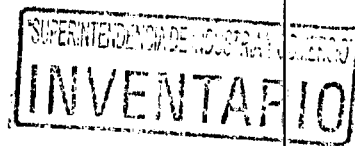




Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



10-24590

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: MÉTODO Y COMPOSICIÓN INMUNOQUÍMICA PARA LA
DETECCIÓN DE ALÉRGENOS DE ÁCAROS USANDO ANTICUERPOS
POLICLONALES IgY

SOLICITANTE: FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DEL NORTE

DIRECCIÓN: Km. 5 Antigua vía a Puerto Colombia, Puerto Rico Colombia

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 02 de Marzo de 2010

(Escriba, M. E. L. L.)

P2010/000027

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-024590-00000-0000

Fecha: 2010-03-02 16:57:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 2 PATENTES Eve. 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 44

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

P2010/000027

SOLICITUD DE:

1



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: FUNDACIÓN UNIVERSIDAD
DEL NORTE (folio 71)

Dirección: Km. 5 Antigua vía a Puerto
Colombia, Puerto Rico Colombia

Nacionalidad o Domicilio: Colombiana

Lugar de Constitución: Colombia

Teléfono: _____ **Fax:** _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center, Calle 100 No.
8A-37 Torre A, Piso 10

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747 Btá
TP 74.295

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Eduardo Egea, Luis Alejandro Barrera, Johana Espejo
Elkin Navarro, Gloria Garavito, Dary Luz Mendoza

Dirección: Km. 5 Antigua vía a Puerto Colombia, Puerto Pico Colombia y
Bogotá

Nacionalidad o Domicilio: Colombianos

5

**Título (54) MÉTODO Y COMPOSICIÓN INMUNOQUÍMICA PARA LA DETECCIÓN
DE ALÉRGENOS DE ÁCAROS USANDO ANTICUERPOS POLICLONALES IgY**

6

Clasificación Internacional (51) _____

7

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

CO

CO

(32) Fecha

Marzo 17, 2009

Enero 30, 2009

(31) Número de Solicitud

09-027540

09-008859

8

Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los:

6 meses ☐ 12 meses ☒ 18 meses ☐ otro ☐ cual _____

9

Comprobante de pago No. 10-

Fecha 02 de Marzo de 2010

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica. *Adjunto copia simple. Ver Expediente 112 09-008-859.*

☒

Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple. Ver Exp. N° 09-008.859

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

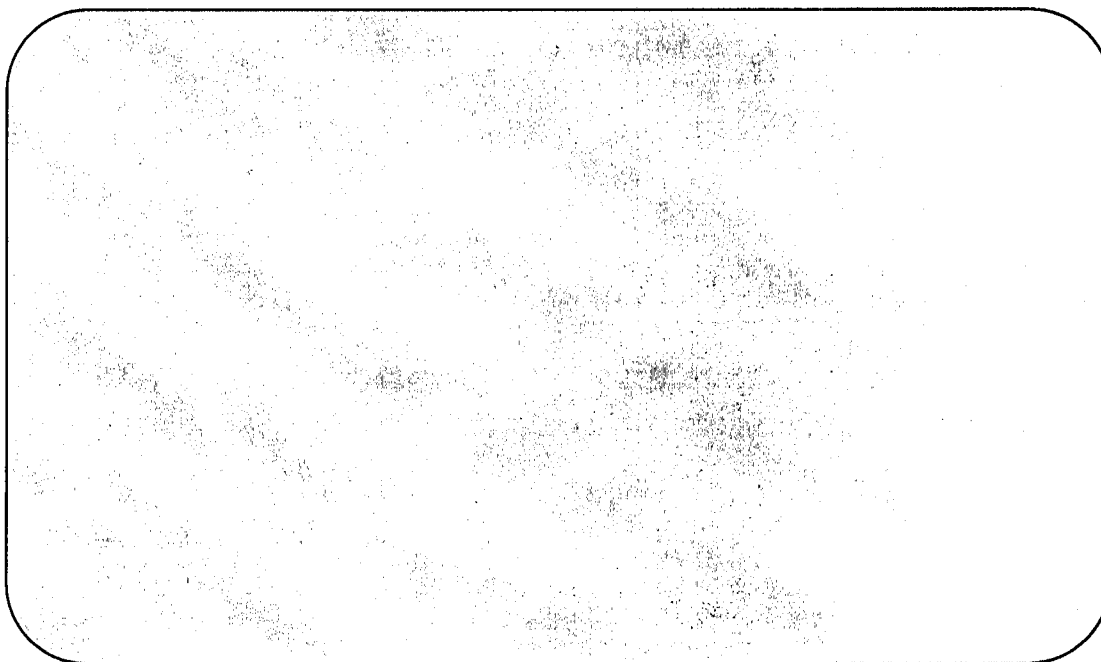
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☐

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS P. OLARTE

FIRMA:

[Signature]
C.C. 79.782.747 Etá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 16,423
FECHA : MARZO 2 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-024590- -00000-0000

Fecha: 2010-03-02 10:57:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 44

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARTE RAISREX	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175552381	01/03/2010	554,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro
Alexander Agudelo
Lina Mosquera
Carolina Barbatelano
Angela Correa
Erika Rico
Carlos A. Parra
Carolina Romero
Andrés Alvarado
Gina Arias

Of Counsel
Guillermo Chahin
Graciela Melo
Jacqueline Chaparro
Cruz B. de Moncalcano

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DEL NORTE

Km 5 Antigua vía a Puerto Colombia. Puerto Colombia (Colombia)

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications, collect refunds, desist, settle, conciliate or negotiate. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

El suscrito,

domiciliado en

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado; elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir, transigir, y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas constituciones.

Signature/Firma: ALMA LUCIA DIAZGRANADOS MELENDEZ

Date/Fecha: 30/OCT/2008

City/Country/Ciudad,País: Barranquilla, Colombia

**COMPARECENCIA PERSONAL Y
AUTENTICACIÓN DE FIRMA - ARTICULO 84 C.P.C.**

El notario Quinto de Barranquilla. DA FE que el anterior
escrito dirigido a:

Fue Presentado personalmente por: Alma
Lucia Diaz Granados Melendez

Quien exhibió la
36.561904 de sta Marta

T.P. No. _____ Y manifestó:

Que la presente firma fue colocada personalmente por él
y acepta el contenido del mismo como cierto y verdadero
Barranquilla.

FIRMA AUTÓGRAFA

NOTARIO QUINTO DE BARRANQUILLA



A SOLICITUD DEL USUARIO LA SUSCRITO LA
NOTARIA (O) GENTILICIA QUE EN SU
PRESENCIA EL OTORGANTE ESTAMPO EN ESTE
DOCUMENTO LA HUELLA DACTILAR
DEL DEDO INDICE DE SU MANO DERECHA.

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

On this date,
29/OCTOBER/2008

The undersigned Notary Public certifies:

1. That

ALMA LUCÍA DIAZ GONZALEZ MELENDEZ
of legal age and domiciled in
Km 5 Antigua vía a Puerto Colombia, Puerto Colombia, Atlántico (Colombia)
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing
document as **LEGAL REPRESENTATIVE**

of **FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DEL
NORTE**.

3. That **FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DEL
NORTE**

having its principal place of business located in
**PUERTO COLOMBIA, ATLÁNTICO,
COLOMBIA**

is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the Power of Attorney is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the
Power of Attorney and that his/her representation is
legal.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

CERTIFICATE OF EXISTENCE AND LEGAL
REPRESENTATION FROM (GOVERNORSHIP OF
ATLÁNTICO)

NOTARY PUBLIC (Signature):

ROSALBA FUEDA DE JORDÁN (Notaria Quinta del Círculo de Barranquilla)

Certificación Notarial

En esta fecha,
29 de Octubre de 2008

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

ALMA LUCÍA DIAZ GONZALEZ MELENDEZ
mayor de edad y domiciliado
suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de **REPRESENTANTE
LEGAL**

de **FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DEL
NORTE**

3. Que **FUNDACIÓN UNIVERSIDAD
DEL NORTE**

con sede principal ubicada en
**PUERTO COLOMBIA, ATLÁNTICO,
COLOMBIA**

está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para
suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas
en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del)
siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

CERTIFICACIÓN DE PERSONERÍA JURÍDICA
OTORGADA POR LA GOBERNACIÓN DEL ATLÁNTICO.

6

Inventores: Egea Eduardo, Luis Alejandro Barrera, Johana Espejo, Elkin Navarro, Gloria Garavito y Dary Luz Mendoza

Fecha de Prioridad:

Fecha de presentación Internacional:

Título:

METODO Y COMPOSICIÓN INMUNOQUIMICA PARA LA DETECCIÓN DE ALÉRGENOS DE ÁCAROS USANDO ANTICUERPOS POLICLONALES IgY

Breve Descripción del Invento

La presente invención corresponde a un método para la obtención de una composición de anticuerpos policlonales IgY útil como reactivo de diagnóstico de bajo costo y alta reactividad, frente a ácaros intradomiciliarios, y a un método para la detección de alérgenos de ácaros que emplea la composición de anticuerpos IgY desarrollada en el primer método. La presente invención también comprende a la composición como tal de los anticuerpos policlonales IgY.

El primer método de la presente invención, permite obtener de manera reproducible y a un bajo costo una composición de anticuerpos policlonales IgY capaces de reconocer un amplio espectro de alérgenos de ácaros intradomiciliarios pertenecientes a la familia de las cistein proteasas.

El segundo método permite las determinaciones de los niveles totales de alérgenos en muestras provenientes de ambientes intramuros que estén contaminados y colonizados por ácaros intradomiciliarios. El nivel de alérgenos se determina por la medición de cambios en las propiedades biofísicas de los reactantes en sistemas de identificación a través de mecanismos inmunoquímicos cuando se comparan con estándares de referencia.

