismo. El polipéptido puede ser un péptido lineal o un polipéptido plegado, este último preferentemente una variante que adopta esencialmente el mismo pliegue que Ara h 7 isotipo 7.0201 tal como se puede determinar por espectroscopía de DC. En una realización preferida, el péptido o polipéptido comprende un epítipo para el anticuerpo que se va a capturar o detectar de al menos 7, preferentemente 10, más preferentemente 15 aminoácidos. Dicho antígeno, junto con el vehículo insoluble al que está unido, se puede separar de una mezcla de reacción, en la que se pone en contacto con una muestra, de manera directa, por ejemplo por filtración, centrifugación o decantación. Dicho antígeno se puede inmovilizar de manera reversible o irreversible. Por ejemplo, la inmovilización es reversible si la molécula interactúa con el vehículo a través de interacciones iónicas que se pueden enmascarar mediante la adición de una alta concentración de sal o si la molécula se une mediante un enlace covalente escindible. Por el contrario, la inmovilización es irreversible si la molécula está unida al vehículo a través de un enlace covalente que no se puede escindir en solución acuosa. El polipéptido se puede inmovilizar indirectamente, por ejemplo inmovilizando un anticuerpo u otra entidad que tenga afinidad con el polipéptido, seguido de la adición del polipéptido y la formación de un complejo polipéptido-anticuerpo.

En otra realización preferida, el vehículo útil para el diagnóstico comprende un medio para capturar cualquier anticuerpo de la clase de anticuerpo que se va a detectar, preferentemente un medio para capturar toda la clase IgA, IgG o IgE, preferentemente, anticuerpos IgE en la muestra.

El ensayo se lleva a cabo de tal manera que la muestra se pone en contacto con el vehículo en condiciones que permitan la unión al vehículo de todos los anticuerpos en la muestra de la clase de anticuerpos que comprende el anticuerpo que se va a detectar, más específicamente la clase IgA, IgG o IgE, preferentemente, los anticuerpos IgE, seguido de lavado, seguido de la detección específica del anticuerpo que se va a detectar. Para este fin, el vehículo se puede poner en contacto con un antígeno marcado, tal como un polipéptido que comprende Ara h 7 isotipo 7.0201, preferentemente, la SEQ ID NO 6, más preferentemente, para una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, más preferentemente, a la SEQ ID NO 8 o una variante de la misma.

El antígeno puede comprender un marcador detectable, preferentemente, del grupo que comprende un marcador enzimáticamente activo, fluorescente, radiactivo o quimioluminiscente. Como alternativa, el antígeno se puede disociar del anticuerpo después de la unión y el lavado específicos y luego se puede detectar su presencia o ausencia.

Como alternativa, el vehículo, después de la puesta en contacto con la muestra y la unión de cualquier anticuerpo que se va a detectar, se puede poner en contacto con el antígeno no marcado, de tal manera que se forme un complejo que comprende el anticuerpo capturado que se va a detectar y el antígeno no marcado. El capturado se puede entonces detectar indirectamente mediante la adición de un anticuerpo marcado que se une al antígeno no marcado que ya está unido al anticuerpo que se va a detectar.

En una realización preferida, el vehículo se selecciona del grupo que comprende una perla, una tira de prueba, una placa de microtitulación, una micromatriz, un polímero sólido derivado de la celulosa, un análisis por transferencia, preferentemente del grupo que comprende análisis por transferencia de Western, análisis por transferencia de línea y análisis por transferencia de puntos, una superficie de vidrio, un portaobjetos, un biochip y una membrana, y lo más preferentemente, una placa de microtitulación o un análisis por transferencia de línea. En otra realización preferida, el vehículo se selecciona del grupo que comprende una perla, una tira de prueba, una placa de microtitulación, una micromatriz, un polímero sólido derivado de la celulosa, un análisis por transferencia, seleccionado del grupo que comprende análisis por transferencia de línea y análisis por transferencia de puntos, una superficie de vidrio, un portaobjetos y un biochip, y lo más preferentemente es una placa de microtitulación o un análisis por transferencia de línea.

Si el vehículo útil para el diagnóstico es una perla, se puede usar una mezcla de perlas, cada una con un tipo de medio para capturar específicamente un anticuerpo. La mezcla comprende al menos una perla que lleva un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8. Además, la mezcla de perlas puede comprender al menos una perla adicional, llevando cada perla un medio para capturar específicamente un anticuerpo para uno o más del grupo que comprende Ara h 2, Ara h 6, Ara h 1, Ara h 3, Ara h 9, Ara h 8 y Ara h 5 y una variante de los mismos, más preferentemente del grupo que comprende Ara h 2, Ara h 6, Ara h 1, Ara h 3, Ara h 9 y una variante de los mismos, más preferentemente, Ara h 2 y/o Ara h 6.

Si el vehículo útil para el diagnóstico es una perla, la perla puede comprender, como alternativa, además de un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8, al menos un medio adicional más para capturar específicamente un anticuerpo, que puede ser un anticuerpo para uno o más del grupo que comprende Ara h 2, Ara h 6, Ara h 1, Ara h 3, Ara h 9, Ara h 8 y Ara h 5 y una variante de los mismos, más preferentemente del grupo que comprende Ara h 2, Ara h 6, Ara h 1, Ara h 3, Ara h 9 y una variante de los mismos, más preferentemente, Ara h 2 y/o Ara h 6. Lo más preferentemente, dicha perla comprende un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo

C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8, preferentemente a la SEQ ID NO 8, un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra Ara h 2 y un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra Ara h 6.

5 Sin embargo, las enseñanzas de la presente invención se pueden llevar a cabo no solo usando polipéptidos que tienen las secuencias exactas mencionadas explícitamente en la presente solicitud, por ejemplo por función, nombre, número de secuencia o de referencia, o implícitamente, sino también usando variantes de tales polipéptidos.

10 En una realización preferida, el término "variante", tal y como se usa en el presente documento, se puede referir al menos a un fragmento de la secuencia de longitud completa mencionada, más específicamente, a uno o más aminoácidos o secuencia de ácido nucleico que están, en relación con la secuencia de longitud completa, truncados en uno o ambos extremos por uno o más aminoácidos. Dicho fragmento comprende o codifica un péptido que tiene al menos 10, 15, 25, 50, 75, 100, 150 o 200 aminoácidos sucesivos de la secuencia original o una variante de la misma. La longitud total de la variante puede ser de 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos.

15 En otra realización preferida, el término "variante" se refiere no solo a al menos un fragmento, pero también un polipéptido o un fragmento del mismo que comprende secuencias de aminoácidos, preferentemente un fragmento que comprende al menos 25, más preferentemente 50, más preferentemente 200 aminoácidos sucesivos, que son al menos el 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o el 99 % idénticos a la secuencia de aminoácidos de referencia mencionada o al fragmento de la misma, en la que los aminoácidos distintos de los esenciales para la actividad biológica, por ejemplo, la capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo de interés, o el pliegue o estructura del polipéptido se delecionan o sustituyen y/o uno o más de estos aminoácidos esenciales se sustituyen de manera conservativa y/o se añaden o delecionan aminoácidos de tal manera que la actividad biológica del polipéptido se conserva al menos parcialmente. El estado de la técnica comprende varios procedimientos que se pueden usar para alinear dos secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos dadas y para calcular el grado de identidad, véase, por ejemplo Arthur Lesk (2008), Introduction to bioinformatics, Oxford University Press, 2008, 3ª edición. En una realización preferida, el programa informático ClustalW (Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. (2007): Clustal W and Clustal X versión 2.0. Bioinformatics, 23, 2947-2948) se utiliza aplicando la configuración predeterminada.

20 En una realización preferida, las variantes pueden, además, comprender modificaciones químicas, por ejemplo marcadores isotópicos o modificaciones covalentes como la glicosilación, fosforilación, acetilación, descarboxilación, citrulinación, hidroxilación y similares. El experto en la materia está familiarizado con los procedimientos para la modificación de polipéptidos. Además, las variantes también se pueden generar mediante fusión con otros polipéptidos conocidos o variantes de los mismos.

25 La variante del polipéptido tiene actividad biológica. En una realización preferida, dicha actividad biológica es la capacidad de unirse al anticuerpo respectivo. Por ejemplo, una variante de la SEQ ID NO 8 tiene la capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo, preferentemente anticuerpos de clase IgA, IgE o IgG, más preferentemente, anticuerpos de clase IgE, IgG1 o IgG4, a Ara h 7 isotipo 7.0201 en una muestra obtenida de un sujeto alérgico al cacahuete, ya que comprende epítopos a los que se une dicho anticuerpo. Preferentemente, comprende un epítipo reconocido por un anticuerpo en una muestra de un paciente alérgico, cuyo anticuerpo se une a un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8, y más preferentemente no se une a los isotipos 7.0101 o 7.0). El experto en la materia es capaz de diseñar variantes con actividad biológica partiendo de la secuencia original de Ara h 7 isotipo 7.0201, teniendo en cuenta la importancia de la SEQ ID NO 8, introducir modificaciones como mutaciones puntuales, truncamientos y similares y posteriormente confirmar que la variante todavía tiene actividad biológica probando si dicha variante se une a un anticuerpo IgE a un epítipo del extremo C-terminal del Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8 en una muestra obtenida de un sujeto alérgico al cacahuete, preferentemente usando un ELISA tal como se describe en detalle en el Ejemplo 1.

30 Si se usa un polipéptido como medio para capturar específicamente un anticuerpo, por ejemplo a un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8, dicho polipéptido, cuando se usa para llevar a cabo las enseñanzas de la presente invención, se puede proporcionar en cualquier forma y en cualquier grado de purificación, de tejidos, frutos o células que comprenden dicho polipéptido en una forma endógena, más preferentemente células que sobreexpresan el polipéptido, lisados crudos o enriquecidos de tales células, a polipéptido purificado y/o aislado que puede ser esencialmente puro. En una realización preferida, el polipéptido es un polipéptido natural, en el que el término "polipéptido natural", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido plegado, más preferentemente, a un polipéptido plegado purificado de tejidos o células, más preferentemente, de células o tejidos de mamíferos, opcionalmente, de tejidos o células no recombinantes. Si se usa un polipéptido natural, preferentemente está enriquecido en comparación con su estado natural.

35 De acuerdo con la presente invención, el polipéptido puede ser una proteína recombinante, en la que el término "recombinante", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido producido utilizando enfoques

de ingeniería genética en cualquier etapa del procedimiento de producción, por ejemplo, fusionando un ácido nucleico que codifica el polipéptido a un promotor fuerte para la sobreexpresión en células o tejidos o diseñando la secuencia del polipéptido en sí. El experto en la materia está familiarizado con los procedimientos para diseñar ácidos nucleicos y polipéptidos codificados (por ejemplo, descrito en Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989), Molecular Cloning, CSH o en Brown T. A. (1986), Gene Cloning - an introduction, Chapman & Hall) y para producir y purificar polipéptidos naturales o recombinantes (por ejemplo, Manuales "Strategies for Protein Purification", "Antibody Purification", publicado por GE Healthcare Life Sciences, y en Burgess, R. R., Deutscher, M. P. (2009): Guide to Protein Purification). En otra realización preferida, el polipéptido es un polipéptido aislado, en el que el término "aislado" significa que el polipéptido se ha enriquecido en comparación con su estado tras la producción usando un enfoque biotecnológico o sintético y es preferentemente puro, es decir al menos 60, 70, 80, 90, 95 o 99 por ciento del polipéptido en la muestra respectiva consiste en dicho polipéptido según lo juzgado por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS seguido de tinción con azul de Coomassie e inspección visual. Preferentemente, cualquier polipéptido en un vehículo usado como un medio para capturar un anticuerpo es puro.

Además, en el presente documento se describe un procedimiento, preferentemente para proporcionar un anticuerpo contra Ara h 7 isotipo 7.0201, se proporciona de acuerdo con la presente invención que comprende las etapas: a) proporcionar una muestra que comprende un anticuerpo contra Ara h 7 isotipo 7.0201, preferentemente para una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 6, más preferentemente, una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, más preferentemente, la SEQ ID NO 8, b) poner en contacto la muestra con un medio para capturar específicamente el anticuerpo contra Ara h 7 isotipo 7.0201, preferentemente para una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 6, más preferentemente, una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, lo más preferentemente, la SEQ ID NO 8, en condiciones compatibles con la formación de un complejo que comprende el anticuerpo y los medios, y c) aislar este complejo, opcionalmente seguido de la liberación del complejo y/o la detección del anticuerpo.

El sujeto según la presente invención que proporciona la muestra es un organismo que produce anticuerpos, preferentemente IgA, IgE o IgG, más preferentemente, de la clase IgE, IgG1 o IgG4 o anticuerpos equivalentes relacionados con la alergia, más preferentemente, es un mamífero, más preferentemente, es un ser humano.

Dentro del ámbito de la presente invención hay un vehículo útil para el diagnóstico que comprende un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra un antígeno. En una realización preferida, la expresión "capturar específicamente un anticuerpo", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de unirse específicamente al anticuerpo de interés para el efecto de que está unido y eliminado de la muestra, mientras que otros anticuerpos, preferentemente de la misma clase, esencialmente no están unidos y permanecen en la muestra.