Estado de la Técnica

1.1 Los Alérgenos

- 5 Los alérgenos son moléculas, generalmente de naturaleza proteica, que en individuos atópicos, el sistema inmunitario las reconoce como "extrañas" diferentes al polimorfismo antigénico propio, induciendo una respuesta inmune adaptativa exagerada tipo Th2 con la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13, promoviendo en los linfocitos B la producción de altas cantidades de anticuerpos IgE alérgeno-específicas, que en posteriores contactos al mismo inmunógeno producirá la liberación
- 10 de mediadores químicos, en particular la histamina, que producirán los síntomas típicos de la reacción alérgica. En general las proteínas alergénicas exhiben dos o tres propiedades moleculares distintas: la propiedad de sensibilizar, es decir inducir al sistema inmunológico a producir una respuesta inmune adaptativa de anticuerpos IgE de alta afinidad; y la capacidad para provocar una respuesta inflamatoria alérgica, es decir desencadenar síntomas y signos
- 15 característicos de las enfermedades alérgicas en individuos previamente sensibilizados. Adicionalmente un alérgeno tiene la propiedad de unir anticuerpos IgE específicos. Un alérgeno es una proteína que comúnmente induce una respuesta inmune exagerada mediada por anticuerpos IgE en individuos genéticamente predispuestos. (1)
- 20 Los análisis de la base de datos de proteínas sugieren que el universo de los alérgenos abarca más de 120 familias distintas de proteínas. (2) Muchas proteínas pueden tener actividad biológica que influencia la respuesta inmune. Sin embargo, la mayoría de alérgenos purificados no tienen efectos sobre la piel, tracto digestivo, nariz, y otros, en individuos no alérgicos. (3)
- 25 Los alérgenos se derivan de proteínas con una variedad de funciones biológicas, incluyendo enzimas, proteínas de unión, proteínas estructurales, proteínas de transferencia de lípidos, profilinas, proteínas de unión a calcio, y otros. La función biológica de las enzimas proteolíticas de los ácaros del polvo intradomiciliario, influyen directamente el desarrollo de las respuestas de IgE y pueden iniciar procesos inflamatorios en el pulmón y otros órganos diana a las cuales se asocia el asma. Las características estructurales o biológicas pueden también influenciar el
- 30 tiempo que los alérgenos persisten en los ambientes interiores y al aire libre, así como la conservación de su alergenidad en el tracto digestivo. (4)

1.2 Características moleculares de las proteínas alergénicas

La estructura molecular de las proteínas alergénicas, presentan regiones inmunodominantes, denominadas epítopes, las cuales interactúan con los fragmentos de unión al antígeno (Fab) de los anticuerpos IgE específicos. Los complejos inmunes Fab-alérgeno, tienen entre 15 a 22 residuos de aminoácidos. De éstos sólo de 3 a 5 residuos contribuyen al proceso de unión a través de múltiples enlaces complementarios de tipo no covalente, originados por fuerzas electrostáticas, principalmente de tipo van der Waals. (5-7)

- 10 A la fecha se investiga ampliamente para determinar si las características intrínsecas de los epítopes se encuentran relacionadas con su capacidad alergénica. Es decir, si su complejidad molecular (secuencia de aminoácidos, estructura secundaria, y tipo de plegamiento), así como su solubilidad, la estabilidad, el tamaño y la actividad bioquímica de un alérgeno, promueven las condiciones inmunológicas necesarias para la sensibilización del sistema inmunológico del huésped, la interacción con anticuerpos IgE y la inducción de las reacciones alérgicas (alergenicidad). (8)

Alérgenos de los ácaros del polvo intradomiciliarios

- 20 Los ácaros son pequeños artrópodos pertenecientes a la clase *Arácnida*, poseen cuatro pares de patas, ausencia de segmentación del cuerpo y carencia de antenas. Estos se encuentran distribuidos por todo el mundo, adaptados a vivir en diversos medios. Entre las numerosas especies se encuentran aquellos que viven en el polvo de las casas y basan su nutrición en detritus humano y animal (9).

25

- Dermatophagoides pteronyssinus* es la especie de ácaros intradomiciliarios más importante en Europa Occidental, Australia, Inglaterra y Nueva Zelanda. *Dermatophagoides farinae* es el ácaro predominante en los Estados Unidos y Japón, aunque *D. pteronyssinus* es el más prevalente en algunas regiones de estos países. (10-11), pero la infestación con una u otra especie de ácaro depende no solo de la ubicación geográfica, sino también de las condiciones ambientales de cada hogar. El ácaro *Blomia tropicalis* es importante en regiones tropicales y subtropicales particularmente en Suramérica y el Sureste Asiático. (12). Las especies del género *Dermatophagoides* y del género *Blomia* son evolutivamente dispares y por lo que presentan baja

9

reactividad cruzada en sus proteínas, debido a que presentan secuencias aminoacídicas disímiles.
(13)

Estos artrópodos son organismos complejos que producen miles de proteínas diferentes y otras macromoléculas. Se han caracterizado hasta el momento más de 21 grupos de alérgenos en
5 nueve especies de ácaros diferentes, y se han clasificado de acuerdo a su identidad bioquímica.
(12-14)

El primer alérgeno de ácaros descrito fue Der p 1 de *Dermatophagoides pteronyssinus* (15). Der f 1 fue después caracterizado por diversos investigadores. (15) Der p 1 fue también el primer
10 alérgeno con el que se desarrolló un análisis con ADNc. (16) El análisis del ADNc reveló que ellas eran cistein proteasas de la misma familia de la papaína y actinidina. (17-18)

El grupo de alérgenos 1 ha sido identificado como alérgenos mayores a partir de estudios con extractos alérgénicos. Estos unen IgE de sujetos alérgicos a los ácaros con alta frecuencia. (19)
15 Estas proteínas están presente en heces de los ácaros en altas concentraciones. Se ha propuesto que la actividad proteolítica de estas cistein proteasas aumenta su capacidad de sensibilizar seres humanos. (20) La IgE dirigida contra Der p 1 está notablemente en un rango del 50 – 70% en el suero de estos mismos pacientes alérgicos. (12) Se ha confirmado una reactividad similarmente alta para Der f 1. (22)

20 La IgE específica para anti –alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* comprende del 6- 21% del la IgE total. (23-24)

25 ***Las Cisteína proteasas de ácaros intradomiciliarios. Características biológicas y moleculares***

Las proteasas se agrupan en clanes y familias. Los clanes son grupos de familias para quienes hay evidencia de ascendencia común. Las familias son agrupadas por su tipo catalítico: A, aspartato; C, cisteína; G, ácido glutámico; S, serina; T, treonina; y U, desconocido. Las serin,
30 treonin y cistein proteasas utilizan en su sitio activo un aminoácido nucleófilo y forman un estado intermediario acil y pueden también actuar fácilmente como transferasas. (25)

La cistein proteasa del ácaro *D. pteronyssinus* (Der p 1) es una proteína de 25 Kda, codificado

por un único gen, que presenta frecuentes polimorfismos, los cuales han sido ya secuenciados. (26) Tiene una variación prevalente de la secuencia alanina - valina en la posición 124 y aparecen variaciones esporádicas que difieren en 2 – 3 residuos. (27-29)

- 5 El marco abierto de lectura codifica un péptido señal de 18 aa, un pro-péptido de 80 aa, y la región de la proteína madura abarca 222 aa. La secuencia incluye cuatro sitios de potencial N-glicosilación, tres en la secuencia madura y uno en el pro-péptido. Der p 1 es producida como una enzima inactiva, que se activa después de la separación del pro-péptido. Aparte de inhibir la actividad de la pro-enzima, el pro-péptido puede también actuar como plataforma de
- 10 plegamiento para la maduración de Der p 1, según lo sugerido para otras proteasas. Cuando Der p 1 se extrae de las heces del ácaro, está presente en la forma madura (nDer p 1). (30-31)

- Las cistein proteasas se dividen en cinco clanes, cada una contiene a un número de familias, agrupadas basados en la arquitectura de su díada o triada catalítica. Der p 1 pertenece al clan CA,
- 15 a la familia C1, que también incluye a la papaína y a sus parientes. Las estructuras cristalinas de la papaína y de varias proteasas estrechamente relacionadas de esta misma familia, han sido determinadas, y los residuos catalíticos se han identificado como Cys, His, y Asn. Además, un residuo conservado de Gln es esencial para la actividad catalítica y se cree que ayuda a formar el agujero del oxianionico, el cual estabiliza el estado transitorio durante la catálisis. (32)

20

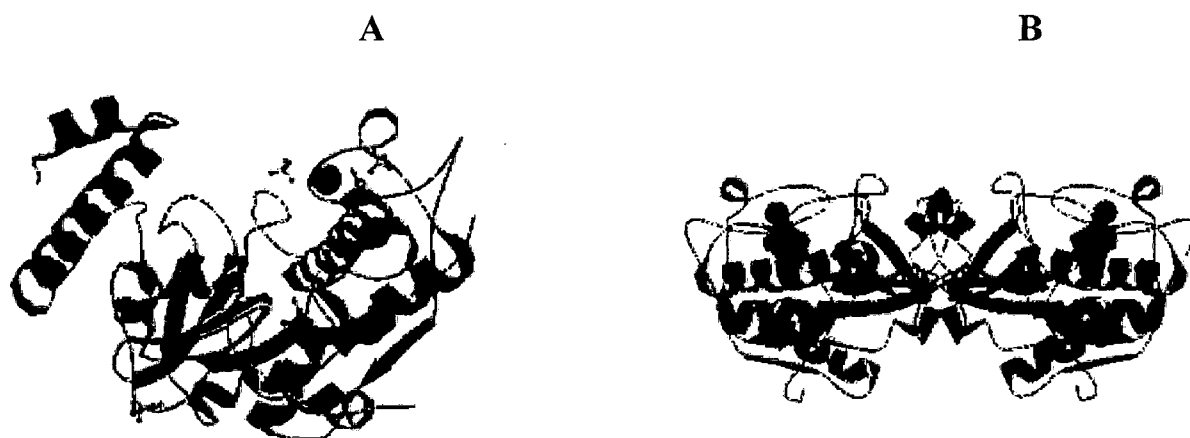


Fig. 1.. Estructura biológica Der p 1 **A.** proDer p 1 y **B** Der p 1 maduro y completamente activo.(33) Fuente de libre acceso : PDB.

25

Los residuos catalíticos Cys e His se piensa forman un Ion thiolato-imidazolium estabilizado por

un puente de Hidrógeno directo entre las cadenas laterales de los residuos catalíticos His y Asn.
(34)

La mayoría de los miembros de la familia C1 tienen pro-péptidos homólogos al de la papaína (115 aa), aunque la longitud puede variar. Se estima que el pro-péptido actúa ocultando el sitio activo y blindándolo del acceso a los sustratos, de tal modo que inhibe la actividad enzimática. La proteólisis del mismo es evitada ligando el pro-péptido en la orientación reversa comparada con la de un sustrato. El pro-péptido de Der p 1 tiene solo 17 residuos idénticos al ser alineada su secuencia con el propéptido de la papaína. (35)

La estructura secundaria de la cistein proteasa del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* está constituida en un 28% por hélices alfa (8 hélices; 63 residuos) y el 23% por laminas beta (18 hojas; 53 residuos) con diversos enlaces disulfuro que estabilizan la proteína. (Ver Figura 2)

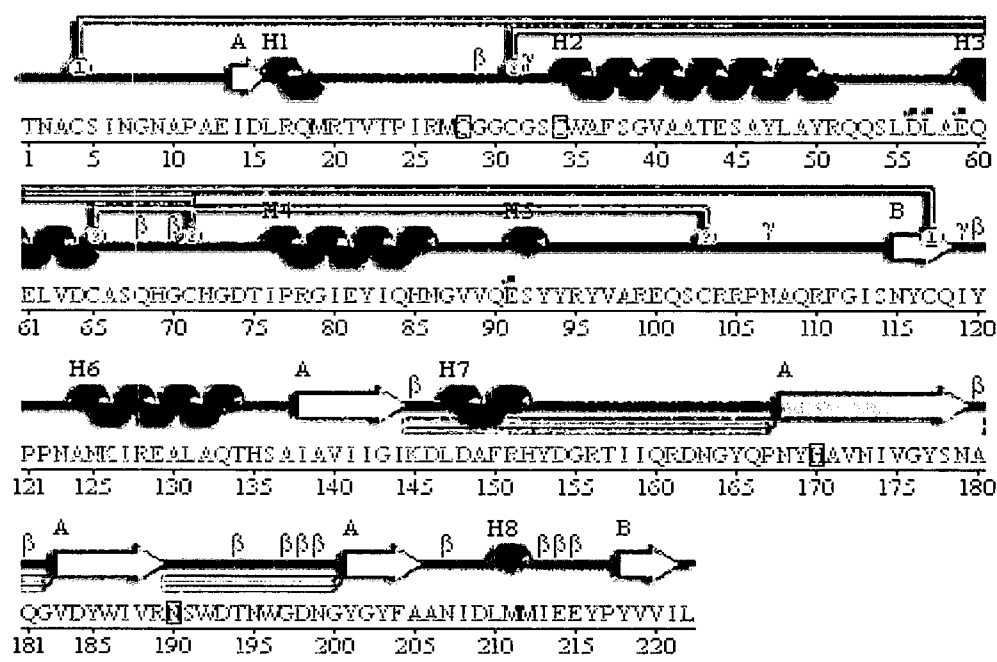
Epítopes Moleculares De La Proteína Der P 1.

La región entre los aminoácidos 15 – 33 de la proteína madura es accesible a la interacción con paratopes de anticuerpos IgE, pero es relativamente extendida y podría constituir epítopes discontinuos con partes de la región entre los aminoácidos 188 – 199. La región 34 – 47, la cual contiene residuos de cisteína catalíticos, es una hélice enterrada en el interior de la molécula. El segmento que comprende los residuos 52 – 111 está bien expuesta sobre la superficie y podría ser subdivida en pequeños segmentos: 52 – 56, 60 – 80, 81-94, y 101 – 111, correspondiendo a epítopes lineales o epítopes discontinuos. El epítope 81 – 94 consiste de dos epítopes continuos separados por los aminoácidos 101 – 111, y este mismo es también expuesto a la superficie y constituye un epítope lineal ideal, al igual que el epítope 117 – 133. La región 155 – 175 está parcialmente enterrada en la interfase de un dímero y puede ser parte de un epítope discontinuo con el segmento adyacente 176 – 187, o con parte del segmento 60 – 80. Finalmente, la región 188 – 199 es suficientemente compacta para constituir un epítope lineal o combinado con 15 – 33. Hay variaciones en todos los epítopes descritos comparados con Der f 1 y Eur m 1 con la excepción de la región 60 – 80, la cual está completamente conservada con respecto a Der f 1.
(33)

Se han reportado por lo menos 12 isoformas de Der p 1 (36). Los residuos aminoacídicos dentro

del propéptido median su asociación a la membrana, y desempeñan un papel en el transporte de la proenzima a los lisosomas. (37-38)

El grupo 1 de ácaros intradomiciliarios está constituido por las cistein proteasas de cada una de las diferentes especies de ácaros. Estas proteínas provocan síntomas clínicos claros en >80% pacientes alérgicos a los ácaros. Se han caracterizado hasta el momento las cistein proteasas de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1), *Dermatophagoides farinae* (Der f 1), *Blomia tropicalis* (Blo t 1), *Dermatophagoides microceras* (Der m 1) y *Euroglyphus maynei* (Eur m 1) (13). Entre las proteínas que producen síntomas clínicos se destacan las cistein proteasas Der p 1, que es positiva en el 92% de los pacientes alérgicos a los ácaros por RAST (39) y Der f 1 que en el 87% de los pacientes alérgicos a ácaros, elicit anticuerpos IgE contra Der f 1. (40)



Claves:

- Motivos: β giro beta γ giro gamma $\equiv$ vuelta beta
- Disulfuros: Enlace Disulfuro
- Anotación: Residuo Catalítico
- Residuos en contacto: con metales

Fig. 2. Estructura secundaria de Der p 1 completamente activo. (33) Fuente de libre acceso: PDB.

Estas cistein proteasas han sido implicadas en enfermedades humanas como cáncer, artritis reumatoide, osteoporosis y enfermedad de Alzheimer's. (41) Por esta razón consideramos a las cistein proteasas de ácaros intradomiciliarios como moléculas blanco para el diseño de estrategias encaminadas al diagnóstico, tratamiento, y control de enfermedades alérgicas. (42)

Reactividad cruzada entre cistein proteasas

El fenómeno de reactividad cruzada ocurre cuando anticuerpos IgE, originalmente aumentados para un alérgeno, se unen o reconocen un epítipo (fracción) en una proteína similar de un recurso diferente. La interacción con tales proteínas homólogas puede desencadenar reacciones alérgicas o puede ser completamente irrelevante para el paciente. (43-45)

El grupo 1 de ácaros intradomiciliarios comparten características estructurales, que permite agruparlas dentro del clan CA, en la familia C1, que también incluye a la papaína, catepsinas de mamíferos (B, C, F, H, L, K, O, S, V, X y W) y a sus parientes. Estas proteínas poseen dominios muy conservados (ver Figura 3) que hacen que estas proteínas alergénicas sean reconocidas por anticuerpos IgE de pacientes sensibilizados contra cistein proteasas de un recurso diferente. Es decir estas proteínas presentan reactividad cruzada entre si, por lo que un grupo muy diverso de recursos pueden elicitar síntomas alérgicos comunes. (46-47) Se ha comprobado que Der p I y Der f I tienen reactividad cruzada superior al 80 %. (48-49).

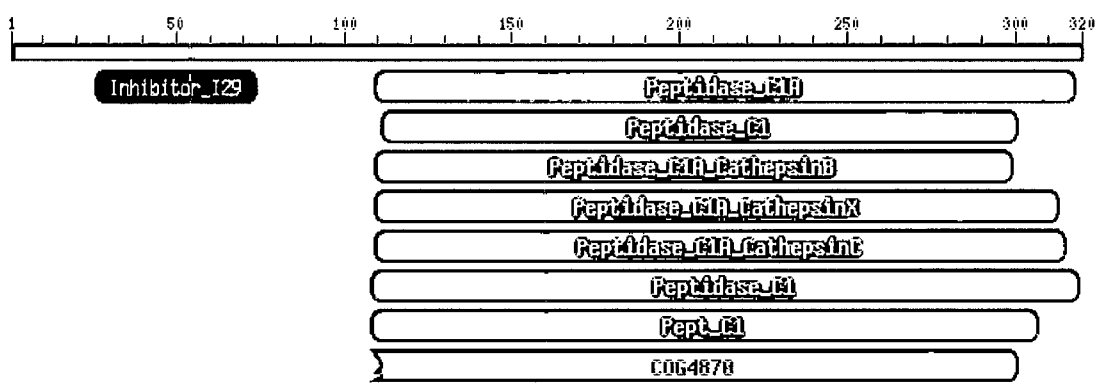


Fig 3. Dominios Conservados de pro Der p 1. (50) Fuente de libre acceso: NCBI.

Entre otros recursos relevantes con reactividad cruzada con el grupo 1 de ácaros intradomiciliarios tenemos a las catepsinas, un grupo de exopeptidasas lisosomales expresadas en todos los tejidos humanos, involucrada en la degradación de proteínas, procesamiento de antígenos, activación de proenzimas y en procesos apoptóticos. (51-52). Las catepsinas de plantas las cuales son utilizadas en la movilización de proteínas de reserva. (53-55)

Respuesta inmune a las cistein proteasa

- 10 Aunque hay una comprensión creciente de los mecanismos implicados en el desarrollo de la inflamación alérgica, una vez la sensibilización ha ocurrido, los mecanismos de la interacción entre Der p 1 y las poblaciones celulares de la vía aérea y su papel en el proceso de sensibilización siguen siendo confusos. (56)

- 15 El epitelio bronquial es la primera barrera encontrada por los antígenos inhalados, esta proporciona un acoplamiento importante entre el medio externo y el interior del cuerpo. La activación de células dendríticas por los antígenos inhalados conduce normalmente a la inducción de la tolerancia de la inhalación más que a la inflamación alérgica. Los mecanismos implicados en la interrupción de esta tolerancia en individuos alérgicos se desconocen. Se ha
- 20 demostrado que una corta exposición a altas concentraciones de Der p 1 o la exposición prolongada a bajas concentraciones causó degradación de las uniones estrechas en células epiteliales bronquiales en pacientes asmáticos y también en las células de individuos no asmáticos. Esto incrementa la permeabilidad del epitelio, lo cual podría favorecer la penetración en la mucosa de la vía aérea, no solo de Der p 1, sino también de otros antígenos desprovistos de
- 25 actividad proteolítica, de tal modo que aumenta la probabilidad de encontrar células presentadoras de antígenos y causar sensibilización. Tal fenómeno explicaría por qué la sensibilización contra los antígenos del ácaro del polvo doméstico se asocia con frecuencia a la sensibilización con múltiples antígenos (57).