El vehículo útil para el diagnóstico de acuerdo con la invención sirve como andamiaje para los uno o más medios para capturar específicamente un anticuerpo, preferentemente, un anticuerpo relevante para el diagnóstico. Dicho soporte es adecuado para llevar a cabo un procedimiento de diagnóstico. Al usar un operador en lugar de medios solubles libres para capturar específicamente un anticuerpo, es más sencillo aislar y separar de la muestra un complejo que comprende los medios y el anticuerpo y lavar dicho complejo, por ejemplo, con el fin de eliminar cualquier molécula que se una de manera no específica a los medios, al complejo o al vehículo. En una realización preferida, el vehículo útil para el diagnóstico es un dispositivo de diagnóstico, preferentemente seleccionado del grupo que comprende una perla, una tira de prueba, una placa de microtitulación, un análisis por transferencia y una membrana, y es preferentemente una placa de microtitulación o un análisis por transferencia de línea.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un medio para detectar específicamente un anticuerpo capturado, opcionalmente como parte de un kit. En una realización preferida, la expresión "detectar específicamente un anticuerpo capturado", tal y como se usa en el presente documento, significa que el anticuerpo que se une específicamente a los medios para capturar específicamente el anticuerpo, preferentemente, Ara h 7 isotipo 7.0201, tras la captura, se detecta en lugar de cualquier otro anticuerpo presente en la muestra. En una realización preferida, la expresión "que se une específicamente", tal y como se usa en el presente documento, significa que la unión es más fuerte que una reacción de unión caracterizada por una constante de disociación de  $1 \times 10^{-5}$  M, más preferentemente, de  $1 \times 10^{-7}$  M, más preferentemente, de  $1 \times 10^{-8}$  M, más preferentemente, de  $1 \times 10^{-9}$  M, más preferentemente, de  $1 \times 10^{-10}$  M, más preferentemente, de  $1 \times 10^{-11}$  M, más preferentemente, de  $1 \times 10^{-12}$  M, tal como se determina por resonancia de plasmón superficial utilizando un equipo Biacore a 25 °C en tampón PBS a pH 7.

En una realización preferida, los medios para capturar específicamente un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8 y los medios para capturar específicamente un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales están en vehículos separados. Esto significa que los medios no están unidos a un solo vehículo, sino que a uno o más vehículos que están separados y/o que se pueden separar sin dañarlos. Por ejemplo, los medios para capturar específicamente un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo que comprende la SEQ ID NO 8 puede estar unido a una primera tira de prueba, y los medios para capturar específicamente un anticuerpo contra Ara h 2 están unidos a otra tira de prueba que está separada de la primera tira de prueba.

En otra realización preferida, los medios para capturar específicamente un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8 y los medios para capturar específicamente un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales están en uno, preferentemente, unidos covalentemente a un vehículo. Esto significa que los medios están unidos a un vehículo que no se puede desensamblar, sin dañar el vehículo, de tal manera que los medios estén en vehículos separados. Por ejemplo, los medios pueden estar todos recubiertos en una tira de prueba, en particular, en forma de un análisis por transferencia de línea.

Las enseñanzas de la invención proporcionan un kit, preferentemente para diagnosticar una alergia, más preferentemente para diagnosticar una alergia al cacahuete. Dicho kit es un recipiente que comprende reactivos específicos requeridos para poner en práctica el procedimiento de la invención, en particular el vehículo útil para el diagnóstico de acuerdo con la presente invención, opcionalmente, además de una o más soluciones necesarias para poner en práctica el procedimiento de la invención, preferentemente seleccionado de o todos del grupo que comprende tampón de dilución de la muestra, tampón de lavado y tampón que comprende un medio para detectar cualquier anticuerpo capturado específicamente, tal como un anticuerpo secundario y opcionalmente un medio para detectar éste último. Además, puede comprender instrucciones que detallan cómo usar el kit y el vehículo útil para el diagnóstico de la invención para poner en contacto el polipéptido de la invención con una muestra de fluido corporal de un sujeto, preferentemente un sujeto humano, por ejemplo un análisis por transferencia de línea, en el que los medios de la invención para capturar específicamente un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8, se inmoviliza en el análisis por transferencia de línea. Además, el kit puede comprender un control positivo, por ejemplo, un anticuerpo recombinante que se sabe que se une a un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8 y un control negativo, por ejemplo, una proteína que no tiene afinidad detectable para Ara h 7 isotipo 7.0201 tal como la albúmina de suero bovino. Por último, dicho kit puede comprender una solución estándar que comprende un anticuerpo que se une a un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8 para preparar una curva de calibración. En una realización preferida, el kit comprende un dispositivo, preferentemente un dispositivo basado en análisis por transferencia, tal como un análisis por transferencia de línea recubierto con un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8 y, opcionalmente, un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales tales como Ara h 2 y/o Ara h 6.

De acuerdo con la invención, se requiere un medio para detectar los uno o más anticuerpos capturados y puede incluirse en un kit. El experto en la materia conoce muchos procedimientos que se pueden usar, que también se describen en el estado de la técnica, por ejemplo en Zane, H. D. (2001), *Immunology - Theoretical & Practical Concepts in Laboratory Medicine*, W. B. Saunders Company, en particular en el Capítulo 14. En una realización preferida, se usa un anticuerpo secundario que se une a la región constante de uno o más anticuerpos capturados, que es el anticuerpo primario correspondiente, cuyo anticuerpo secundario puede estar asociado con un marcador que es fácil de detectar, por ejemplo, un marcador fluorescente, radiactivo o enzimáticamente activo, el último de los cuales puede catalizar una reacción quimioluminiscente o la generación de una molécula detectable mediante colorimetría o espectroscopía u otro procedimiento analítico. En una realización más preferida, el anticuerpo secundario está asociado con un marcador seleccionado del grupo que comprende un marcador fluorescente, radioactivo y quimioluminiscente.

Como alternativa, se puede usar un ensayo funcional biológico como medio para detectar los uno o más anticuerpos capturados con la condición de que sea un anticuerpo de clase IgE, preferentemente, un ensayo basado en la activación de basófilos por el anticuerpo IgE. Dichos ensayos se han descrito en el estado de la técnica, por ejemplo Hausmann, O. V., Gentinetta, T., Bridts, C. H. y Ebo, E. G. (2009): *The Basophil Activation Test in Immediate-Type Drug Allergy*, *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* 29, 555-566.

En una realización preferida, el término "diagnóstico", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de procedimiento destinado a obtener información instrumental en la evaluación de si un paciente sufre o es probable o más probable que el sujeto promedio o comparativo, este último preferentemente tiene síntomas similares, de padecer cierta enfermedad o trastorno en el pasado, en el momento del diagnóstico o en el futuro, para averiguar cómo progresa la enfermedad o si es probable que progrese en el futuro o para evaluar la capacidad de respuesta de un paciente con respecto a un determinado tratamiento, por ejemplo, la administración de fármacos adecuados, tales como fármacos para la desensibilización de pacientes alérgicos. En otras palabras, el término "diagnóstico" comprende no solo el diagnóstico, sino también el pronóstico y/o el control del trascurso de una enfermedad o trastorno. En una realización más preferida, el término "diagnóstico", tal y como se usa en el presente documento, implica que se desconoce si la muestra sometida se analiza de acuerdo con la presente invención, tiene alergia a los frutos secos, preferentemente al cacahuete, tal como lo demuestra la presencia de anticuerpos contra un alérgeno específico de cacahuete en su sangre, por ejemplo, uno seleccionado del grupo que comprende Ara h 2, Ara h 6 y Ara h 7, preferentemente Ara h 7.

Por lo tanto, el término "diagnóstico" preferentemente no implica que los procedimientos o agentes de diagnóstico de acuerdo con la presente invención sean definitivos y suficientes para finalizar el diagnóstico basándose en una sola

prueba, y mucho menos un parámetro, pero se puede referir a una contribución a lo que se denomina "diagnóstico diferencial", es decir, un procedimiento de diagnóstico sistemático que considera la probabilidad de una gama de afecciones posibles basándose en una gama de parámetros de diagnóstico. El término "diagnóstico" también puede referirse a un procedimiento o agente utilizado para elegir el régimen de tratamiento más prometedor para un paciente. En otras palabras, el procedimiento o el agente pueden estar relacionados con la selección de un régimen de tratamiento para un sujeto.

La presente invención se refiere a un procedimiento que comprende la etapa de detectar en una muestra de un sujeto la presencia o ausencia de un anticuerpo para un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8. Dicho procedimiento puede comprender las etapas a) proporcionar una muestra de un sujeto, b) poner en contacto la muestra con el vehículo útil para el diagnóstico de acuerdo con la presente invención en condiciones compatibles con la formación de un complejo que comprende el vehículo útil para el diagnóstico y el anticuerpo, más específicamente, los medios para capturar específicamente el anticuerpo y el anticuerpo, c) aislar dicho complejo, por ejemplo, eliminando la muestra, d) opcionalmente, lavar dicho complejo, y e) detectar dicho complejo. El procedimiento es preferentemente un procedimiento *in vitro*. La detección del complejo para los procedimientos de pronóstico, diagnóstico, o el kit de prueba según la presente invención comprende el uso de un procedimiento seleccionado del grupo que comprende técnicas de inmunodifusión, activación de basófilos por anticuerpos IgE, técnicas inmunolectroforéticas, inmunoensayos de dispersión de luz, técnicas de aglutinación, inmunoensayos marcados tales como los del grupo que comprende inmunoensayo radiomarcado, inmunoensayos enzimáticos tales como ensayos colorimétricos, inmunoensayos de quimioluminiscencia y técnicas de inmunofluorescencia. En una realización preferida, el complejo se detecta usando un procedimiento seleccionado del grupo que comprende técnicas de inmunodifusión, activación de basófilos por anticuerpos IgE, técnicas inmunolectroforéticas, inmunoensayos de dispersión de luz, técnicas de aglutinación, inmunoensayos marcados del grupo que comprende inmunoensayos radiomarcados, inmunoensayos de quimioluminiscencia y técnicas de inmunofluorescencia. El experto en la materia está familiarizado con estos procedimientos, que también se describen en el estado de la técnica, por ejemplo en Zane, H. D. (2001): Immunology - Theoretical & Practical Concepts in Laboratory Medicine, W. B. Saunders Company, en particular en el Capítulo 14.

En muchos casos, detectar la ausencia o presencia de un anticuerpo, opcionalmente significa determinar si la concentración del anticuerpo está más allá de cierto umbral, preferentemente según lo establecido por medición usando ELISA, preferentemente tal como se describe en el Ejemplo 1, en el límite de detección implícito por este procedimiento, a menudo sugerido por el límite de detección, en la muestra, es suficiente para el diagnóstico. Si se puede detectar el anticuerpo, ésta será la información instrumental para el diagnóstico del médico e indica una mayor probabilidad de que el paciente padezca una enfermedad. En una realización preferida, se puede determinar la concentración relativa del anticuerpo en el suero, en comparación con el nivel que se puede encontrar en el sujeto sano promedio. En una realización preferida, la expresión "detectar la presencia", tal y como se usa en el presente documento, significa que es suficiente verificar si se puede detectar una señal suficientemente más allá de cualquier nivel de fondo utilizando un procedimiento de detección complejo adecuado que indique que el anticuerpo de interés está presente o que está presente más de un anticuerpo de interés del que estaría en un sujeto sano. En una realización más preferida, esto puede implicar determinar si la concentración es al menos 0,1, preferentemente 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 10000 o 100000 veces más que la concentración del anticuerpo de interés encontrada en el sujeto sano promedio.

En una realización preferida, la ausencia o presencia de al menos un anticuerpo, tal como un anticuerpo contra Ara h 7 isotipo 7.0201 y el anticuerpo contra Ara h 2 y/o el anticuerpo contra Ara h 6, se detecta simultáneamente, es decir al mismo tiempo. Esto es conveniente en términos de procedimientos de diagnóstico eficaces, como un máximo de información de diagnóstico se obtiene en un período de tiempo determinado. Por supuesto, un requisito previo es que haya suficiente capacidad disponible para ejecutar todas las reacciones.

En una realización preferida, la ausencia o presencia de al menos dos anticuerpos, tal como un anticuerpo contra Ara h 7 isotipo 7.0201 y el anticuerpo contra Ara h 2 y/o el anticuerpo contra Ara h 6, se detecta en reacciones espacialmente separadas. Esto significa que estas reacciones se ejecutan en diferentes mezclas de reacción en recipientes separados.

Si se va a detectar más de un anticuerpo, el procedimiento se puede llevar a cabo en una reacción one-pot. Preferentemente, la expresión "reacción one-pot", tal y como se usa en el presente documento, significa que dos o más, preferentemente todas las reacciones llevadas a cabo con el fin de detectar la presencia o ausencia de un anticuerpo se llevan a cabo en la misma mezcla de reacción en un recipiente de reacción, sin barreras físicas entre las reacciones, en contraste con los escenarios experimentales que contemplan que al menos dos reacciones se llevan a cabo en soluciones separadas y recipientes de reacción.

El anticuerpo a detectar puede ser un anticuerpo monoespecífico. En una realización preferida, la expresión "anticuerpo monoespecífico", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une a un solo antígeno, preferentemente, un solo antígeno relevante para el diagnóstico, más preferentemente, solo un antígeno relevante para el diagnóstico del grupo que comprende Ara h 7, Ara h 2 y Ara h 6. En una realización más preferida, el anticuerpo monoespecífico a detectar se puede unir a un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201,

en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8 pero no cualquier otro alérgeno tal como Ara h isotipo 70101, Ara h 7.0, o como Ara h 2 y/o Ara h 6. Si un paciente solo tiene un anticuerpo mono-específico, su alergia solo se puede detectar, a modo de serología, si se usa un medio para capturar y detectar específicamente dicho anticuerpo mono-específico. Si se usa un ensayo de diagnóstico basado en medios para detectar anticuerpos contra isotipos de Ara h 7 distintos de 7.0201, que no comprenden un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 epítipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8, el resultado del ensayo puede ser falso negativo, dado que el anticuerpo mono-específico para un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8, no se puede detectar.