- 30 La exposición de las células epiteliales de la vía respiratoria a Der p1 induce la secreción de citocinas pro inflamatorias, particularmente (GM-CSF), e IL -6. La secreción de estos mediadores de las células epiteliales bronquiales de pacientes asmáticos se asocia al transporte intracelular del alérgeno y ocurre después de una breve exposición a concentraciones bajas de

Der p1. (58) De esta forma la actividad catalítica cistein-proteasa del alérgeno de ácaro de polvo casero Der p 1 se asocia con el incremento de la permeabilidad en el epitelio bronquial, facilitando así su propio procesamiento.

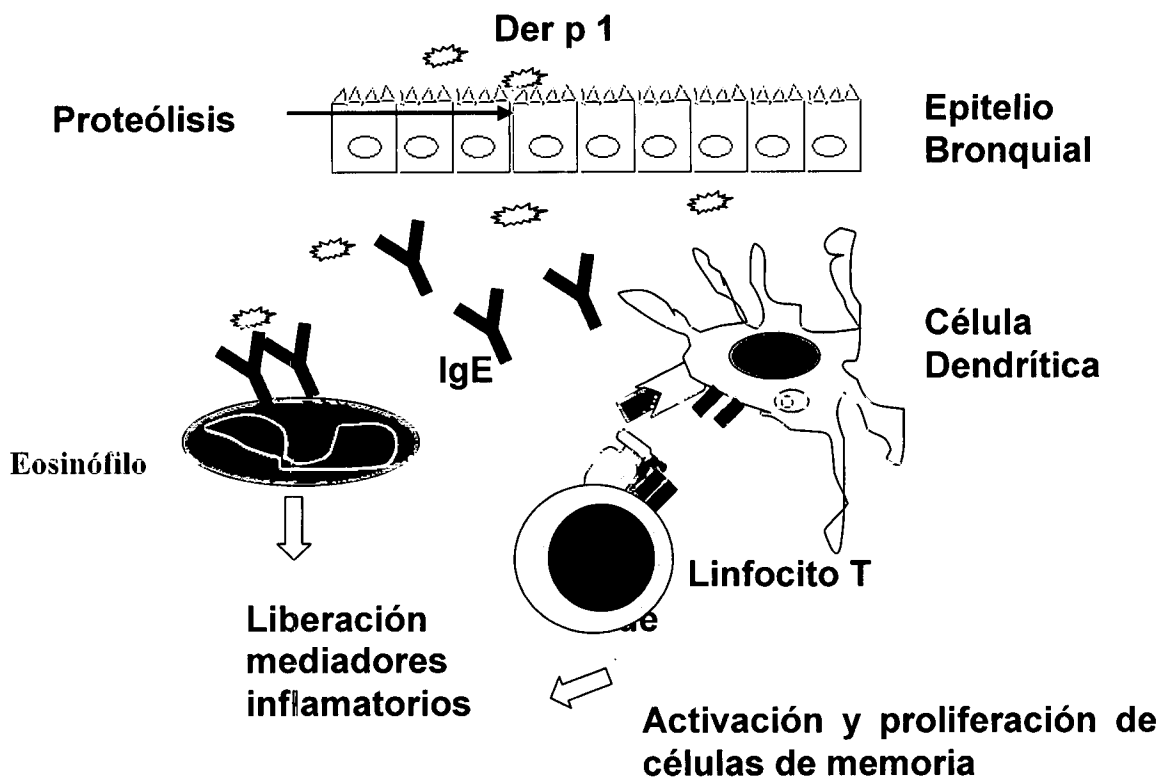


Fig. 4. Incremento en la permeabilidad de membrana por acción proteolítica de Der p 1. (59)

Este alérgeno es capaz también de cortar a CD23 (receptor de baja afinidad para IgE's, el cual regula la síntesis de estas inmunoglobulinas) y a CD25 (la subunidad α del receptor para interleucina-2). Como resultado del clivaje del CD25 de superficie, los linfocitos T de sangre periférica disminuyen su proliferación y la secreción IFN- γ como respuesta a una estimulación. Las poblaciones de la célula Th1 y Th2 promueven el desarrollo de células del mismo subconjunto, mientras que suprime la propagación de los del otro subconjunto. Por lo tanto, el clivaje inducido por Der p 1 de CD25 probablemente conduce al crecimiento deteriorado de las células del subconjunto Th1 y al consiguiente aumento de los del subconjunto Th2.(113) Este subset de células T produce un perfil de citoquinas que incluyen IL-4, IL-5, IL-6, e IL-13, las cuales ejercen sus efectos sobre los mismos linfocitos T, pero también sobre otro tipo de células incluyendo linfocitos B y células presentadoras de antígenos tales como monocitos y células

26
dendríticas. La IL-4 sirve como factor de crecimiento de los linfocitos B e induce la producción de los isótipos IgE e IgG₄. En la exposición inicial al alérgeno, los linfocitos T son estimulados, y la producción de IgE es inducida; estos anticuerpos se unen a los receptores de la superficie de los mastocitos. (59-60)

5

1.3 Tecnología IgY en la detección de alérgenos

10 Los aeroalérgenos son partículas transportadas por el aire, capaces de producir alergia respiratoria, cutánea o conjuntival. Las sustancias que con mayor frecuencia producen cuadros alérgicos a través de la inhalación son: los pólenes, esporas de hongos, diferentes tipos de ácaros, cucaracha, epitelio de animales, y otras sustancias que afectan directamente la mucosa respiratoria a través de una serie de procesos inmunológicos. La mayor parte de los alérgenos transportados por el aire suelen ser proteínas o sustancias unidas a proteínas. La mayoría resultan ser glicoproteínas solubles, sin características físico-químicas especiales, salvo un peso
15 molecular comprendido entre 10,000 y 40,000 Da. El tamaño de los aeroalérgenos es también importante. Los alérgenos mejor conocidos varían entre 1 y 60 µm. (61-63)

20 Los mecanismos protectores de la mucosa nasal y de las vías respiratorias (a través de los cilios que transportan las partículas a la orofaringe, siendo éstas deglutidas y desnaturalizadas rápidamente en el estómago) eliminan la mayoría de las partículas más grandes, de tal manera que sólo aquellas de 3 µm o menores son capaces de alcanzar los alvéolos pulmonares. Ello explica una mayor exposición de las mucosas nasal y conjuntival, y de las vías respiratorias superiores. Sin embargo, puesto que la mayoría de las partículas, dado su tamaño, no penetran en los bronquios terminales y alvéolos, deben considerarse otros mecanismos alternativos de
25 respuesta de las vías aéreas. Un aeroalergeno tendrá importancia clínica cuando reúna estas dos circunstancias: (1) poseer grupos antigénicos específicos capaces de provocar respuestas de hipersensibilidad en el hombre; y (2) encontrarse en concentración suficiente en el aire, de tal modo que el nivel de exposición sea adecuado para evocar una respuesta inmunológica. Tales criterios, aparentemente sencillos, no siempre se consiguen a la vez en muchas de las partículas
30 alérgicas posibles. Existen muchas sustancias transportadas en el aire, tanto de origen vegetal y animal, como productos químicos, capaces de provocar síntomas alérgicos en individuos humanos sensibilizados. La respuesta individual depende de múltiples factores, tanto inherentes al sujeto alérgico, como al propio alérgeno: estado del sistema inmune, dosis de alérgeno,

frecuencia y ruta de penetración, características físico-químicas, etc. (64) Entre los
aeroalergenos más importantes tenemos las proteínas de ácaros intradomiciliario y cucaracha.
Anticuerpos IgY fueron usados por investigadores del Food and Drug Administration en
Rockville, Maryland, Estados Unidos para la identificación y caracterización de nuevos
5 alérgenos en extractos de cuerpo entero de *Blattella germanica* y *Periplaneta americana*
demostrando gran especificidad y sensibilidad a estos anticuerpos. (65)

Investigadores del centro de Evaluación e Investigación Biológica en Bethesda, Maryland,
Estados Unidos, desarrollaron un sistema de inmunoglobulinas aviar para producir anticuerpos
10 recombinantes altamente específicos para un alérgeno particular (Fel d 1 recombinante o Amb a
1 nativo) o para múltiples alérgenos (Fel d 1 recombinante y Amb a 1 nativo) de un mínimo de
animales experimentales. Los fragmentos de anticuerpos IgY generados demostraron ser
eficientes en identificación y cuantificación de alérgenos, en comparación con los
inmunoensayos estándares. (66)

La alergia a los alimentos se presenta en el 1-8% de la población. (67-67) La presencia de
alérgenos no declarados en alimentos representa un serio riesgo para individuos alérgicos, que
pueden inducir reacciones a su exposición desde leves hasta severas. En Norte América y
Europa, los alérgenos alimenticios comúnmente implicados en las reacciones alérgicas incluyen
20 huevo, crustáceos, leche, pescado, soya, trigo, maní, nuez, frutos secos (tales como avellanas,
nuez de Brasil, etc.). (68-69)

Maní, nuez, y otros productos con componentes alergénicos son frecuentemente usados como
ingredientes en la elaboración de alimentos para mejorar su sabor y calidad nutricional, y su
25 presencia en tales alimentos debe ser claramente indicada para permitir su identificación por
parte individuos alérgicos. Dado el riesgo de contaminación inadvertida de alimentos con
productos alergénicos durante su proceso de fabricación, la industria alimenticia y las agencias
regulatorias requieren herramientas para monitorear la presencia de alérgenos. (70)

30 En este sentido la Agencia Canadiense para la Inspección de Alimentos desarrolló un Dot Blot
para la detección de proteínas de maní en alimentos usando anticuerpos IgY anti-maní, y las
proteínas de maní unidas fueron detectadas por reacciones secuenciales con anticuerpos anti-IgY
conjugados con peroxidasa y reveladas con un sustrato cromogénico. El ensayo dio resultados

discernibles con concentraciones tan pequeñas como 0.03 ug/ml. Mientras que el umbral de la dosis exacta para las reacciones adversas en las personas sensibles al maní no se conoce, en un estudio se demostró que la ingestión de un mínimo de 100 mg de proteína de maní es capaz de provocar síntomas de una reacción alérgica. (71) Por tanto, este ensayo usando anticuerpos IgY demostró ser adecuado para la detección de proteínas de maní a los niveles asociados con una reacción alérgica. La especificidad de los anticuerpos IgY contra las proteínas de maní, fue confirmada en estos experimentos, en donde se evaluó con extractos de legumbres, lentejas, frijol rojo, así como también con extractos similares de frutos secos, avellana, nuez de Brasil. (72) Sin embargo, dado que el Dot Blot es una prueba que no nos permite establecer las características dosis-respuestas precisas, Investigadores del Centro de Química Analítica en el Instituto de Agrobiotecnología, Konrad Lorenz, Tulln-Austria, desarrollaron un inmunoensayo enzimático competitivo indirecto basado en la tecnología IgY, para la detección de proteínas de avellana en los alimentos, logrando un límite de detección de 10 ug/l y un límite de cuantificación de 30 ug/l. También reportaron una reactividad cruzada con diversos alimentos entre otros soya, frijoles, arroz, huevo, trigo. Esta reactividad cruzada disminuyó con la purificación de los anticuerpos IgY. (73-74)