La invención proporciona el uso de un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8, para aumentar la sensibilidad de un vehículo útil para el diagnóstico, para detectar un anticuerpo contra Ara h 7, preferentemente un anticuerpo mono-específico para Ara h 7, para fabricar un kit para el diagnóstico de alergia al cacahuete o para un procedimiento para diagnosticar una alergia a los frutos secos, preferentemente una alergia al cacahuete, opcionalmente en combinación con un medio para capturar específicamente un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales tales como Ara h 2 y/o Ara h 6.

La invención proporciona un uso de un anticuerpo que se une específicamente a la SEQ ID NO 6, más preferentemente, para una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, más preferentemente a la SEQ ID NO 8, cuyo anticuerpo es preferentemente un anticuerpo mono-específico. Más preferentemente, el anticuerpo se detecta o aísla de una muestra del paciente y es un anticuerpo de la clase IgA, IgE o IgG, más preferentemente, un anticuerpo de la clase IgE, IgG1 o IgG4, más preferentemente, un anticuerpo de clase IgE.

La invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a la SEQ ID NO 6, más preferentemente, para una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, más preferentemente a la SEQ ID NO 8, cuyo anticuerpo es preferentemente un anticuerpo mono-específico. El anticuerpo contra TNF- $\alpha$  puede ser un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal. Este anticuerpo es útil para muchas aplicaciones de diagnóstico, por ejemplo, para medir la avididad de un anticuerpo de una muestra. Como alternativa, el anticuerpo se puede usar para un ensayo competitivo tal como un ELISA competitivo. Como alternativa, el anticuerpo se puede usar para inmovilizar un polipéptido que comprende preferentemente la SEQ ID NO 6, más preferentemente, para una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, más preferentemente para la SEQ ID NO 8. Como alternativa, el anticuerpo se puede usar como control positivo. El experto en la materia sabe cómo obtener dicho anticuerpo, por ejemplo usando procedimientos recombinantes. La fabricación puede implicar la etapa de purificación y/o aislamiento del anticuerpo.

La invención proporciona un uso de un polipéptido que comprende la SEQ ID NO 8, más preferentemente, una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 6, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, más preferentemente, la SEQ ID NO 6, más preferentemente Ara h 7 isotipo 7.0201 o una variante del mismo, preferentemente en combinación con Ara h 2 y/o Ara h 6 o una variante del mismo, para la fabricación de un kit para el diagnóstico de alergia al cacahuete, en el que se proporciona un ensayo de diagnóstico con una mayor sensibilidad. Tal fabricación se puede relacionar con un procedimiento que comprende la etapa de inmovilización en un vehículo útil para el diagnóstico de un polipéptido que comprende la SEQ ID NO 6, más preferentemente, una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, lo más preferentemente, la SEQ ID NO 8, preferentemente en combinación con Ara h 2 y/o Ara h 6 o una variante del mismo.

La **Fig. 1** muestra la unión de IgE a las isoformas de Ara h 7 de pacientes sensibilizados con cacahuete detectadas mediante ELISA tal como se describe en el ejemplo 1.

La **Fig. 2** muestra la unión de IgE a las isoformas de Ara h 7, así como a Ara h 2 y Ara h 6 de pacientes sensibilizados con cacahuete detectadas mediante análisis por transferencia de línea tal como se describe en el ejemplo 2.

La **Fig. 3** muestra los experimentos de inhibición descritos en el ejemplo 3. Inhibición máxima observada para los cinco componentes de cacahuete en pacientes sensibilizados al alérgeno inmovilizado. La línea horizontal marca el valor medio. Los marcadores grises abiertos indican inhibición con el mismo alérgeno que el inmovilizado.

La **Fig. 4** muestra los resultados del mapeo de epítipos de IgE en suero contra péptidos lineales del extremo C-terminal de Ara h 7.0201. La relación señal frente a ruido normalizada (puntuación z) se presenta para cada péptido en la micromatriz. La unión positiva requiere al menos 6 péptidos posteriores que producen una puntuación z superior a 3.

#### Secuencias:

La presente invención comprende una gama de nuevos polipéptidos, más específicamente

**SEQ ID NO 1 (secuencia expresada sin secuencia señal de Ara h 7.0101)**

TRWDPDRGSRGSRWDAPSRGDDQCQRQLQRANLRPCEEHMRRRVEQEQQEQDEYPY  
SRRGSRGRQPGESDENQEQRCCNELNRFQNNQRRCMCQALQQILQNSFWVPAGQEPVA  
SDGEGAQELAPELRVQVTKPLRPL

**SEQ ID NO 2 (secuencia expresada sin secuencia señal de Ara h 7.0201)**

TRWDPDRGSRGSRWDAPSRGDDQCQRQLQRANLRPCEEHIRQRVEKEQEQQEQDEYPYI  
QRGSRGQRPGESDEDQEQRCCNELNRFQNNQRRCMCQALQQILQNSFRFQQDRSQLHQ  
MERELRNLPQNCGFRSPSRCDLSSRTPY

5 **SEQ ID NO 3 (secuencia expresada sin secuencia señal de Ara h 7.0)**

TRWDPDRGSRGLRWDAPSRGDDQCQRQLQRANLRPCEEHIRQRVEQEQQEQDEYPYS  
QRGSRGRRPGESDEDQEQRCCNELNRFQNNQRRCMCQALQQILQNSFRFQQDRSQLHQ  
NGEGAQELAPELRVQVTKPLRP

**SEQ ID NO 4 (secuencia expresada sin secuencia señal de Ara h 2.0201)**

RQQWELQGDRRCQSQLERANLRPCEQHLMQKIQRDEDSYGRDPYSPSQDPYSPSQDPD  
RRDPYSPSPYDRRGAGSSQHQRCCNELNEFENNQRRCMCQALQQIMENQSDRLQGRQQ  
EQQFKRELRLNPQQCGLRAPQRCDDLEVESGGRDRY

**SEQ ID NO 5 (secuencia expresada sin secuencia señal de Ara h 6.0101)**

10 MRRERGRQGDSSSCERQVDRVNLKPCEQHIMQRIMGEQEYDSYDIRSTRSSDQQQRCC  
DELNEMENTQRRCMCQALQQIMENQCDRLQDRQMVQQFKRELMNLPQQCNFRAPQRCDL  
DVSGGRC

**SEQ ID NO 6 (extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201)**

HQMERELRNLPQNCGFRSPSRCDLSSRTPY

**SEQ ID NO 7 (extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201)**

NCGFRSPSRC

15 **SEQ ID NO 8 (epítipo reactivo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201)**

GFRSPS

**SEQ ID NO 9 (extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201)**

CGFRSPSRCD

20 **SEQ ID NO 10 (extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201)**

QNCGFRSPSRCDL

**SEQ ID NO 11 (Ara h 7 isotipo 7.0101, tal como se expresa en el ejemplo**

MSHHHHHHHLEVLFFQGSPMTRWDPDRGSRGSRWDAPSRGDDQCQRQLQRANLRPCE  
EHMRRRVEQEQQEQDEYPYSRRGSRGRQPGESDENQEQRCCNELNRFQNNQRRCMCQ  
ALQQILQNSFWVPAGQEPVASDGEAELAPELRVQVTKPLRPL

**SEQ ID NO 12 (Ara h 7 isotipo 7.0201, tal como se expresa en el ejemplo 1)**

MSHHHHHHHLEVLFFQGSPMTRWDPDRGSRGSRWDAPSRGDDQCQRQLQRANLRPCE  
EHIRQRVEKEQEQQEQDEYPYIQRGSRGQRPGESDEDQEQRCCNELNRFQNNQRRCMCQAL  
QQILQNSFRFQQDRSQLHQMERELRNLPQNCGFRSPSRCDLSSRTPY

25 **SEQ ID NO 13 (Ara h 7 isotipo 7.0, tal como se expresa en el ejemplo 1)**

MSHHHHHHHLEVLFFQGSPMTRWDPDRGSRGLRWDAPSRGDDQCQRQLQRANLRPCEE  
HIRQRVEQEQQEQDEYPYSQRGSRGRRPGESDEDQEQRCCNELNRFQNNQRMCQAL  
QQILQNQSFRFQQDRSQLHQNGEGAQELAPELRVQVTKPLRP

**SEQ ID NO 14 (Ara h 2 isotipo 2.0201, talo como se expresa en el ejemplo 1)**

MSHHHHHHIEGRTMRQQWELQGDRRCQSQLERANLRPCEQHLMQKIQRDEDSYGRDPY  
SPSQDPYSPSQDPDRRDYPSPYDRRGAGSSQHQRCCNELNEFENNQRMCCEALQQI  
MENQSDRLQGRQQEQQFKRELRLNPQQCGLRAPQRCDLEVESGGRDRY

**SEQ ID NO 15 (Ara h 6 isotipo 6.0101, talo como se expresa en el ejemplo 1)**

MSHHHHHHHLEVLFFQGSPMRERGRQGDSSSCERQVDRVNLKPCEQHIMQRIMGEQEQ  
YDSYDIRSTRSSDQQQRCCDELNEMENTQRMCCEALQQIMENQCDRLQDRQM VQQFKRE  
LMNLPQQCNFRAPQRCDLDVSGGRC

5

**SEQ ID NO 16: Ara h 1.01.01 tal como se usa en el ejemplo 3**

MSHHHHHHIEGRTMKSSPYQKKTENPCAQRCLQSCQQEPDDLKQKACESRCKLEYDPR  
CVYDPRGHTGTTNQRSPPGERTRGRQPGDYDDRRQPRREEGGRWGPAGPREREREE  
DWRQPREDWRRPSHQPRKIRPEGREGEQEWGTPGSHVREETSRRNNPFYFPSRRFSTR  
YGNQNGRIRVLQRFQDRSRQFQNLQNHRIQIEAKPNTLVLPKHADADNILVIQQGQATVTV  
ANGNNRKSFNLDGHALRIPSGFISYILNRHDNQLRVAKISMPVNTPGQFEDFFPASSRDQ  
SSYLQGFSRNTLEAAFAEFNEIRRVLLEENAGGEQEERGQRRWSTRSSENNEGVIVKVK  
EHVEELTKHAKSVSKKGSEEEGDITNPINLREGEPDLSNNFGKLFVVKPDKKPNQLQDLD  
MLTCVEIKEGALMLPHFNSKAMVIVVVKGTGNLELVAVRKEQQQRGRREEEEDDEEEEG  
SNREVRRYTARLKEGDVFIMPAHPVAINASSELHLLGFGINAENHRIFLAGDKDNVIDQIE  
KQAKDLAFPGSGEQVEKLIKQKESHFVSARPSQSQSPSSPEKESPEKEDQEEENQGGK  
GPLLSILKAFN

**SEQ ID NO 17: Ara h 3.01.01 tal como se usa en el ejemplo 3**

MSHHHHHHHLEVLFFQGSPMRQQPEENACQFQRLNAQRPDNRIESEGGYIETWNPNNQE  
FECAGVALSRLVLRNALRRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIFPGCPRHYEEPHTQGRRSQ  
SQRPPRRLQGEDQSQQQRDSHQKVRHFDGDLIAVPTGVAFWLYNDHDTDVAVSLTDTN  
NNDNQLDQFPRRNLGANTEQEFLRYQQQSRQSRRRSLPYSPYSPQSQRQEEREFSPR  
GQHSRRERAGQEEENEGGNIFSGFTPEFLEQAFQVDDRQIVQNLRGETESEEEGAIVTVRG  
GLRILSPDRKRRADEEEYDEDEYDEEDRRRGRGSRGRGNGIEETICTASAKKNIGRNR  
SPDIYNPQAGSLKTANDLNLILRWLGPSAEYGNLYRNALFVAHYNTNAHSIYRLRGRAHVQ

VVDSNGNRVYDEELQEGHVLVVPQNFVAVAGKSQSENFYVAFKTDSPSIANLAGENSVID  
NLPEEVVANSYGLQREQARQLKNNNPFKFFVPPSQSPRAVA

10 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes a partir de los cuales se pueden tomar características, realizaciones, aspectos y ventajas adicionales de la presente invención.

**1. Ejemplo 1: Detección de anticuerpos IgE contra isotipos de Ara h 7 en sueros de pacientes sensibilizados con cacahuete por ELISA**

**1.1. Proteínas recombinantes**

15 Expresión heteróloga y purificación de alérgenos recombinantes

Ara h 7.0101 (SEQ ID NO 11), Ara h 7.0201 (SEQ ID NO 12), Ara h 7.0 (SEQ ID NO 13), Ara h 6 (SEQ ID NO 15) y

Ara h 2 (SEQ ID NO 14) se expresaron y se purificaron como proteínas de fusión con His6 que tienen las secuencias indicadas por las respectivas SEQ ID NO en *E. coli* según lo descrito por Sitaru C, Dahnrich C, Probst C, Komorowski L, Blocker I, Schmidt E, Schlumberger W, Rose C, Stöcker W, Zillikens D. Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies. *Exp Dermatol.* Septiembre de 2007; 16(9):770-7. La purificación se realizó en condiciones desnaturalizantes por medio de cromatografía de iones metálicos inmovilizados.

## 1.2. Detección de unión a IgE mediante ELISA

La capacidad de unión a IgE de las tres isoformas de Ara h 7 se analizó mediante un ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) incubado con sueros de 33 pacientes que fueron IgE positivos para el extracto de cacahuete (**Figura 1**). Además, se incubaron 10 sueros de pacientes atópicos sin sensibilización de cacahuete y 23 donantes de sangre sanos como controles negativos (todos reaccionaron negativamente, datos no mostrados).

Las placas de microtitulación se recubrieron con los alérgenos de cacahuete recombinantes (9 µg/ml en PBS, a pH 7,5) 2 h a 4 °C tal como lo describe Sitaru y col. Los sueros se diluyeron a 1/10 v/v en tampón de bloqueo (PBS-albúmina de suero bovino al 0,1%), se aplicaron 100 µl por pocillo por duplicado a las placas y se dejó reaccionar durante la noche a 4 °C.

Los anticuerpos unidos se detectaron usando anti-IgE humana conjugado con peroxidasa y se tiñeron con tetrametilbencidina (Total IgE ELISA EV 3840-9601 E, Euroimmun, Lübeck, Alemania). La densidad óptica (DO) se leyó a 450 nm con referencia a 620 nm utilizando un espectrofotómetro automatizado (Spectra Mini, Tecan, Alemania).

### Resultados

La reactividad de IgE contra Ara h 7 isotipo 7.0101, Ara h 7 isotipo 7.0201 y Ara h 7.0 se midió en 66 sueros humanos. Ninguno de los 23 donantes de sangre y ninguno de los 10 sueros de pacientes alérgicos que no tenían IgE contra el extracto de cacahuete reaccionaron positivamente. De los 23 sueros positivos de extracto de cacahuete 11 mostraron resultados positivos con Ara h 7.0201, pero solo 6 y 10 con Ara h 7.0101 y Ara h 7, respectivamente.

Entre los sueros que reaccionaron positivamente, la DO promedio fue de 1,0 para Ara h 7.0201. La DO promedio para Ara h 7.0101 y Ara h 7.0 fue bastante más baja (ambas 0,4).

Estos resultados muestran, por un lado, que Ara h 7.0201 reaccionó más fuerte con la IgE del paciente, por otro lado, que más pacientes podrían ser diagnosticados correctamente mediante la detección de anticuerpos de IgE usando Ara h 7.0201 como antígeno diana en comparación con las otras dos isoformas (**Fig. 1**). De hecho, algunos pacientes solo pueden (!) ser identificados y diagnosticados como alérgicos si se detectan anticuerpos contra Ara h 7.0201.

### 30 Ejemplo 2: Detección de anticuerpos de IgE por análisis por transferencia de línea

La capacidad de unión a IgE de las albúminas 2S Ara h 2, Ara h 6, y tres isoformas Ara h 7 fueron investigadas por análisis de inmunotransferencia. Las muestras de suero de 34 sujetos sensibilizados con cacahuete (**Figura 2**) se incubaron con análisis por transferencia de líneas-inmunotransferencias y las intensidades se evaluaron con el programa informático EUROLINEScan. Además, se incubaron 20 sueros de sujetos atópicos sin sensibilización de cacahuete y 17 donantes de sangre sanos como controles negativos (todos negativos, datos no mostrados).

Para los análisis por transferencia de líneas-inmunotransferencias, los alérgenos recombinantes se recubrieron con membranas a base de nailon utilizando procedimientos estándar. Luego se bloquearon las membranas, se secaron y se fijaron sobre una lámina. Esta lámina se cortó en tiras que se incubaron con suero.

La incubación manual de las muestras de suero se realizó de acuerdo con las instrucciones de inmunotransferencia de EUROIMMUN (por ejemplo, en el polen DPA-Dx 1, DP 3210-1601-1 E). Todas las etapas de incubación y lavado se realizaron en un agitador oscilante a temperatura ambiente (+18 °C a +25 °C). Los reactivos se tomaron de un kit suministrado por EUROIMMUN (DPA-Dx polen 1, DP 3210-1601-1 E). Las tiras de inmunotransferencia se preincubaron con tampón universal de fuerza de trabajo (WSUB) durante 5 minutos. Después de eliminar todas las tiras líquidas, se incubaron en una primera etapa con 100 µl de cada muestra de suero diluida con 1,0 ml de WSUB durante la noche (12 a 24 h). En una segunda etapa, las tiras se incubaron con 1,0 ml de conjugado enzimático (anti-IgE humana conjugada con fosfatasa alcalina) durante 60 minutos. Después de las etapas uno y dos, el líquido se aspiró respectivamente y las tiras se lavaron durante 3 x 5 minutos con 1,0 ml de WSUB. En la tercera etapa, las tiras se incubaron con 1,0 ml de solución de cromógeno/sustrato durante 10 minutos. Después, el líquido se aspiró nuevamente y la reacción enzimática se detuvo lavando cada tira 3 x 1 minuto con agua desionizada o destilada. Finalmente, las tiras de prueba se colocaron en el protocolo de evaluación, se secaron al aire y se evaluaron con el programa informático EUROLINEScan.

### Resultados

En total, se analizaron 71 muestras con la inmunotransferencia. En ninguno de los 20 sueros de sujetos atópicos sin IgE específica (sIgE) contra el extracto de cacahuete y los 17 donantes de sangre sanos sIgE contra Ara h 2, Ara h 6,

y se detectaron las tres isoformas de Ara h 7. De las 34 muestras de sujetos con sIgE contra extracto de cacahuete, 17 muestras reaccionaron positivas con Ara h 2 y Ara h 6, 15 con Ara h 7.0201, 14 con Ara h 7.0101 y 11 con Ara h 7.0, respectivamente.

5 Mientras que entre los sueros reactivos positivos, la media de las intensidades de inmunotransferencia de Ara h 2, Ara h 6 y Ara h 7.0201 fueron 84, 59 y 74, las intensidades medias de Ara h 7.0101 y Ara h 7 fueron bastante más bajas (20 y 28) (**Fig. 2**).

10 Los resultados muestran que los sujetos con sIgE contra extracto de cacahuete presentan niveles de IgE promedio más altos de Ara h 7.0201 que de Ara h 7.0101 y Ara h 7.0. Además, los sujetos con extracto de cacahuete IgE positivo tienen niveles promedio muy similares de IgE de Ara h 2 y Ara h 7.0201, lo que indica que la IgE de Ara h 7.0201 es otro componente alérgico importante para la alergia al cacahuete, así como Ara h 2.

### **Ejemplo 3: Estudio basado en una cohorte de pacientes más grande utilizando análisis por transferencia de líneas y ELISA**

#### *Selección de pacientes*

15 Para evaluar el valor de diagnóstico de las diferentes proteínas de almacenamiento de cacahuete, se seleccionaron los adultos con sospecha de alergia al cacahuete basándose en los antecedentes y/o en la sensibilización que se habían sometido a un diagnóstico basado en una exposición alimentaria de doble ciego controlada con placebo (DBPCFC) con cacahuete en el Centro Médico de la Universidad de Utrecht entre 2003 y septiembre de 2014 (n = 127). El suero residual después de la recolección de sangre de rutina un año antes o después de la fecha de exposición a alimentos estaba disponible para 95 sujetos. De esta cohorte, se seleccionaron 40 pacientes alérgicos al cacahuete y 40 pacientes tolerantes (es decir, con una exposición positiva y negativa respectivamente) según la disponibilidad de los datos de sensibilización de ImmunoCAP ISAC. Los DBPCFC se realizaron de acuerdo con el protocolo de consenso internacional tal como se describió anteriormente (Taylor SL, Hefle SL, Bindslev-Jensen C, Atkins FM, Andre C, Brujinzeel-Koomen C, y col. A consensus protocol for the determination of the threshold doses for allergenic foods: How much is too much? Clin Exp Allergy 2004;34:689-95. doi:10.1111/j.1365-2222.2004.1886.x.). Todas las exposiciones positivas fueron DBPCFC. Las exposiciones negativas también incluyeron dos exposiciones abiertas de cacahuete. Para los experimentos de inhibición, se obtuvo suero de 10 adultos alérgicos sensibilizados al extracto de cacahuete y con un DBPCFC positivo, se seleccionaron al azar de una cohorte caracterizada previamente por Peeters KABM, Koppelman SJ, van Hoffen E, van der Tas CWH, den Hartog Jager CF, Penninks AH, y col. Does skin prick test reactivity to purified allergens correlate with clinical severity of peanut allergy? Clin Exp Allergy 2007;37:108-15. doi:10.1111/j.1365-2222.2006.02628.x.

#### **ANÁLISIS POR TRANSFERENCIA DE LÍNEA**

35 La sensibilización a las proteínas de almacenamiento de cacahuete recombinantes Ara h 1.0101, 2.0201, 3.0101, 6.0101 y Ara h 7 isotipo 7.0201 (**Tabla 1**) se evaluó usando un análisis por transferencia de línea tal como se describe en el ejemplo 2. Brevemente, las tiras de prueba se incubaron a temperatura ambiente en un agitador orbital durante la noche con 100 µl de suero de paciente diluido a 1:11 en tampón de dilución. Después de los lavados, se hizo una incubación con un anticuerpo anti-IgE humano marcado con enzima, y luego con el sustrato nitro-azul tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3'-indolifosfato, la reacción se evaluó utilizando el programa informático "EUROLineScan". La intensidad de las bandas se documentó como un nivel de intensidad y una clase, que se corresponde a la clasificación de prueba de enzima-alergia-sorbente (clase 0-6) (Williams PB, Barnes JH, Szeinbach SL, Sullivan TJ. Analytic precision and accuracy of commercial immunoassays for specific IgE: Establishing a standard. J Allergy Clin Immunol 2000;105:1221-30. doi:10.1067/mai.2000.105219). Una clase de 1 o superior, correspondiente al nivel de intensidad de 3 o superior, fue considerada positiva.

#### *Expresión heteróloga y purificación de alérgenos recombinantes*

45 Ara h 7.0101 (SEQ ID NO 11), Ara h 7.0201 (SEQ ID NO12), Ara h 7 (SEQ ID NO 13), Ara h 6 (SEQID NO15) y Ara h 2 (SEQ ID NO14) se expresaron sin secuencia señal como proteínas de fusión con His(6x) en N-terminal en *E. coli* con representado por las respectivas SEQ ID NO según lo descrito por Sitaru y col. (2007). La purificación se realizó en condiciones desnaturizantes por medio de cromatografía de iones metálicos inmovilizados. Para los experimentos de inhibición, las proteínas recombinantes se dializaron contra TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, sacarosa al 3 %, glutatión 1,2 mM, no reducido, glutatión 3,8 mM, reducido).

#### 50 *ELISA y experimento de inhibición*

Las placas de microtitulación se recubrieron con alérgenos de cacahuete recombinantes inmovilizados (9 µg/ml en PBS, a pH 7,5) 2 h a 4 °C tal como lo describe Sitaru y col.

55 Para experimentos de inhibición cruzada dependientes de la dosis, los sueros diluidos óptimos en tampón de bloqueo descritos en el ejemplo 1 (véase la **Tabla 3**) se preincubaron con los alérgenos de la competencia a una concentración final de 0,1, 1 y 10 µg/ml, durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente antes de aplicar a las placas. Los valores de inhibición se dan como un porcentaje de reducción de DO en comparación con los controles, en los que

solo se ha agregado el tampón de bloqueo.

#### *Análisis de datos y estadísticas*

Se utilizó la correlación de Spearman para analizar la correlación entre los resultados de las pruebas de sIgE. La prueba de chi cuadrado se utilizó para evaluar las diferencias en las pruebas positivas entre pacientes tolerantes y alérgicos. Se determinó el área bajo la curva (ABC) de la característica de funcionamiento del receptor (CFR) para evaluar la capacidad de las pruebas para discriminar entre alérgico y tolerante, según lo establecido por la exposición alimentaria. Se utilizó SPSS Statistics 21 (IBM Corporation, Armonk, NY, EE. UU.) para realizar los análisis.

### **Resultados**

#### *Evaluación de la sensibilización a las proteínas de almacenamiento de cacahuete*

Las características del paciente de los 80 pacientes expuestos al cacahuete, utilizados en la evaluación del diagnóstico, se enumeran en la **Tabla 2**. La mediana de edad fue de 25 años (intervalo: 16-77) y el 36 % eran hombres. La sensibilización a todas las proteínas de almacenamiento de cacahuete ocurrió significativamente más a menudo en el grupo alérgico al cacahuete. En el grupo alérgico al cacahuete, el 73 % estaba sensibilizado al menos a una de las cinco proteínas de almacenamiento, en comparación con el 15 % en el grupo tolerante al cacahuete. La albúmina de cacahuete 2S Ara h 2 fue más reconocida en los pacientes alérgicos al cacahuete (65 %), seguido de cerca por las otras dos albúminas 2S Ara h 6 y 7 (ambas 60 %).

El valor discriminativo más alto se encontró para Ara h 6 (ABC 0,85), seguido de Ara h 7 y 2 (ABC 0,83 y 0,81). Los valores de intensidad de EUROLINE mostraron una correlación de fuerte a muy fuerte con los resultados de ISAC ISU para las proteínas de almacenamiento de cacahuete (valor  $r_s$  de Ara h 1: 0,73, Ara h 2: 0,87, Ara h 3: 0,80, Ara h 6: 0,84, todos con  $p < 0,001$ ). Los valores de intensidad de Ara h 7 están fuertemente correlacionados con los de Ara h 2 y 6 en EUROLINE ( $r_s = 0,81$  y  $p < 0,001$  para ambos). Los resultados de sensibilización y la capacidad discriminativa de los componentes de EUROLINE e ImmunoCAP ISAC se enumeran en la **Tabla 2**.

La sensibilización conjunta a las proteínas de almacenamiento de cacahuete fue más común. Casi la mitad de todos los pacientes sensibilizados a las proteínas de almacenamiento de cacahuete Ara h 1, 2, 3, 6 o 7 estaban sensibilizados a los cinco (46 %; Figura E1 en el repositorio en línea), seguido de la cosensibilización a Ara h 2, 6 y 7 solamente (14 %). Cuando se observó específicamente a pacientes sensibilizados a las albúminas 2S Ara h 2, 6 o 7, la mayoría estaban cosensibilizados a los tres ( $n = 24$ , 68 %; Figura 1). Se observó monosensibilización para Ara h 2 ( $n = 6$ ), Ara h 6 ( $n = 2$ ) y Ara h 7 ( $n = 2$ ), con una exposición al cacahuete positiva en 4 de 6, 1 de 2 y 1 de 2 respectivamente.