Los ensayos descritos hasta ahora se diseñaron para la detección de alérgenos particulares. En el centro canadiense para la inspección de alimentos antes mencionado, diseñaron una prueba inmunoquímica para la detección simultánea de múltiples alérgenos usando anticuerpos IgY anti proteínas de avellana, nuez de Brasil, y maní, obteniendo límites de detección entre 1.0 y 0.1 ug / g; demostrando la viabilidad del diseño de pruebas inmunoquímicas con anticuerpos IgY contra múltiples alérgenos. (74-75)

Se ha demostrado que la exposición a los alérgenos es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades alérgicas respiratorias, así también como para el desencadenamiento de los síntomas y signos de la enfermedad alérgica respiratoria. Actualmente se promueve la reducción de los niveles de alérgeno a través de diversos métodos y técnicas, todos ellos de limitada utilización en países en vías de desarrollo. El concepto de **“Vida con bajos niveles en alérgenos”** está siendo utilizado en Europa y Canadá. Existen estudios que sustentan la disminución de morbilidad y comorbilidad cuando se implementan estos protocolos de intervención ambiental. Para los pacientes es beneficioso poder realizar monitoreos ambientales de estos niveles en sus hogares y lugares de trabajo, a través de los cuales se logra un adecuado

control de los espacios donde se realizan sus actividades cotidianas.

Los métodos convencionales de detección de ácaros emplean principalmente anticuerpos monoclonales, los cuales requieren de altos tiempos y costos de producción.

5

Descripción detallada de la invención

La invención aquí descrita corresponde al método para la obtención de una composición de anticuerpos policlonales IgY útil como reactivo diagnóstico de bajo costo y alta especificidad, para la detección de alérgenos de ácaros intradomiciliarios. La invención también abarca la composición de anticuerpos policlonales IgY como tal.

La presente invención también se refiere a un método para la detección de alérgenos de ácaros intradomiciliarios en muestras de polvo provenientes de ambientes tales como dormitorios, oficinas, guarderías, hoteles, cine, etc. usando una composición de anticuerpos policlonales IgY obtenidos mediante el primer método descrito en esta solicitud, que son específicos para alérgenos del grupo 1 de ácaros y que permiten la detección de alérgenos en bajas concentraciones (de hasta 0.03µg/mL).

20

Con el primer método de la invención se logran obtener anticuerpos policlonales IgY con una alta especificidad, que reconocen alérgenos de ácaros intradomiciliarios, y que son inducidos por péptidos sintéticos especiales, que permiten dirigirlos a regiones particulares de proteínas de ácaros. Los anticuerpos policlonales IgY obtenidos en la presente invención son los únicos anticuerpos IgY descritos a la fecha, que son específicos para alérgenos de ácaros intradomiciliarios, pues los anticuerpos anti-alérgenos de ácaros descritos hasta el momento corresponden a anticuerpos monoclonales. Los péptidos sintéticos empleados en el método de la invención para la obtención de anticuerpos policlonales IgY son diseñados a partir de los diferentes alérgenos del grupo 1 de ácaros intradomiciliarios y, preferiblemente, son aquellos de secuencias SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6 divulgados en la solicitud de patente CO 09-027540, incorporado en su integridad al presente documento por referencia.

30

Los métodos convencionales para la producción de anticuerpos IgY utilizan proteínas naturales

y/o recombinantes, las cuales generan anticuerpos contra cualquier región de la proteína, afectando la especificidad de la reacción. Los péptidos sintéticos son compuestos químicamente bien definidos y, por lo tanto, permiten reducir la variabilidad interensayo e intraensayo. A diferencia de los antígenos que se obtienen por cultivo, los sintéticos permiten realizar estudios con epítopes de difícil acceso.

En el presente caso, el uso de péptidos sintéticos diseñados con base en las proteínas naturales de los ácaros intradomiciliarios, y que preferentemente comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, permite que estos anticuerpos IgY se unan a epítopes moleculares característicos de diferentes cistein proteasas de ácaros intradomiciliarios, particularmente a las cistein proteasas de los ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, y *Blomia tropicalis*, principales agentes desencadenantes de enfermedad alérgica respiratoria en el tropico. Asimismo, el uso de la tecnología IgY permite obtener grandes volúmenes de anticuerpos IgY, lo cual facilita su masificación y transferencia al sector productivo.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un método para la detección de alérgenos de ácaros intradomiciliarios en muestras de polvo, basado en técnicas inmuno enzimáticas, inmunocromatograficas y/o electrotransferencia, que emplea la composición de anticuerpos desarrollada en la presente invención, los cuales han demostrado ser muy eficientes en la detección de los alérgenos del grupo 1 de ácaros intradomiciliarios con un límite de detección de 0.03ug/ml.

El desarrollo de anticuerpos policlonales de alta especificidad y gran sensibilidad, permite efectuar una detección confiable de los alérgenos de ácaros intradomiciliarios, a un menor costo que los métodos que emplean anticuerpos monoclonales, pero obteniendo resultados comparables a estos.

El método de detección de alérgenos en muestras de polvo involucra una secuencia de eventos que van desde recolección de las muestras de polvo, producción del extracto proteico, y evaluación y análisis de las mismas.

El primer método de la invención, que conduce a la manufactura de una composición de

anticuerpos policlonales IgY, útil como reactivo diagnóstico de bajo costo para ácaros intradomiciliarios consiste en las etapas de:

- 5 a) preparar una composición inmunogénica que comprende al menos un péptido que presente una homología igual o mayor al 85% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID N°. 1, 2, 3, 4, 5 y 6;
- b) hiperinmunizar gallinas de la variedad Hy Line Brown, de 16 – 20 semanas de edad;
- 10 c) extraer los anticuerpos policlonales IgY;
- d) purificar los anticuerpos policlonales IgY.

En el paso a), para la preparación de la composición de péptidos se toman entre 50-150 ul de los péptidos sintéticos diluidos en agua estéril con una concentración entre 100 y 300ug/ml y se
15 homogenizan con 50-150 ul del adyuvante.

En el paso b), durante la inmunización de las gallinas se realizan entre 3 y 6 inmunizaciones intramuscularmente en los músculos pectorales (pechuga) a intervalos de 2-3 semanas durante 2-3 meses. El antígeno (péptido sintético) es inyectado a una concentración de 50-200 µg/ml,
20 emulsificado en adyuvante completo de Freund® durante las primeras inmunizaciones (1-2) y en adyuvante incompleto de Freund® para los refuerzos siguientes.

En el paso c), el aislamiento de los anticuerpos se efectúa separando cuidadosamente la yema de huevo de la clara, midiendo los volúmenes, tanto de la yema como de la clara. Se delipida
25 mediante el uso de un solvente orgánico (v.gr. cloroformo). El contenido de la yema se emulsifica en 0,5 - 2 veces su volumen en un buffer acuoso (v.gr. PBS); posteriormente, 1,5 - 3 volúmenes del solvente orgánico son adicionados y la mezcla es incubada a temperatura ambiente entre 1 - 3 horas; centrifugada a 2000-4000 rpm por 10-30 minutos a una temperatura entre 14 y 25°C y el sobrenadante es recolectado y almacenado para su posterior purificación.

30 En el paso d) la purificación se realiza por cromatografía de columna, v.gr.. cromatografía

23
policlonales IgY evaluando la presencia de los alérgenos en las muestras
colectadas previamente.

En la etapa 1 se usa una aspiradora manual, en un área de 1 a 2 m² usando una bolsa de
5 recolección independiente por área a evaluar.

En la etapa 2 se toman entre 10-30 mg de polvo, se adiciona 1-3 mL de buffer de extracción
(v.gr., PBS 1X - Tween 20 al 0,05% v/v), seguido de agitación por 1-3 minutos a temperatura
ambiente. Las proteínas disueltas en la fase acuosa se separan del material insoluble por
10 centrifugación a 2.700 a 3.700 r.p.m por 3-8 minutos. Con el fin de asegurar la completa
separación, el sobrenadante se depura con un filtro de 0,22 µm. tomando el sobrenadante para su
posterior analisis.

El contacto del extracto proteico con la composición de anticuerpo IgY y la detección del
15 alérgeno se efectúa de manera directa por métodos conocidos en el estado del arte, o de manera
indirecta como se muestra en la Figura 5.

Para la detección de forma indirecta, se incuba la placa de poliestireno con el extracto de
proteínas del polvo, luego se incuba nuevamente con los anticuerpos IgY anti alérgenos del
grupo 1 de ácaros intradomiciliarios y posteriormente con el anticuerpo anti-IgY conjugado
20 (p.ej., conjugado con peroxidasa), la reacción se revela agregando el sustrato (p.ej., TMB) y se
detecta la absorbancia a 450 nm. La detección se efectúa por la correlación del cambio de color o
fluorescencia a la presencia de los alérgenos de ácaros.

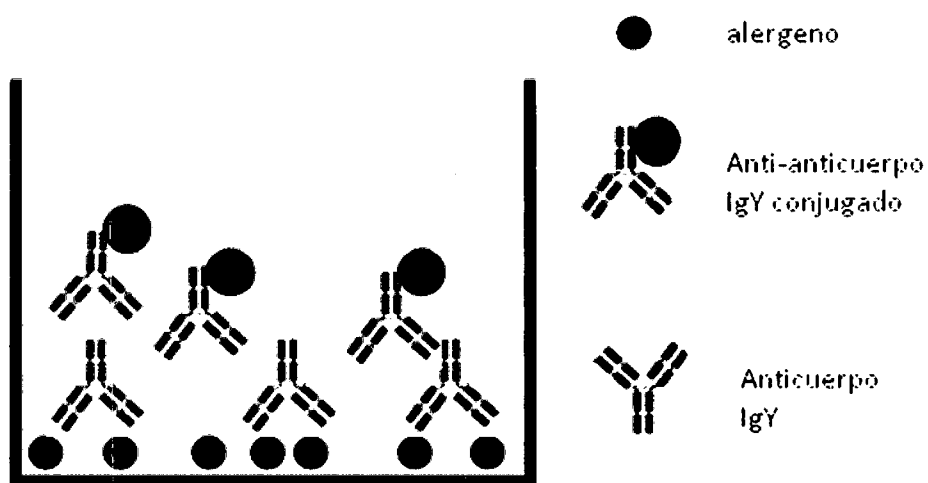


Figura 5. Detección indirecta de los alérgenos con anticuerpos IgY.