#### *Inhibición de ELISA con isoformas Ara h 2, 6 y 7*

Para los 10 pacientes en el estudio de inhibición, la mediana de edad fue de 25 años y cuatro eran hombres. Se detectó sensibilización al extracto de cacahuete en todos los sujetos, con títulos de ImmunoCAP de 1,7 a  $> 100$  kU/l. En primer lugar, la reactividad de IgE contra las tres isoformas de Ara h 7, así como Ara h 2 y 6 se evaluaron en los 10 sueros mediante ELISA. Cuatro sueros mostraron reactividad a los cinco componentes. Además, dos sueros reaccionaron a Ara h 7.0201, Ara h 2 y 6 y un suero solo a Ara h 2 y 6. En los tres pacientes restantes, los valores de DO eran demasiado bajos para los experimentos de inhibición. Se determinaron las diluciones óptimas para cada suero (datos no mostrados). Los experimentos de inhibición cruzada ilustraron que había una variabilidad por suero del paciente en la cantidad máxima de inhibición obtenida entre las diferentes albúminas 2S (**Fig. 3**). En algunos pacientes, no se observó inhibición, mientras que otros demostraron una inhibición parcial o casi completa con los diferentes alérgenos e inhibidores inmovilizados. Para las isoformas Ara h 7.0101 y 7, las otras dos isoformas lograron una fuerte inhibición, similar a la inhibición con el mismo alérgeno. Para Ara h 7.0201, la inhibición con los otros dos epítopos dio como resultado una inhibición muy limitada.

La variabilidad en la inhibición fue aún más pronunciada entre las diferentes albúminas 2S (**Fig. 3**). Por ejemplo, para Ara h 7.0201 inmovilizada, la inhibición con Ara h 6 dio como resultado una inhibición del 8 al 86 % (mediana del 22 %) y una inhibición de Ara h 2 del 4 al 71 % (mediana del 16 %). Por otro lado, la unión a Ara h 6 y Ara h 2 se inhibió por las isoformas de Ara h 7, pero la inhibición de sIgE contra Ara h 6 por Ara h 2 varió entre el 12 y el 70 % (mediana del 43 %) y viceversa hasta el 77 % (mediana del 24 %). En resumen, Ara h 2 y 6 pudieron inhibir la unión a Ara h 7.0201 en algunos pacientes, pero no en otros. Las isoformas de Ara h 7 fueron poco capaces de inhibir la unión a Ara h 2 y 6, aunque Ara h 2 y 6 pudieron inhibir la unión entre sí en un grado variable.

### **Discusión**

En la cohorte de los inventores de 80 pacientes expuestos al cacahuete, los presentes inventores demostraron que Ara h 7.0201 tiene una capacidad discriminativa muy similar a los alérgenos principales Ara h 2 y 6, que puede explicarse por su frecuente cosensibilización, junto con una fuerte correlación entre sus resultados. En general, los presentes inventores descubrieron que Ara h 6 tenía la mejor capacidad discriminativa, ligeramente más alto que Ara h 2, tanto en ImmunoCAP ISAC como en el sistema EUROLINE.

Además de la cosensibilización común, también observaron monosensibilización a Ara h 2, 6 o 7.0201. Si bien la monosensibilización a Ara h 2 fue más común (n = 6), es importante reconocer la presencia de monosensibilización a Ara h 6 y 7.0201, que se perdería cuando solo se realiza una prueba de sensibilización a Ara h 2. Este es el primer estudio que demuestra monosensibilización a Ara h 7.0201 en dos sujetos.

- 5 Los estudios anteriores han investigado la sensibilización a Ara h 7, pero solo la isoforma Ara h 7 01.01. Después de la primera clonación Ara h 7.0101, Kleber-Janke y col. detectaron la sensibilización a rAra h 7.0101 en 17 de 40 sujetos (el 43 %) sensibilizados con cacahuete con antecedentes convincentes de alergia al cacahuete, en comparación con el 85 % para Ara h 2. Codreanu y sus colaboradores investigaron el papel de varios cacahuetes recombinantes en un inmunoensayo y demostraron que rAra h 7.0101 tiene una mala sensibilidad en comparación con rAra h 2 y 6.
- 10 Los experimentos de inhibición en el estudio de los presentes inventores ilustraron que Ara h 7.0201 es la isoforma más relevante de Ara h 7. En sueros de pacientes con slgE contra Ara h 7.0101 y 7.0, la fuerte inhibición por las otras isoformas sugiere el reconocimiento de los epítomos presentes en las tres isoformas de Ara h 7. Por otro lado, en sujetos sensibilizados a Ara h 7.0201, la falta de inhibición por las otras isoformas indica cosensibilización a epítomos únicos, no presente en las otras dos isoformas. En cuatro de los seis sueros sensibilizados a cualquier isoforma de Ara h 7, hubo cosensibilización a las tres isoformas de Ara h 7. Parece contradictorio que la unión a Ara h 7.0201 no pueda ser inhibida por las otras isoformas, mientras que al revés, Ara h 7.0201 fue capaz de inhibir la unión a las otras isoformas. Una explicación es el reconocimiento de múltiples epítomos de Ara h 7.0201, tanto únicos como de reacción cruzada, en un solo paciente, en el que abundante slgE contra los epítomos únicos presentes en una isoforma de Ara h 7 da como resultado una baja inhibición con otras isoformas que carecen de ese epítomo. Otro factor influyente podría ser la diferencia en la accesibilidad de los epítomos para IgE entre los alérgenos recubiertos inmovilizados en la fase sólida frente a los alérgenos disueltos plegados.

La inhibición cruzada de las albúminas 2S mostró que las isoformas de Ara h 7 no podían inhibir la IgE contra Ara h 2 y 6, sino hasta cierto punto entre sí. Esto podría explicarse por epítomos compartidos en Ara h 2 y 6 que no son parte de las isoformas de Ara h 7.

- 25 En conclusión, el presente estudio ha demostrado que Ara h 7 isotipo 7.0201 es la tercera albúmina de cacahuete 2S clínicamente relevante, una capacidad discriminativa a nivel poblacional para la alergia al cacahuete comparable a Ara h 2 y 6. Mientras que la cosensibilización a las proteínas de almacenamiento de cacahuete, y más específicamente a las albúminas 2S, es más común, la monosensibilización a Ara h 2, 6 o 7 ocurre en pacientes individuales, lo que lleva a un riesgo de diagnóstico erróneo al realizar pruebas para una sola albúmina 2S.

30 **Ejemplo 4: Detección de anticuerpos IgE contra epítomos específicos de Ara h 7 utilizando micromatrices de péptidos**

**Incubación y visualización de micromatrices de péptidos**

- Se obtuvo comercialmente (PEPperPRINT) una micromatriz de péptidos que comprende péptidos 15meros de Ara h 7.0201 (SEQ ID NO 2) con secuencias solapantes (desplazamiento: 1, cada péptido impreso en duplicados), que cubren el extremo C-terminal de Ara h 7.0201 (SEQ ID NO 6). Para los experimentos de incubación, la micromatriz se bloqueó con tampón universal de fuerza de trabajo (WSUB, véase el ejemplo 2) durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador orbital. Todas las incubaciones más descritas también se llevaron a cabo en WSUB. Los sueros de 3 pacientes positivos al cacahuete y 2 negativos al cacahuete se diluyeron a 1:4 y se incubaron durante la noche a 4 °C. Para la detección de anticuerpos IgE unidos, el anti-IgE IT-28 biotinilado (Squarix) se diluyó a 1:5000 y se incubó en la matriz durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, la matriz se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con Neutravidina 800 fluorescente (Thermo Fisher), diluida a 1:5000. Los portaobjetos de micromatrices de péptidos se escanearon con Licor Odyssey Imager a una longitud de onda de 800 nm (intensidad: 8,5). El enfoque de la imagen se ajustó a 0,8 mm y se eligió la resolución máxima de la imagen (21 µm) para garantizar la máxima sensibilidad.

45 **Evaluación**

- Después de escanear, las imágenes TIFF y los archivos de mapas de péptidos se cargaron en el programa informático Pepslide Analyzer (SICASYS) para cuantificar las señales correspondientes a cada péptido. Los datos sin procesar se exportaron como archivos CSV y se calculó el log2 de la proporción de señal frente a ruido para cada péptido Ara h 7 ( $S_{Ara}$ ) y para espacios vacíos ( $S_{Blanco}$ ) en la matriz. Para una evaluación más robusta y normalizada, se calcularon las puntuaciones z para cada péptido ( $Z_i$ ) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$Z_i = \frac{S_i - Mediana(S_{Blanco})}{MAD(S_{Blanco})}$$

Basándose en esos cálculos, se definió un epítomo de unión positiva definió como la detección de al menos 6 péptidos posteriores que comprenden una puntuación z de 3,0 o superior (p = 0,003). La visualización de datos se realizó con Microsoft Excel (Fig. 4).

55 **Resultados**

Si bien los dos sueros negativos no detectaron epítomos, utilizando suero 3, se pudo detectar un epítomo Ara h 7.0201 previamente desconocido que comprende la secuencia GFRSPS (aminoácidos 129-134) (números de restos de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 2). Aunque por debajo del umbral de la puntuación z, este epítomo también se puede detectar para el suero 1. Dado que esta secuencia es exclusiva de Ara h 7.0201, se puede concluir que este epítomo es el asociado con la **reactividad** mejorada de Ara h 7.0201 en comparación con las otras dos isoformas.

**Tablas**

**Tabla 1:** Proteínas de almacenamiento de cacahuete presentes en la tira EUROLINE. Adaptado de Becker y Jappe [5] y Van Erp y col. [7].

Alérgeno	Superfamilia de proteínas	Proporción de proteínas totales	Coefficiente de sedimentación	(Supuesta) función biológica	Alias
Ara h 1	Superfamilia de cupina	11-31 %	7S vicilina	Proteína de almacenamiento	Conaraquina
Ara h 2	Superfamilia de prolamina	7-16 %	Albúmina 2S	Proteína de almacenamiento, inhibidor de tripsina	Conglutina
Ara h 3	Superfamilia de cupina	38-76 %	11S leguminosa, glicinina	Proteína de almacenamiento	Araquina
Ara h 6	Superfamilia de prolamina	4-14 %	Albúmina 2S	Proteína de almacenamiento	Conglutina
Ara h 7	Superfamilia de prolamina	0,5 % [16]	Albúmina 2S	Inhibidor de tripsina/amilasa [4], proteína de almacenamiento	Conglutina

**Tabla 2:** Características del paciente y datos de sensibilización de los 40 pacientes con tolerancia al cacahuete y 40 pacientes alérgicos al cacahuete en la cohorte

Característica/sensibilización	En general (n = 80)		Tolerante al cacahuete (n=40)		Alergia al cacahuete (n=40)		p valor†	Tolerante frente a alérgico	
								ABC (IC del 95 %)	
Edad (mediana [RIC])	25	(21-37)	31	(22-43)	23	(20-29)	0,01	-	-
Sexo (n hombres [%])	29	(36 %)	12	(30 %)	17	(43 %)	0,25	-	-
<b>EUROLINE*</b>									
- Ara h 1	20	(25 %)	3	(8 %)	17	(43 %)	<0,001	0,69	(0,57-0,81)
- Ara h 2	30	(38 %)	4	(10 %)	26	(65 %)	<0,001	0,81	(0,71-0,91)
- Ara h 3	17	(21 %)	2	(5 %)	15	(38 %)	<0,001	0,72	(0,61-0,84)
- Ara h 6	27	(34 %)	3	(8 %)	24	(60 %)	<0,001	0,85	(0,76-0,93)
- Ara h 7	27	(34 %)	3	(8 %)	24	(60 %)	<0,001	0,83	(0,73-0,92)

RIC: Rango intercuartil. ABC: Área bajo la curva. IC: intervalo de confianza

\*Utilizando los valores umbral recomendados por el fabricante para una prueba positiva. † p valor de la diferencia en el número de pruebas positivas entre sujetos tolerantes y alérgicos (prueba de la chi cuadrado). n ± = 79

**Tabla 3:** Dilución individual de los sueros para el experimento de inhibición dependiente de la dosis descrito en el ejemplo 3

N.º de suero	ELISA recubierto con				
	Ara h 7.0101	mAra h 7.0201	Ara h 7.0	Ara h 6.0101	-Ara h 2.0201
1	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5
2	1:5	1:10	1:5	1:20	1:10
3	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5
4	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5
5		1:5		1:5	1:5
6				1:5	1:5

(continuación)

N.º de suero	ELISA recubierto con				
	Ara h 7.0101	mAra h 7.0201	Ara h 7.0	Ara h 6.0101	-Ara h 2.0201
7		1:5		1:5	1:5

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG
- <120> Ensayo mejorado para el diagnóstico de alergia al cacahuete
- <130> 17PP016

ES 2 788 389 T3

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 139

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO 1 (secuencia expresada sin secuencia señal de Ara h 7.0101)

<400> 1

Thr Arg Trp Asp Pro Asp Arg Gly Ser Arg Gly Ser Arg Trp Asp Ala  
1 5 10 15

Pro Ser Arg Gly Asp Asp Gln Cys Gln Arg Gln Leu Gln Arg Ala Asn  
20 25 30

Leu Arg Pro Cys Glu Glu His Met Arg Arg Arg Val Glu Gln Glu Gln  
35 40 45

Glu Gln Glu Gln Asp Glu Tyr Pro Tyr Ser Arg Arg Gly Ser Arg Gly  
50 55 60

Arg Gln Pro Gly Glu Ser Asp Glu Asn Gln Glu Gln Arg Cys Cys Asn  
65 70 75 80

Glu Leu Asn Arg Phe Gln Asn Asn Gln Arg Cys Met Cys Gln Ala Leu  
85 90 95

Gln Gln Ile Leu Gln Asn Gln Ser Phe Trp Val Pro Ala Gly Gln Glu  
100 105 110

Pro Val Ala Ser Asp Gly Glu Gly Ala Gln Glu Leu Ala Pro Glu Leu  
115 120 125

Arg Val Gln Val Thr Lys Pro Leu Arg Pro Leu  
130 135

10

<210> 2

<211> 144

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO 2 (secuencia expresada sin secuencia señal de Ara h 7.0201)

15

<400> 2

ES 2 788 389 T3

Thr Arg Trp Asp Pro Asp Arg Gly Ser Arg Gly Ser Arg Trp Asp Ala  
1 5 10 15

Pro Ser Arg Gly Asp Asp Gln Cys Gln Arg Gln Leu Gln Arg Ala Asn  
20 25 30

Leu Arg Pro Cys Glu Glu His Ile Arg Gln Arg Val Glu Lys Glu Gln  
35 40 45

Glu Gln Glu Gln Asp Glu Tyr Pro Tyr Ile Gln Arg Gly Ser Arg Gly  
50 55 60

Gln Arg Pro Gly Glu Ser Asp Glu Asp Gln Glu Gln Arg Cys Cys Asn  
65 70 75 80

Glu Leu Asn Arg Phe Gln Asn Asn Gln Arg Cys Met Cys Gln Ala Leu  
85 90 95

Gln Gln Ile Leu Gln Asn Gln Ser Phe Arg Phe Gln Gln Asp Arg Ser  
100 105 110

Gln Leu His Gln Met Glu Arg Glu Leu Arg Asn Leu Pro Gln Asn Cys  
115 120 125

Gly Phe Arg Ser Pro Ser Arg Cys Asp Leu Ser Ser Arg Thr Pro Tyr  
130 135 140

<210> 3

<211> 138

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO 3 (secuencia expresada sin secuencia señal de Ara h 7.0)

<400> 3

Thr Arg Trp Asp Pro Asp Arg Gly Ser Arg Gly Leu Arg Trp Asp Ala  
1 5 10 15

Pro Ser Arg Gly Asp Asp Gln Cys Gln Arg Gln Leu Gln Arg Ala Asn  
20 25 30

Leu Arg Pro Cys Glu Glu His Ile Arg Gln Arg Val Glu Gln Glu Gln

ES 2 788 389 T3

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

<210> 4  
 <211> 151  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> SEQ ID NO 4 (secuencia expresada sin secuencia señal de Ara h 2.0201)  
 <400> 4

ES 2 788 389 T3

Arg Gln Gln Trp Glu Leu Gln Gly Asp Arg Arg Cys Gln Ser Gln Leu  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Asn Leu Arg Pro Cys Glu Gln His Leu Met Gln Lys Ile  
 20 25 30

Gln Arg Asp Glu Asp Ser Tyr Gly Arg Asp Pro Tyr Ser Pro Ser Gln  
 35 40 45

Asp Pro Tyr Ser Pro Ser Gln Asp Pro Asp Arg Arg Asp Pro Tyr Ser  
 50 55 60

Pro Ser Pro Tyr Asp Arg Arg Gly Ala Gly Ser Ser Gln His Gln Glu  
 65 70 75 80

Arg Cys Cys Asn Glu Leu Asn Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Cys Met  
 85 90 95

Cys Glu Ala Leu Gln Gln Ile Met Glu Asn Gln Ser Asp Arg Leu Gln  
 100 105 110

Gly Arg Gln Gln Glu Gln Gln Phe Lys Arg Glu Leu Arg Asn Leu Pro  
 115 120 125

Gln Gln Cys Gly Leu Arg Ala Pro Gln Arg Cys Asp Leu Glu Val Glu  
 130 135 140

Ser Gly Gly Arg Asp Arg Tyr  
 145 150

<210> 5

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO 5 (secuencia expresada sin secuencia señal de Ara h 6.0101)

<400> 5

ES 2 788 389 T3

Met Arg Arg Glu Arg Gly Arg Gln Gly Asp Ser Ser Ser Cys Glu Arg  
1 5 10 15

Gln Val Asp Arg Val Asn Leu Lys Pro Cys Glu Gln His Ile Met Gln  
20 25 30

Arg Ile Met Gly Glu Gln Glu Gln Tyr Asp Ser Tyr Asp Ile Arg Ser  
35 40 45

Thr Arg Ser Ser Asp Gln Gln Gln Arg Cys Cys Asp Glu Leu Asn Glu  
50 55 60

Met Glu Asn Thr Gln Arg Cys Met Cys Glu Ala Leu Gln Gln Ile Met  
65 70 75 80

Glu Asn Gln Cys Asp Arg Leu Gln Asp Arg Gln Met Val Gln Gln Phe  
85 90 95

Lys Arg Glu Leu Met Asn Leu Pro Gln Gln Cys Asn Phe Arg Ala Pro  
100 105 110

Gln Arg Cys Asp Leu Asp Val Ser Gly Gly Arg Cys  
115 120

<210> 6  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> SEQ ID NO 6 (extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201)

<400> 6

His Gln Met Glu Arg Glu Leu Arg Asn Leu Pro Gln Asn Cys Gly Phe  
1 5 10 15

Arg Ser Pro Ser Arg Cys Asp Leu Ser Ser Arg Thr Pro Tyr  
20 25 30

<210> 7  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> SEQ ID NO 7 (extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201)

15

<400> 7

Asn Cys Gly Phe Arg Ser Pro Ser Arg Cys  
1 5 10

<210> 8  
<211> 6  
<212> PRT

20

ES 2 788 389 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO 8 (epítopo reactivo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201)

<400> 8

5

Gly Phe Arg Ser Pro Ser  
1 5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> SEQ ID NO 9 (extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201)

<400> 9

Cys Gly Phe Arg Ser Pro Ser Arg Cys Asp  
1 5 10

15

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO 10 (extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201)

20

<400> 10

Gln Asn Cys Gly Phe Arg Ser Pro Ser Arg Cys Asp Leu  
1 5 10

25

<210> 11

<211> 159

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO 11 (Ara h 7 isotipo 7.0101, tal como se expresa en el ejemplo 1)

<400> 11

ES 2 788 389 T3

Met Ser His His His His His His His His Leu Glu Val Leu Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Met Thr Arg Trp Asp Pro Asp Arg Gly Ser Arg Gly Ser  
 20 25 30

Arg Trp Asp Ala Pro Ser Arg Gly Asp Asp Gln Cys Gln Arg Gln Leu  
 35 40 45

Gln Arg Ala Asn Leu Arg Pro Cys Glu Glu His Met Arg Arg Arg Val  
 50 55 60

Glu Gln Glu Gln Glu Gln Glu Gln Asp Glu Tyr Pro Tyr Ser Arg Arg  
 65 70 75 80

Gly Ser Arg Gly Arg Gln Pro Gly Glu Ser Asp Glu Asn Gln Glu Gln  
 85 90 95

Arg Cys Cys Asn Glu Leu Asn Arg Phe Gln Asn Asn Gln Arg Cys Met  
 100 105 110

Cys Gln Ala Leu Gln Gln Ile Leu Gln Asn Gln Ser Phe Trp Val Pro  
 115 120 125

Ala Gly Gln Glu Pro Val Ala Ser Asp Gly Glu Gly Ala Gln Glu Leu  
 130 135 140

Ala Pro Glu Leu Arg Val Gln Val Thr Lys Pro Leu Arg Pro Leu  
 145 150 155

<210> 12

<211> 164

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO 12 (Ara h 7 isotipo 7.0201, tal como se expresa en el ejemplo 1)

<400> 12

ES 2 788 389 T3

Met Ser His His His His His His His His Leu Glu Val Leu Phe Gln  
1 5 10 15

Gly Pro Ser Met Thr Arg Trp Asp Pro Asp Arg Gly Ser Arg Gly Ser  
20 25 30

Arg Trp Asp Ala Pro Ser Arg Gly Asp Asp Gln Cys Gln Arg Gln Leu  
35 40 45

Gln Arg Ala Asn Leu Arg Pro Cys Glu Glu His Ile Arg Gln Arg Val  
50 55 60

Glu Lys Glu Gln Glu Gln Glu Gln Asp Glu Tyr Pro Tyr Ile Gln Arg  
65 70 75 80

Gly Ser Arg Gly Gln Arg Pro Gly Glu Ser Asp Glu Asp Gln Glu Gln  
85 90 95

Arg Cys Cys Asn Glu Leu Asn Arg Phe Gln Asn Asn Gln Arg Cys Met  
100 105 110

Cys Gln Ala Leu Gln Gln Ile Leu Gln Asn Gln Ser Phe Arg Phe Gln  
115 120 125

Gln Asp Arg Ser Gln Leu His Gln Met Glu Arg Glu Leu Arg Asn Leu  
130 135 140

Pro Gln Asn Cys Gly Phe Arg Ser Pro Ser Arg Cys Asp Leu Ser Ser  
145 150 155 160

Arg Thr Pro Tyr

<210> 13

<211> 158

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO 13 (Ara h 7 isotipo 7.0, tal como se expresa en el ejemplo 1)

<400> 13

Met Ser His His His His His His His His Leu Glu Val Leu Phe Gln  
1 5 10 15

Gly Pro Ser Met Thr Arg Trp Asp Pro Asp Arg Gly Ser Arg Gly Leu

ES 2 788 389 T3

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

<210> 14

<211> 165

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO 14 (Ara h 2 isotipo 2.0201, como se expresa en el ejemplo 1)

<400> 14

ES 2 788 389 T3

Met Ser His His His His His His Ile Glu Gly Arg Thr Met Arg Gln  
 1 5 10 15

Gln Trp Glu Leu Gln Gly Asp Arg Arg Cys Gln Ser Gln Leu Glu Arg  
 20 25 30

Ala Asn Leu Arg Pro Cys Glu Gln His Leu Met Gln Lys Ile Gln Arg  
 35 40 45

Asp Glu Asp Ser Tyr Gly Arg Asp Pro Tyr Ser Pro Ser Gln Asp Pro  
 50 55 60

Tyr Ser Pro Ser Gln Asp Pro Asp Arg Arg Asp Pro Tyr Ser Pro Ser  
 65 70 75 80

Pro Tyr Asp Arg Arg Gly Ala Gly Ser Ser Gln His Gln Glu Arg Cys  
 85 90 95

Cys Asn Glu Leu Asn Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Cys Met Cys Glu  
 100 105 110

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

Gln Gln Glu Gln Gln Phe Lys Arg Glu Leu Arg Asn Leu Pro Gln Gln  
 130 135 140

Cys Gly Leu Arg Ala Pro Gln Arg Cys Asp Leu Glu Val Glu Ser Gly  
 145 150 155 160

Gly Arg Asp Arg Tyr  
 165

<210> 15

<211> 143

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO 15 (Ara h 6 isotipo 6.0101, como se expresa en el ejemplo 1)

<400> 15

ES 2 788 389 T3

Met Ser His His His His His His His His Leu Glu Val Leu Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Met Arg Arg Glu Arg Gly Arg Gln Gly Asp Ser Ser Ser  
 20 25 30

Cys Glu Arg Gln Val Asp Arg Val Asn Leu Lys Pro Cys Glu Gln His  
 35 40 45

Ile Met Gln Arg Ile Met Gly Glu Gln Glu Gln Tyr Asp Ser Tyr Asp  
 50 55 60

Ile Arg Ser Thr Arg Ser Ser Asp Gln Gln Gln Arg Cys Cys Asp Glu  
 65 70 75 80

Leu Asn Glu Met Glu Asn Thr Gln Arg Cys Met Cys Glu Ala Leu Gln  
 85 90 95

Gln Ile Met Glu Asn Gln Cys Asp Arg Leu Gln Asp Arg Gln Met Val  
 100 105 110

Gln Gln Phe Lys Arg Glu Leu Met Asn Leu Pro Gln Gln Cys Asn Phe  
 115 120 125

Arg Ala Pro Gln Arg Cys Asp Leu Asp Val Ser Gly Gly Arg Cys  
 130 135 140

<210> 16

<211> 615

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO 17: Ara h 1.01.01 tal como se usa en el ejemplo 3

<400> 16

ES 2 788 389 T3

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

ES 2 788 389 T3

Asn Gln Asn Gly Arg Ile Arg Val Leu Gln Arg Phe Asp Gln Arg Ser  
 180 185 190

Arg Gln Phe Gln Asn Leu Gln Asn His Arg Ile Val Gln Ile Glu Ala  
 195 200 205

Lys Pro Asn Thr Leu Val Leu Pro Lys His Ala Asp Ala Asp Asn Ile  
 210 215 220

Leu Val Ile Gln Gln Gly Gln Ala Thr Val Thr Val Ala Asn Gly Asn  
 225 230 235 240

Asn Arg Lys Ser Phe Asn Leu Asp Glu Gly His Ala Leu Arg Ile Pro  
 245 250 255

Ser Gly Phe Ile Ser Tyr Ile Leu Asn Arg His Asp Asn Gln Asn Leu  
 260 265 270

Arg Val Ala Lys Ile Ser Met Pro Val Asn Thr Pro Gly Gln Phe Glu  
 275 280 285

Asp Phe Phe Pro Ala Ser Ser Arg Asp Gln Ser Ser Tyr Leu Gln Gly  
 290 295 300

Phe Ser Arg Asn Thr Leu Glu Ala Ala Phe Asn Ala Glu Phe Asn Glu  
 305 310 315 320