94

Ejemplo No 1: Método para la obtención de una composición de anticuerpos policlonales IgY útil como reactivo diagnóstico de bajo costo para la detección de alérgenos de ácaros intradomiciliarios.

Se emplearon los péptidos SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6 o que tienen un 85% de homología con estos, se emulsificaron a una concentración 100 µg/ml en adyuvante completo de Freund para una primera inmunización y en adyuvante incompleto para las inmunizaciones subsiguientes.

Se inmunizaron gallinas ponedoras de 16 – 20 semanas de edad en cuatro inmunizaciones intramuscularmente en los músculos pectorales (pechuga) a intervalos de 2 semanas durante 2 meses y se colectaron diariamente los huevos, marcados y almacenados a 4°C.

Se separaron cuidadosamente la yema y la clara de huevo, midiendo los volúmenes de cada una; se emulsificó la yema en igual volumen de PBS y se adicionaron 2 volúmenes de cloroformo para delipidar; se incubó la mezcla a temperatura ambiente 2 horas; se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos a una temperatura entre 17°C y se recolectó el sobrenadante;

Los anticuerpos fueron purificados utilizando el soporte de Sefarosa CL4B activado con divinilsulfona (DVS), al cual se acopló β- mercaptoetanol (β-MESH) Dos mililitros del soporte activo se equilibraron en tampón de fosfatos 50 mM pH 7,4 adicionado con Na₂SO₄ 0,5 M (tampón de equilibrio). Posteriormente una dilución 1:2 de la muestra en tampón de equilibrio se adicionó al soporte de sefarosa. La elusión de la proteína retenida se obtuvo mediante la adición del tampón de fosfatos 50 mM pH 7,4.

La cantidad de proteína en los extractos se cuantificó por los métodos de Bradford y Lowry, para los cuales se preparó una solución del colorante diluida 1:5 a la que se le adicionaron 100 µl de la muestra, la densidad óptica (DO) se leyó a 595 nm. La concentración de proteínas se determinó extrapolando la DO obtenida en una curva de titulación (DO vs concentración) construida utilizando un patrón.

Ejemplo No 2. Método para la detección de alérgenos de ácaros intradomiciliarios:



Se recolectaron muestras de polvo con una aspiradora manual en un área de 1 a 2 m² guardando una proporción de 0,5 m²/min. Se tomaron 20 mg de cada muestra, se diluyeron en 2 ml de buffer fosfato y se agitaron por 5 minutos; se hicieron diluciones seriadas del sobrenadante y se colocaron en una placa de poliestireno; se incubaron a 37°C durante 18 horas en cámara húmeda; se adicionó solución de bloqueo y se incubó a 37°C por 2 horas; se adicionaron series de diluciones dobles de la composición de anticuerpos policlonales IgY obtenida en el primer método de la invención; las placas de reacción se incubaron a 37°C por 2 horas en cámara húmeda; se efectuaron lavados; se adicionaron anticuerpos Anti-IgY, conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) diluida 1/1000, y la prueba se reveló con sustrato TMB 3,3',5,5'-tetrametilenzidina, la reacción se detuvo con HCl 1N o marcando el los anticuerpos IgY que constituyen el reactivo diagnóstico obtenido mediante el primer método de la invención, con fluorocromos, enzimas, metales preciosos, o ligandos radiomarcados.

Ejemplo 3. Producción de una prueba inmunocromatografica (lateral Flow Immunoassays) con inmunoconjugados IgY-nanopartículas de oro coloidal.

Se marcaron los anticuerpos IgY anti-oligopéptidos sintéticos de alérgenos del grupo 1 de los ácaros *D. pteronyssinus*, *D. farinae* y *B. tropicalis* (obtenidos por el primer método de la invención), con nano-partículas de oro coloidal de 40 nm de diámetro. Los inmunoconjugados (IgY-nanoGold) se emplearon como reactivo de detección para la prueba inmunocromatográfica, cuya ejecución implicó la construcción de una tira de prueba. La tira consta de cuatro secciones, cuya descripción aparece abajo:

- ii) La zona de aplicación ó “cojín muestra” está formada por una fibra de celulosa cuya función es remover el material viscoso o particulado presente en la mezcla y ajustar las condiciones de reacción para la inmunodetección.
- iii) La zona de marcación ó “cojín del conjugado” es compuesta por fibra de vidrio y constituye la fase móvil del sistema inmunocromatográfico, sobre esta se ha liofilizado un “conjugado coloreado”, que es el anticuerpo de detección IgY anti- oligopeptidos

9b

cintéticos de los alérgenos Der p1, Der f1 y Blot 1 (obtenidos por el primer método de la invención), conjugado a nano-partículas de oro coloidal (40 nm); el anticuerpo de detección IgY se une específicamente al alérgeno presente en la muestra, formando el complejo “alérgeno- anticuerpo conjugado coloreado”.

iiii) La tercera sección (zona de detección) de la tira está formada por una membrana de nitrocelulosa y constituye el soporte sólido del sistema inmunocromatográfico. Esta sección tiene dos zonas de reacción: una zona de reacción primaria (T) en la cual se encuentra inmovilizada una mezcla del alérgeno de prueba Der p1, Der f1 y/o Blot 1 con BSA (alérgeno/BSA), y una zona de reacción secundaria (C) en la cual se encuentra inmovilizado el anticuerpo de captura (IgG anti-IgY). Si el alérgeno de prueba se encuentra presente en la muestra, se une al anticuerpo de detección IgY formando el complejo “alérgeno-conjugado coloreado”, el cual se moviliza a la zona T. Debido a que los sitios de unión del anticuerpo de detección están ocupados por el alérgeno presente en la muestra no se produce señal coloreada en esta zona (prueba positiva). El complejo “alérgeno- conjugado coloreado” sigue movilizándose hacia la zona C donde se une al anticuerpo de captura IgG- anti IgY, formando el complejo “anticuerpo de captura-conjugado coloreado- antígeno”, que se visualiza como una línea en esta zona. En presencia o en ausencia del alérgeno en la muestra, la señal en la zona C debe estar presente, constituyéndose en un control de la prueba, es decir confirma que una prueba es funcional o válida independientemente de si la zona T indica un resultado negativo o positivo.

ivi) La cuarta sección sobre la tira de prueba está formada por un “cojín absorbente” que dirige el flujo lateral de la muestra en solución de forma continua corriente arriba (ver Figura 6).

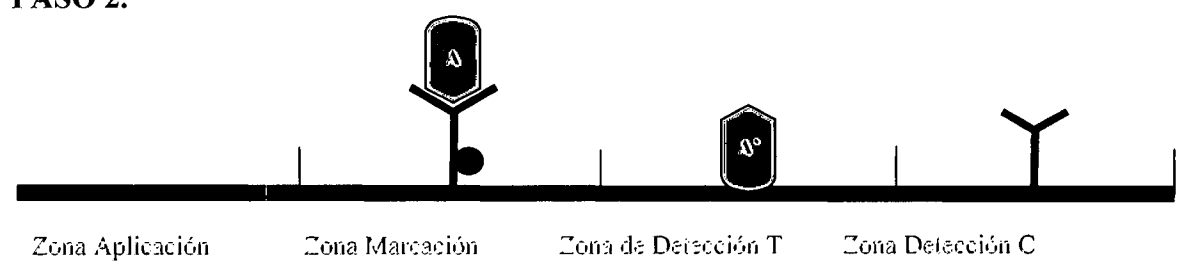
PASO 1.



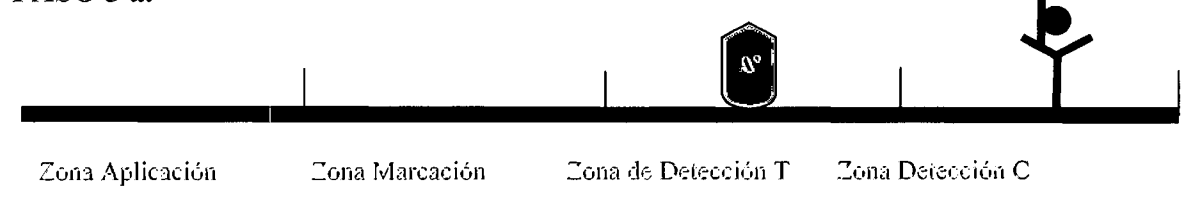
Handwritten signature or mark.

Zona Aplicación Zona Marcación Zona de Detección T Zona Detección C

PASO 2.

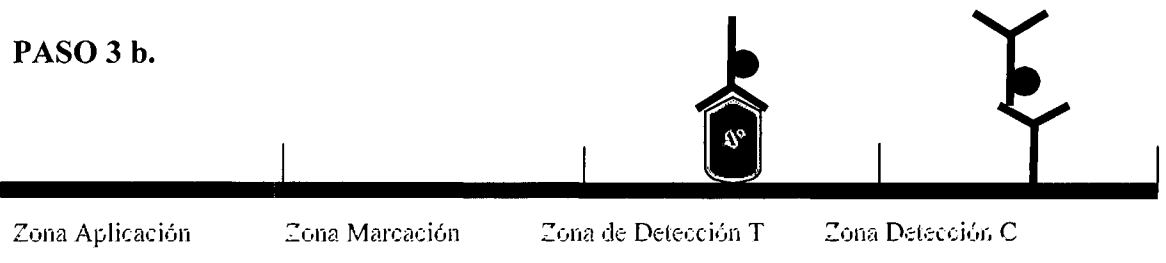


PASO 3 a.



PRUEBA POSITIVA (UNA SEÑAL)

PASO 3 b.



PRUEBA NEGATIVA (DOS SEÑALES)

Fig. 6. Diseño de la tira de prueba con inmunconjugados IgY- nano partículas de oro coloidal.