Ile Arg Arg Val Leu Leu Glu Glu Asn Ala Gly Gly Glu Gln Glu Glu  
 325 330 335

Arg Gly Gln Arg Arg Trp Ser Thr Arg Ser Ser Glu Asn Asn Glu Gly  
 340 345 350

Val Ile Val Lys Val Ser Lys Glu His Val Glu Glu Leu Thr Lys His  
 355 360 365

Ala Lys Ser Val Ser Lys Lys Gly Ser Glu Glu Glu Gly Asp Ile Thr  
 370 375 380

Asn Pro Ile Asn Leu Arg Glu Gly Glu Pro Asp Leu Ser Asn Asn Phe  
 385 390 395 400

Gly Lys Leu Phe Glu Val Lys Pro Asp Lys Lys Asn Pro Gln Leu Gln  
 405 410 415

Asp Leu Asp Met Met Leu Thr Cys Val Glu Ile Lys Glu Gly Ala Leu  
 420 425 430

ES 2 788 389 T3

Met Leu Pro His Phe Asn Ser Lys Ala Met Val Ile Val Val Val Asn  
 435 440 445

Lys Gly Thr Gly Asn Leu Glu Leu Val Ala Val Arg Lys Glu Gln Gln  
 450 455 460

Gln Arg Gly Arg Arg Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Glu  
 465 470 475 480

Gly Ser Asn Arg Arg Glu Val Arg Arg Tyr Thr Ala Arg Leu Lys Glu Gly  
 485 490 495

Asp Val Phe Ile Met Pro Ala Ala His Pro Val Ala Ile Asn Ala Ser  
 500 505 510

Ser Glu Leu His Leu Leu Gly Phe Gly Ile Asn Ala Glu Asn Asn His  
 515 520 525

Arg Ile Phe Leu Ala Gly Asp Lys Asp Asn Val Ile Asp Gln Ile Glu  
 530 535 540

Lys Gln Ala Lys Asp Leu Ala Phe Pro Gly Ser Gly Glu Gln Val Glu  
 545 550 555 560

Lys Leu Ile Lys Asn Gln Lys Glu Ser His Phe Val Ser Ala Arg Pro  
 565 570 575

Gln Ser Gln Ser Gln Ser Pro Ser Ser Pro Glu Lys Glu Ser Pro Glu  
 580 585 590

Lys Glu Asp Gln Glu Glu Glu Asn Gln Gly Gly Lys Gly Pro Leu Leu  
 595 600 605

Ser Ile Leu Lys Ala Phe Asn  
 610 615

<210> 17

<211> 527

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO 18: Ara h 3.01.01 tal como se usa en el ejemplo 3

<400> 17

Met Ser His His His His His His His His Leu Glu Val Leu Phe Gln  
 1 5 10 15

ES 2 788 389 T3

Gly Pro Ser Met Arg Gln Gln Pro Glu Glu Asn Ala Cys Gln Phe Gln  
 20 25 30

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

Tyr Ile Glu Thr Trp Asn Pro Asn Asn Gln Glu Phe Glu Cys Ala Gly  
 50 55 60

Val Ala Leu Ser Arg Leu Val Leu Arg Arg Asn Ala Leu Arg Arg Pro  
 65 70 75 80

Phe Tyr Ser Asn Ala Pro Gln Glu Ile Phe Ile Gln Gln Gly Arg Gly  
 85 90 95

Tyr Phe Gly Leu Ile Phe Pro Gly Cys Pro Arg His Tyr Glu Glu Pro  
 100 105 110

His Thr Gln Gly Arg Arg Ser Gln Ser Gln Arg Pro Pro Arg Arg Leu  
 115 120 125

Gln Gly Glu Asp Gln Ser Gln Gln Gln Arg Asp Ser His Gln Lys Val  
 130 135 140

His Arg Phe Asp Glu Gly Asp Leu Ile Ala Val Pro Thr Gly Val Ala  
 145 150 155 160

Phe Trp Leu Tyr Asn Asp His Asp Thr Asp Val Val Ala Val Ser Leu  
 165 170 175

Thr Asp Thr Asn Asn Asn Asp Asn Gln Leu Asp Gln Phe Pro Arg Arg  
 180 185 190

Phe Asn Leu Ala Gly Asn Thr Glu Gln Glu Phe Leu Arg Tyr Gln Gln  
 195 200 205

Gln Ser Arg Gln Ser Arg Arg Arg Ser Leu Pro Tyr Ser Pro Tyr Ser  
 210 215 220

Pro Gln Ser Gln Pro Arg Gln Glu Glu Arg Glu Phe Ser Pro Arg Gly  
 225 230 235 240

Gln His Ser Arg Arg Glu Arg Ala Gly Gln Glu Glu Glu Asn Glu Gly  
 245 250 255

Gly Asn Ile Phe Ser Gly Phe Thr Pro Glu Phe Leu Glu Gln Ala Phe  
 260 265 270

ES 2 788 389 T3

Gln Val Asp Asp Arg Gln Ile Val Gln Asn Leu Arg Gly Glu Thr Glu  
 275 280 285

Ser Glu Glu Glu Gly Ala Ile Val Thr Val Arg Gly Gly Leu Arg Ile  
 290 295 300

Leu Ser Pro Asp Arg Lys Arg Arg Ala Asp Glu Glu Glu Glu Tyr Asp  
 305 310 315 320

Glu Asp Glu Tyr Glu Tyr Asp Glu Glu Asp Arg Arg Arg Gly Arg Gly  
 325 330 335

Ser Arg Gly Arg Gly Asn Gly Ile Glu Glu Thr Ile Cys Thr Ala Ser  
 340 345 350

Ala Lys Lys Asn Ile Gly Arg Asn Arg Ser Pro Asp Ile Tyr Asn Pro  
 355 360 365

Gln Ala Gly Ser Leu Lys Thr Ala Asn Asp Leu Asn Leu Leu Ile Leu  
 370 375 380

Arg Trp Leu Gly Pro Ser Ala Glu Tyr Gly Asn Leu Tyr Arg Asn Ala  
 385 390 395 400

Leu Phe Val Ala His Tyr Asn Thr Asn Ala His Ser Ile Ile Tyr Arg  
 405 410 415

Leu Arg Gly Arg Ala His Val Gln Val Val Asp Ser Asn Gly Asn Arg  
 420 425 430

Val Tyr Asp Glu Glu Leu Gln Glu Gly His Val Leu Val Val Pro Gln  
 435 440 445

Asn Phe Ala Val Ala Gly Lys Ser Gln Ser Glu Asn Phe Glu Tyr Val  
 450 455 460

Ala Phe Lys Thr Asp Ser Arg Pro Ser Ile Ala Asn Leu Ala Gly Glu  
 465 470 475 480

Asn Ser Val Ile Asp Asn Leu Pro Glu Glu Val Val Ala Asn Ser Tyr  
 485 490 495

Gly Leu Gln Arg Glu Gln Ala Arg Gln Leu Lys Asn Asn Asn Pro Phe  
 500 505 510

Lys Phe Phe Val Pro Pro Ser Gln Gln Ser Pro Arg Ala Val Ala  
 515 520 525

## REIVINDICACIONES

1. Un vehículo útil para el diagnóstico que comprende un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8, en una muestra de un sujeto,
- 5 en el que el vehículo se selecciona del grupo que comprende una perla, una tira de prueba, una placa de microtitulación, una micromatriz, un polímero sólido derivado de la celulosa, un análisis por transferencia del grupo que comprende el análisis por transferencia de línea y el análisis por transferencia de punto, una superficie de vidrio, un portaobjetos y un biochip, y lo más preferentemente, es una placa de microtitulación o un análisis por transferencia de líneas,
- 10 en el que el medio para capturar específicamente un anticuerpo es un polipéptido que comprende o que consiste en un antígeno al que se une el anticuerpo a capturar o detectar o una variante del mismo que tiene actividad de unión a anticuerpo.
2. El vehículo útil para el diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el vehículo comprende además un medio para capturar específicamente un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales del grupo que comprende Ara h 2, Ara h 6, Ara h 1, Ara h 3, Ara h 9, Ara h 8 y Ara h 5, más preferentemente del grupo que comprende Ara h 2, Ara h 6, Ara h 1, Ara h 3, Ara h 9, más preferentemente, un anticuerpo contra Ara h 2 y/o un anticuerpo contra Ara h 6, más preferentemente un anticuerpo contra Ara h 2.
- 15 3. Un kit que comprende el vehículo útil para el diagnóstico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, así como un medio para detectar específicamente un anticuerpo capturado.
- 20 4. El kit según la reivindicación 3, en el que los medios para capturar específicamente un anticuerpo para el epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201 en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8 y los medios para capturar específicamente un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales están en vehículos separados o
- 25 en el que los medios para capturar específicamente un anticuerpo para el epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201 en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8, y los medios para capturar específicamente un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales están en uno,
- 30 preferentemente, unidos covalentemente a un vehículo.
5. Un procedimiento para el diagnóstico de una alergia al cacahuete que comprende la etapa de detectar en una muestra de un sujeto la presencia de un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201, en el que el extremo C-terminal consiste en la SEQ ID NO 6 y en el que el epítipo comprende la SEQ ID NO 8.
- 35 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además la etapa de detectar en una muestra de un sujeto la presencia de un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales, preferentemente seleccionados del grupo que comprende Ara h 2, Ara h 6, Ara h 1, Ara h 3, Ara h 9, Ara h 8 y Ara h 5, más preferentemente del grupo que comprende Ara h 2, Ara h 6, Ara h 1, Ara h 3 y Ara h 9, más preferentemente, Ara h 2 y/o Ara h 6.
- 40 7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, en el que la presencia de un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201 que comprende la SEQ ID NO 8 y la presencia de un anticuerpo contra uno o más antígenos adicionales, preferentemente Ara h 2 y/o Ara h 6, se detecta de manera simultánea.
- 45 8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la presencia de un anticuerpo contra un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201 que comprende la SEQ ID NO 8 y la presencia de un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales se detectan en reacciones de unión separadas espacialmente.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que la presencia de un anticuerpo para un epítipo del extremo C-terminal de Ara h 7 isotipo 7.0201 que comprende la SEQ ID NO 8 y la presencia de un anticuerpo para uno o más antígenos adicionales se detectan en una reacción one-pot.
- 50 10. El vehículo, kit o procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo para el isotipo 7.0201 es un anticuerpo monoespecífico para la SEQ ID NO 6, más preferentemente, una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, lo más preferentemente, la SEQ ID NO 8.
- 55 11. Un uso de un polipéptido que comprende la SEQ ID NO 8, más preferentemente una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 6, la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, más preferentemente, la SEQ ID NO 6, más preferentemente, Ara h 7 isotipo 7.0201 o una variante del mismo que se une a un anticuerpo contra Ara h 7 isotipo 7.0201 de un sujeto alérgico al cacahuete, en el que el polipéptido es recombinante, inmovilizado, purificado o una proteína de fusión, preferentemente purificada y recombinante e inmovilizada, el vehículo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o el kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 para aumentar la sensibilidad del diagnóstico de alergia al cacahuete.

- 5 12. Un uso de un polipéptido que comprende la SEQ ID NO 8, más preferentemente una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 6, la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, más preferentemente, la SEQ ID NO 6, más preferentemente, Ara h 7 isotipo 7.0201 o una variante del mismo que se une a un anticuerpo contra Ara h 7 isotipo 7.0201 de un sujeto alérgico al cacahuete, en el que el polipéptido es recombinante, inmovilizado, purificado o una proteína de fusión, preferentemente purificada y recombinante e inmovilizada, para la fabricación de un kit para el diagnóstico de alergia al cacahuete.
- 10 13. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en el que el polipéptido que comprende la SEQ ID NO 8, más preferentemente una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 6, la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, más preferentemente, la SEQ ID NO 6, lo más preferentemente, Ara h 7 isotipo 7.0201 o una variante del mismo que se une a un anticuerpo contra Ara h 7 isotipo 7.0201 de un sujeto alérgico al cacahuete está en una composición que comprende dicho polipéptido y Ara h 2 y/o Ara h 6 o una variante del mismo que se une a un anticuerpo contra Ara h 2 o Ara h 6 de un sujeto alérgico al cacahuete, respectivamente.
- 15 14. Un anticuerpo, preferentemente anticuerpos de clase IgE, IgG1 e IgG4, que se unen específicamente a la SEQ ID NO 6, más preferentemente, una secuencia del grupo que comprende la SEQ ID NO 7, la SEQ ID NO 8, la SEQ ID NO 9 y la SEQ ID NO 10, más preferentemente a la SEQ ID NO 8, cuyo anticuerpo está preferentemente aislado.
- 15 15. Un uso del anticuerpo según la reivindicación 14 para el diagnóstico de alergia al cacahuete o para la fabricación de un kit para el diagnóstico de alergia al cacahuete.

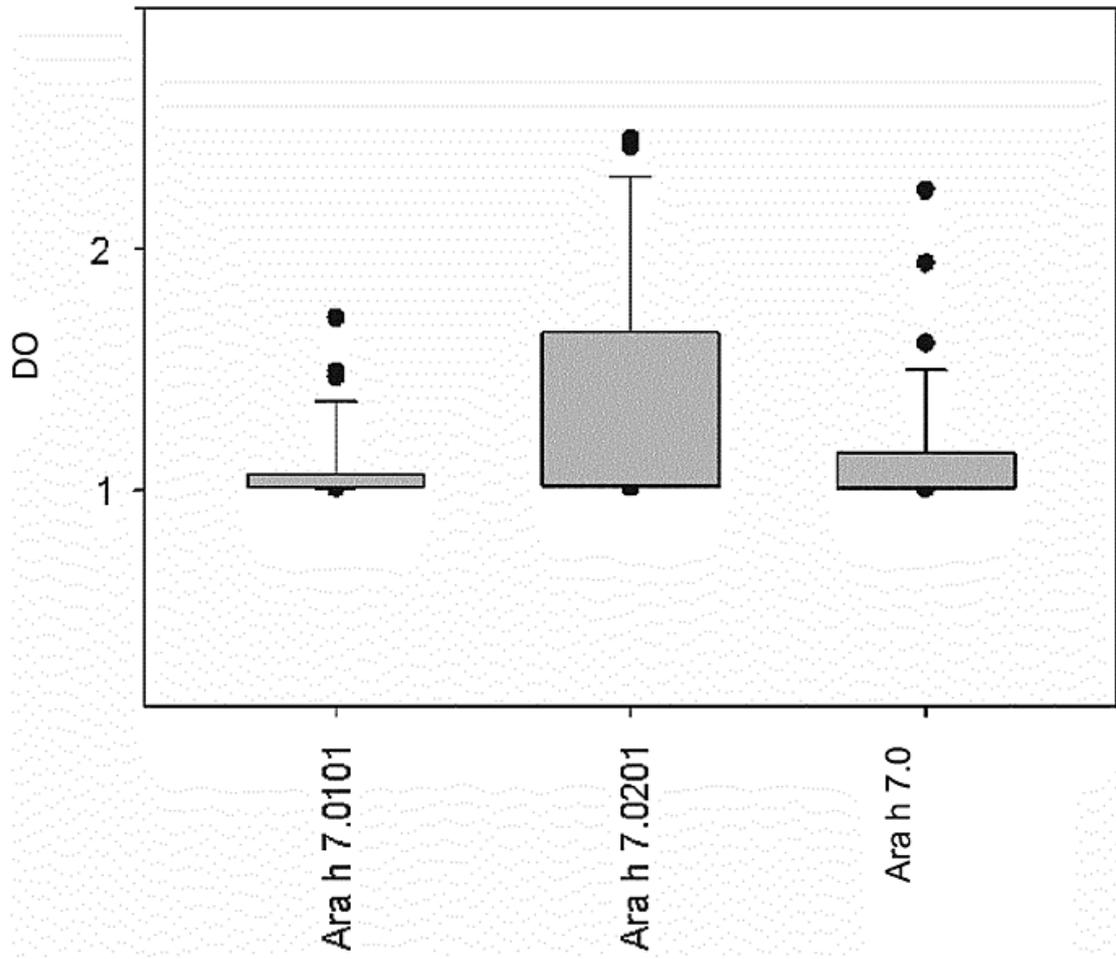


Fig. 1

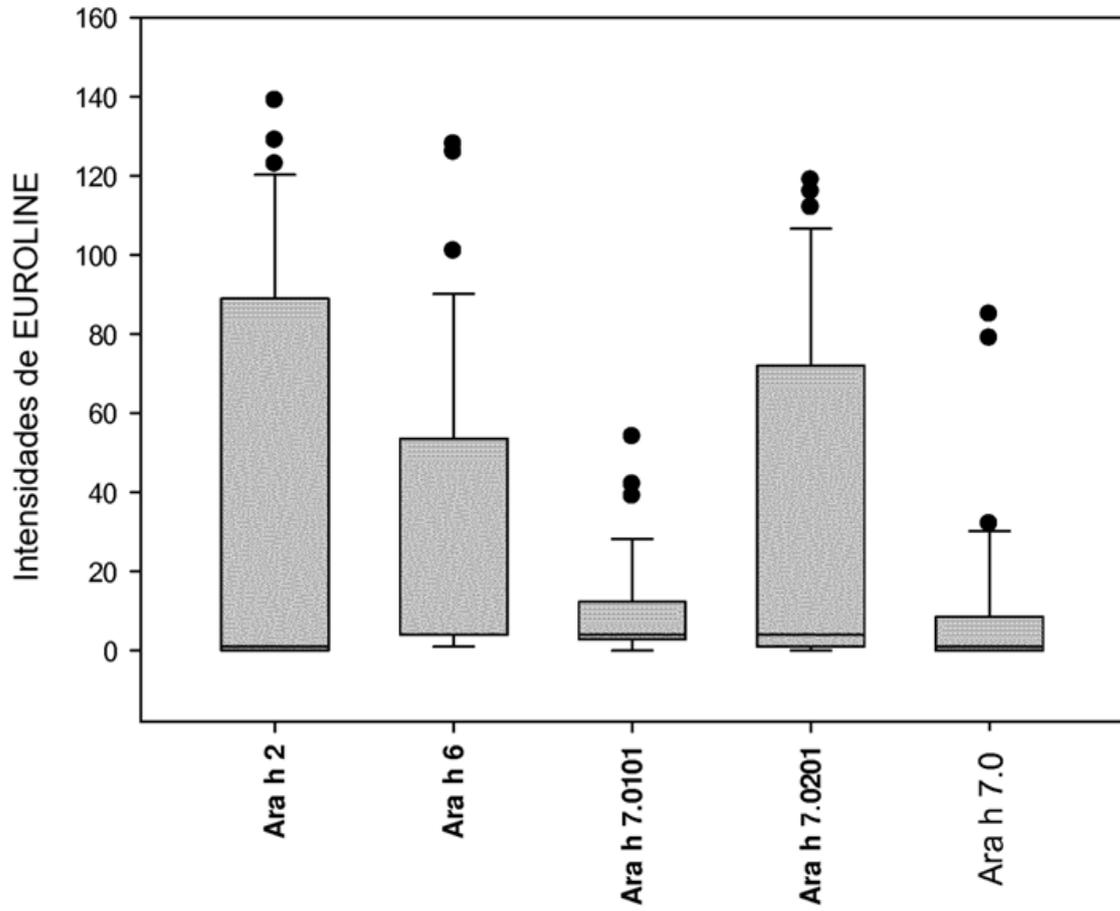
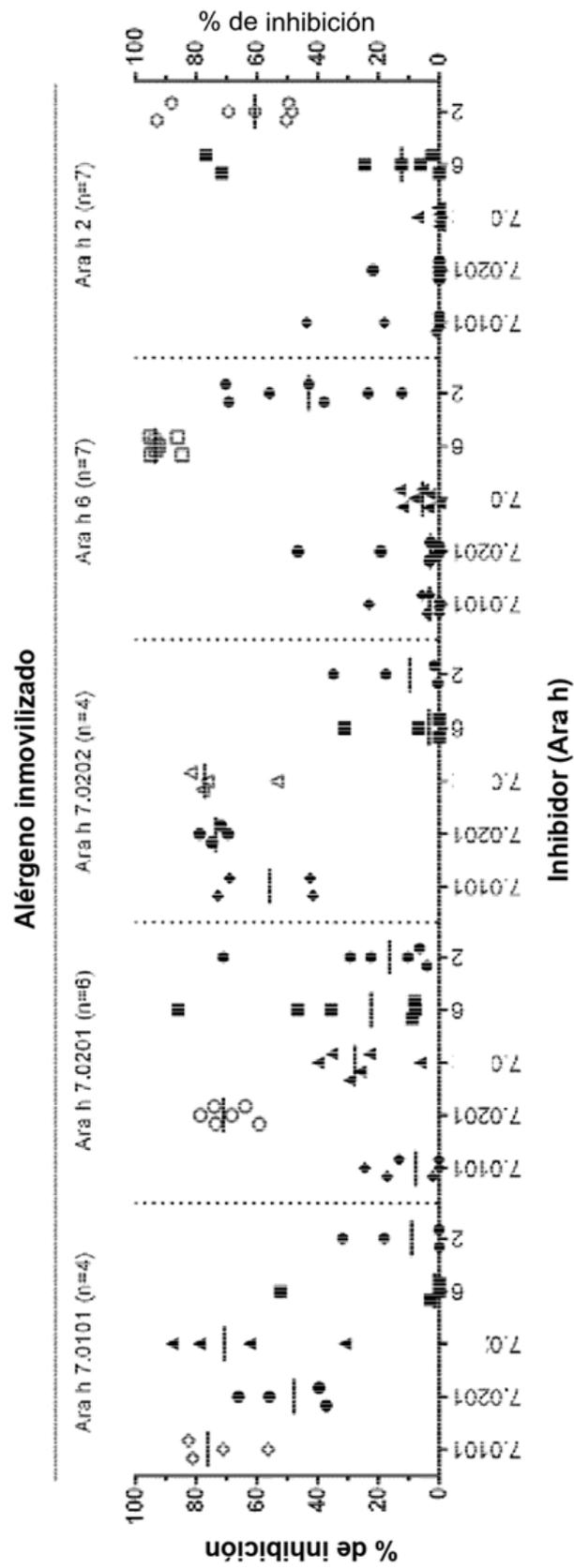


Fig. 2



**Fig. 3**

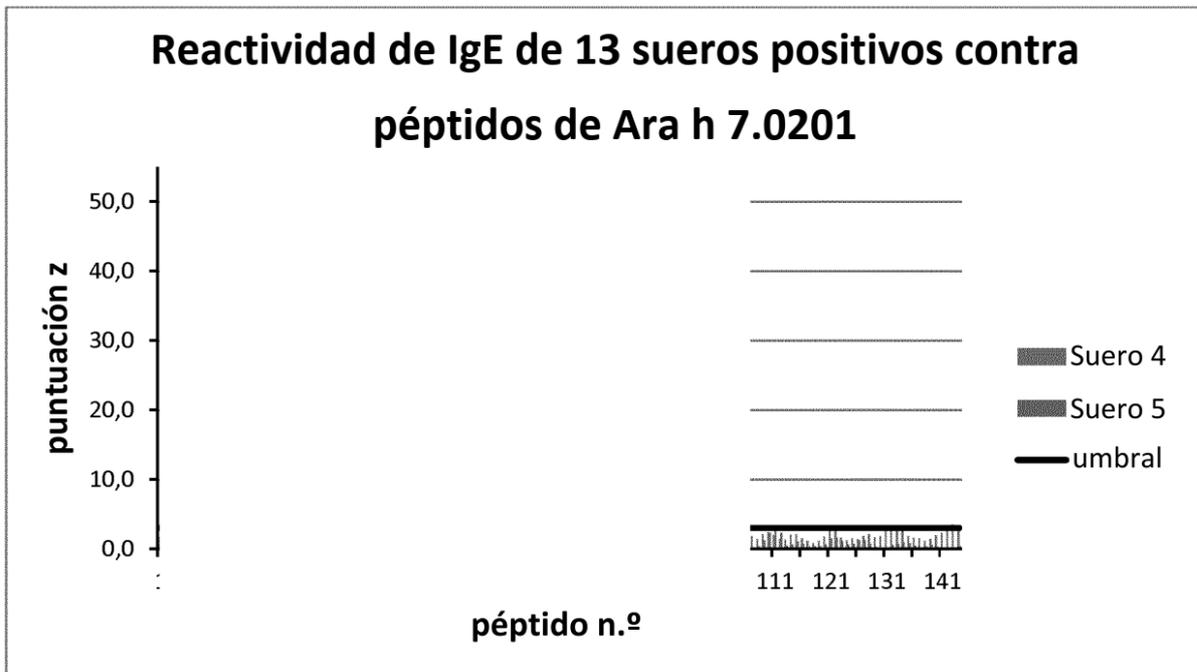
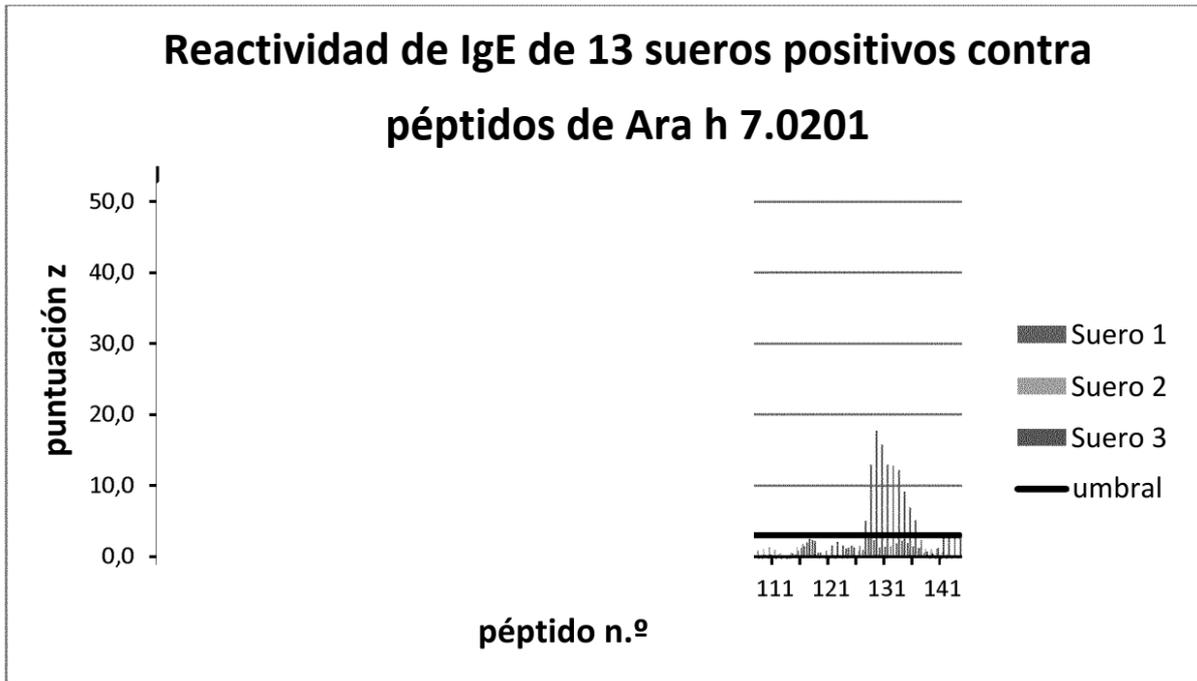


Fig. 4