Para la realización de esta prueba se emplea preferentemente el dispositivo divulgado en la patente CO09-008859.

Ejemplo 4. Producción de una prueba inmunocromatografica (lateral Flow Immunoassays) con inmunconjugados IgY- biotina.

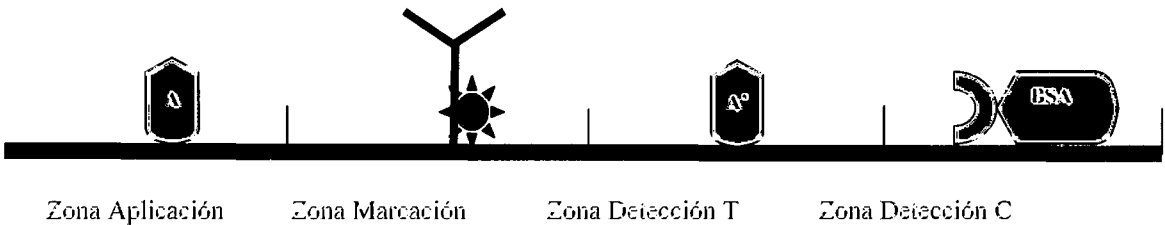


Para el inmunoensayo cromatográfico con inmunoconjugados IgY- Biotina, los anticuerpos purificados disueltos en buffer salino fosfato se marcaron con biotina usando un reactivo de marcación comercial NHS-LC- Biotina (Pierce, Rockford, III). También se preparó una proteína portadora de straptavidina (BSA-streptavidina). El diseño de la tira de prueba se muestra en la

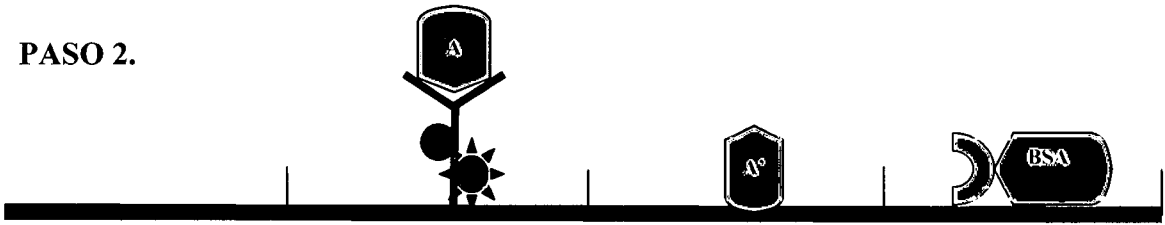
La preparación de la muestra para el inmunoensayo cromatográfico se realizó de igual forma que para el Elisa indirecto, en este caso para la interpretación de resultado se le otorgó un valor numérico a los resultados colorimétricos por intensidad de color, del 1 al 5, siendo 1 sin coloración y 5 la intensidad de coloración más alta.

Para la realización de esta prueba se emplea preferentemente el dispositivo divulgado en la patente CO09-008859

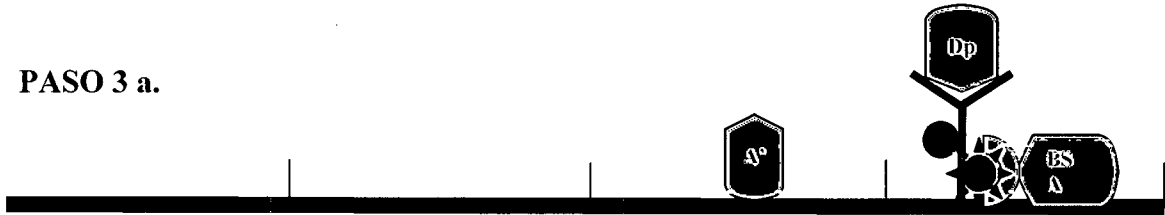
PASO 1.



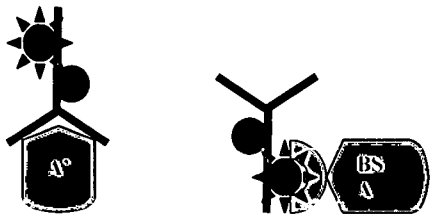
PASO 2.



PASO 3 a.



PRUEBA POSITIVA (UNA SEÑAL)



Handwritten signature

PASO 3 b.



5

PRUEBA NEGATIVA (DOS SEÑALES)

10



Biotina

15



Inhibidor

20



Straptavidin

25



Anticuerpo IgY marcado con

30



Nano-partícula de oro

Fig. 7. Diseño de la tira de prueba con inmunoconjugados IgY- Biotina

Referencias

1. Alberse PC. Structural biology of allergens. J Allergy Clin Immunol 2000;106:228-238.
- 5 2. Chapman MD, et al. Nomenclature and structural biology of allergens J Allergy Clin Immunol 2007;119: 414-20.
3. Marsh DG., Goodfriend L., King TP., et al. Allergen nomenclature. Bull WHO 1986; 64:767.
- 10 4. Pómes A. Intrinsic properties of allergens and environmental exposure as determinants of allergenicity. Allergy 2002; 57: 673-679.
5. Woodfolk JA., Wheatley LM., Piyasena RV., et al. *Trichophyton* antigens associated with IgE antibodies and delayed type hypersensitivity: sequence homology to two families of serine proteinases. J Biol Chem 1998; 273: 29489..
- 15 6. Schellenberg RF., Adkinson NF. Measurement of absolute amounts of antigen-specific human IgE by a radioallergosorbent test (RAST) elution technique. J Immunol 1975; 115: 1577.
7. Bohle B., Schwihla H., Hu HZ., et al. long lived T_{H2} clones specific for seasonal and perennial allergens can be detected in blood and skin by their TCR-hypervariable regions. J Immunol 1998; 160: 2020.
- 20 8. Ring J, Kramer U, Schafer T et al. Why are allergies increasing? Curr Opin Immunol 2001; 13: 701-708.
9. Sánchez-De la Vega W, Sánchez-Medina M, Lucena G, Vanella L, Moreno G, Albornoz A, et al. Manual Latinoamericano de Alergia e Inmunología 1987: primera edición. Colciencias ISBN 958-608-045-5. Pags: 39-60.
- 25 10. Weghofer M, Thomas WR, Pittner G, Horak F, Valenta R, Vrtala S. Comparison of purified Dermatophagoides pteronyssinus allergens and extract by two-dimensional immunoblotting and quantitative immunoglobulin E inhibitions. Clin Exp Allergy. 2005 Oct;35(10):1384-91.
- 30 11. Arlian LG, Bernstein D, Bernstein IL, Friedman S, Grant A, Lieberman P, Lopez M, Metzger J, Platts-Mills T, Schatz M, et al. Prevalence of dust mites in the homes of people with asthma living in eight different geographic areas of the United States. J Allergy Clin Immunol. 1992 Sep;90(3 Pt 1):292-300.

21

12. Fernandez-Caldas E, Lockey RF. *Blomia tropicalis*, a mite whose time has come. *Allergy*. 2004 Nov;59(11):1161-4.
13. International Union of Immunological societies (IUIS) Allergen Nomenclature Subcommittee. Allergen Nomenclature. www.allergen.org
- 5 14. Heymann PW, Chapman MD, Platts-Mills TAE. Antigen Der f I from the house dust mite *Dermatophagoides farinae*. In structural comparison with Der p I from *Dermatophagoides pteronyssinus* and human IgE epitope specificity of murine IgG and human IgE antibodies. *J Immunol* 1986; 137:2841-2847.
15. Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, et al. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J Immunol Meths* 1981; 46:63-8.
- 10 16. Thoma WR, et al. Cloning and expression of DNA coding for the major house dust mite allergen Der p 1 in *E. coli*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1986; 85:127-129.
17. Chua KY, et al. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p I. Homology with cystine protease. *J Exp Med* 1988;167:175-182.
- 15 18. Dilworth RJ, et al. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen. Der f I. *Clin Exp Allergy* 1991; 21:25-32.
19. Schultz, O., H. F. Sewell, F. Shakib. 1999. The interaction between the dust mite antigen Der p 1 and cell-signalling molecules in amplifying allergic disease. *Clin. Exp. Allergy* 29:439.-444.
- 20 20. Lind P, Lowenstein H. Identification of allergens in *Dermatophagoides pteronssinus* mite body extract by crossed radioimmuno-electrophoresis with two different rabbit antibody pools. *Scand J immunol* 1983; 17:263-273.
21. Lind WR, et al. Purification and partial characterization of two major allergens from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol* 1988;76:753-761.
- 25 22. Vand der ee JS, et al. Skin tests and histamine release with P1-depleted *Dermatophagoides pteronyssinus* body extracts and purified P1. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81:884-895.
23. Barrett AJ, Rawlings ND. Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol Chem*. 2001 May;382(5):727-33.
- 30 24. Chua, K. Y., G. A. Stewart, W. F. Thomas, R. J. Simpson, R. J. Dilworth, T. M. Plozza, K. J. Turner. 1988. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1: homology with cysteine proteases. *J. Exp. Med.* 167:175.-182.

32

25. Smith WA, et al. Allergens of wild house dust mites: environmental Der p 1 and Der p 2 sequence polymorphisms. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:285-992.
26. Jarnicki AG, et al. Stimulatory and inhibitory epitopes in the T cell responses of mice to Der p 1. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:942-950.
- 5 27. Vernet, T., H. E. Khouri, P. Laflamme, D. C. Tessier, R. Musil, B. J. Gour-Salin, A. C. Storer, D. Y. Thomas. 1991. Processing of the papain precursor: purification of the zymogen and characterization of its mechanism of processing. *J. Biol. Chem.* 266:21451.-21457.
- 10 28. Ikemura, H., H. Takagi, M. Inouye. 1987. Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262:7859.-7864.
29. Menard, R., J. Carriere, P. Laflamme, C. Plouffe, H. E. Khouri, T. Vernet, D. C. Tessier, D. Y. Thomas, A. C. Storer. 1991. Contribution of the glutamine 19 side chain to transition-state stabilization in the oxyanion hole of papain. *Biochemistry* 30:8924.-8928.
- 15 30. Meno K, Thorsted PB, Ipsen H, Kristensen O, Larsen JN, Spangfort MD, Gajhede M, Lund K. The Crystal Structure of Recombinant proDer p 1, a Major House Dust Mite Proteolytic. *J Immunol.* 2005; 175: 3835-3845.
31. De Halleux, S., Stura, E., VanderElst, L., Carlier, V., Jacquemin, M., Saint-Remy, J.-M. Three-dimensional structure and IgE-binding properties of mature fully active Der p 1, a clinically relevant major allergen *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 117: 571-576.
- 20 32. Storer, A. C., R. Menard. 1994. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 244:486.-500.
33. Barrett, A. J., N. D. Rawlings, J. F. Woessner. 1998. Cysteine peptidases. *Handbook of Proteolytic Enzymes* 543.-798. Academic Press, London.
- 25 34. Smith WA, Hales BJ, Jarnicki AG, Thomas WP. Allergens of wild house dust mites: environmental Der p 1 and Der p 2 sequence polymorphisms. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:985-92.
35. Schultz et al. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5857-5864.
36. Letunic et al. SMART 5: domains in the context of genomes and networks (2006) *Nucleic Acids Res* 34, D257-D260.
- 30 37. Chapman MD, Platts-Mills TA. Purification and characterization of the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*-antigen P1. *J Immunol.* 1980 Aug; 125(2):587-92.

93

38. Heymann PW, Chapman MD, Platts-Mills TA. Antigen Der f I from the dust mite *Dermatophagoides farinae*: structural comparison with Der p I from *Dermatophagoides pteronyssinus* and epitope specificity of murine IgG and human IgE antibodies. *J Immunol*. 1986 Nov 1;137(9):2841-7.
- 5 39. Furmonaviciene R, Shakib F. The molecular basis of allergenicity: comparative analysis of the three dimensional structures of diverse allergens reveals a common structural motif. *Mol Pathol*. 2001 Jun;54(3):155-9.
40. Furmonaviciene R, Sewell HF, Shakib F. Comparative molecular modelling identifies a common putative IgE epitope on cysteine protease allergens of diverse sources. *Clin Exp Allergy*. 2000 Sep;30(9):1307-13.
- 10 41. Schellenberg RR., Adkinson NF. Measurement of absolute amounts of antigen-specific human IgE by a radioallergosorbent test (RAST) elution technique. *J Immunol* 1975; 115: 1577.
42. Bohle B., Schwihla H., Hu HZ., et al. long lived T_{H2} clones specific for seasonal and perennial allergens can be detected in blood and skin by their TCR-hypervariable regions. *J Immunol* 1998; 160: 2020.
- 15 43. Goodman RE. Practical and predictive bioinformatics methods for the identification of potentially cross-reactive protein matches. *Mol Nutr Food Res*. 2006 Jul;50(7):655-60.
44. Thomas WR, Smith WA, Hales BJ. The allergenic specificities of the house dust mite. *Chang Gung Med J*. 2004 Aug;27(8):563-9.
- 20 45. Simpson A, Green R, Custovic A, Woodcock A, Arruda LK, Chapman MD. Skin test reactivity to natural and recombinant *Blomia* and *Dermatophagoides* spp. allergens among mite allergic patients in the UK. *Allergy*. 2003 Jan;58(1):53-6.
46. Pauli G, Bessot JC. The fight against mites. *Allergy Today* 1998;2(7):7-9.
- 25 47. Fernández E, Puerta L, Mercado D, Lockey RF, Caraballo L. Mite fauna *Der p1*, *Der f1* and *Blomia tropicalis* allergen in a tropical environment. *Clin Exp Allergy* 1993;23(4):2992-7.
48. Carswell F. House dust allergy. *ACI Int* 1996;8(5-6):169-71.
49. Marchler-Bauer A, Bryant SH. "CD-Search: protein domain annotations on the fly.", *Nucleic Acids Res*. 2004; 32: 27-331.
- 30 50. Thomas WR, Hales BJ, Smith WA. Recombinant allergens for analysing T-cell responses. *Methods*. 2004 Mar;32(3):255-64.

51. Aalberse PC. Structural features of allergenic molecules. *Chem Immunol Allergy* 2006;91:134-46.

52. Collazo ME, Diaz AM. Monoclonal antibodies against whole body extract of the dust mite *Blomia tropicalis*. *P R Health Sci J*. 2003 Dec;22(4):345-51.

5 53. Rolni MB, Massoud J, Hanilo A. Comparison of adult somatic and cysteine proteinase antigens of *Fasciola gigantica* in enzyme linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human fasciolosis. *Acta Trop*. 2003 Sep;88(1):69-75.

54. Hong Wan, Helen L. Winton, Christian Soeller, Euan R. Tovey, Dieter C. Gruenert, Philip J. Thompson, Geoffrey A. Stewart, Graham W. Taylor, David R. Garrod, Mark B. Cannell, and Clive Robinson Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions *J. Clin. Invest.*, Jul 1999; 104: 123 - 133.

10 55. Wan, Winton, Soeller, Gruenert, Thompson, Cannell, Stewart, Garrod, Robinson (2000) Quantitative structural and biochemical analyses of tight junction dynamics following exposure of epithelial cells to house dust mite allergen Der p 1 *Clinical & Experimental Allergy* 30 (5), 685–698.

15 56. Tomee JFC, van Weissenbruch R, de Monchy JGR, Kauffman HF. Interactions between inhalant allergen extracts and airway epithelial cells: effect on cytokine production and cell detachment. *J Allergy Clin Immunol* 102:75-85 (1998).

57. Shakib F, Schulz O, Sewell HF. A mite subversive: cleavage of CD23 and CD25 by Der p 1 enhances allergenicity. *Immunol Today* 1998; 19:313.

20 58. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383:787–793. [Abstract]

59. Schulz O, Sewell HF, Shakib F. Proteolytic cleavage of CD25, the α subunit of the human T cell Interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *J Exp Med* 1998; 187:271±5. [Abstract]

25 60. Machado DC, Horton D, Harrop R et al. Potential allergens stimulate the release of mediators of the allergic response from cells of mast cell lineage in the absence of sensitization with antigen-specific IgE. *Eur J Immunol* 1996; 26:2972±80.

61. G. Roberts *, C. Peckitt†, K. N. Relationship between aeroallergen and food allergen sensitization in childhood. *Clinical & Experimental Allergy* 2005: (35), 7, Pages 933-940.

30 62. Stelmach I, Jerzynska J, Stelmach W et al. Cockroach allergy and exposure to cockroach allergen in Polish children with asthma. *Allergy* 2002; 57: 701–5.

63. Santos AB, Chapman MD, Aalberse RC et al. Cockroach allergens and asthma in Brazil: identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: t-37
64. Guidos F, V. Almeida A. Polinosis y aeroalérgenos. *Alergia asma e imunologia pediátrica*. 2005; 14 (2): pp 52-55.
65. N. deVore, W. Finlay, E. Cloning and Analysis of Mono-Specific scFv Fragments From Chicken to Allergenic Proteins of *Periplaneta Americana* (American Cockroach). *J Allergy and Clinical immunology* 2005; 113 (2):S297.
66. Finlay, W. J. J.; deVore, N. C. Exploiting the avian immunoglobulin system to simplify the generation of recombinant antibodies to allergenic proteins. *Clinical & Experimental Allergy*. 2005, 35(8):1040-1048.
67. J. Bousquet, B. Björkstén, C. A. F. M. Bruijnzeel-Koomen, A. Huggett, C. Ortolani, J. O. Warner, M. Smith. Scientific criteria and the selection of allergenic foods for product labeling. *Allergy* 53 (1998) 3–21.
68. M. Besler, Determination of allergens in foods *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 662.
69. Helm RM, Burks AW. Food allergens. *Clin Allergy Immunol*. 2008;21:219-35.
70. Zarkadas, M., Scott, F. W., Salminen, J., & Ham Pong, A. (1999). Common allergenic foods and their labelling in Canada—a review. *Canadian Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 4, 118–141.
71. Burton W. Blais *, Melissa Gaudreault, Lucille M. Phillippe. Multiplex enzyme immunoassay system for the simultaneous detection of multiple allergens in foods. *Food Control* 14 (2003) 43–47.
72. HOURIHANE, J. O'B., KILBURN, S. A., NORDLEE, J. A., HEFLE, S. L., TAYLOR, S. L. & WARNER, J. O. (1997) An evaluation of the sensitivity of subjects with peanut allergy to very low doses of peanut protein: a randomized, double-blind, placebo-controlled food challenge study, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100, 596– 600.
73. B. W. BLAIS AND L. M. PHILLIPPE. A Cloth-based Enzyme Immunoassay for Detection of Peanut Proteins in Foods. *Food and Agricultural Immunology* (2000) 12, 243–248.
74. E. Dra a, S. Baumgartner a,□, M. Bremer. Detection of hidden hazelnut protein food by IgY-based indirect competitive enzyme-immunoassay. *Analytica Chimica Acta* 520 (2004) 223–228.

CAPITULO REIVINDICATORIO

1. Un método para la producción de una composición de anticuerpos policlonales IgY útil como reactivo diagnóstico, caracterizado porque comprende las etapas de:

5

a) preparar una composición inmunogénica que comprende al menos un péptido que presente una homología igual o mayor al 85% con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID Nos. 1, 2, 3, 4, 5 y 6;

10

b) hiperinmunizar un ave con la composición inmunogénica;

c) extraer los anticuerpos policlonales IgY de la yema del huevo puesto por el ave; y

d) purificar los anticuerpos policlonales IgY.

15 2. El método de la Reivindicación 1 en el que en la etapa b) incluye más de una inmunización.

3. El método de la Reivindicación 1 en el que en la etapa a), la preparación de la composición inmunogénica se efectúa por emulsificación del péptido con adyuvante de Freundz completo para una primera inmunización en la etapa de hiperinmunización b).

20

4. El método de la Reivindicación 1 en el que en la etapa a), la preparación de la composición inmunogénica se efectúa por emulsificación del péptido con adyuvante de Freundz incompleto para posteriores inmunizaciones en la etapa de hiperinmunización b).

25 5. Un método de la Reivindicación 1 en el que, en la etapa b), la hiperinmunización se efectúa

a gallinas de la linea comercial Hy Line Brown.

6. Un método de la Reivindicación 1 en en donde la etapa b) la hiperinmunización se efectúa a intervalos de 15 días, en los músculos pectorales de las gallinas.

5

7. Un método de la Reivindicación 1, en donde la extracción de la etapa c) se lleva a cabo empleando cloroformo y buffer fosfato salino para la separación de los anticuerpos de la yema del huevo.

10 8. El método de la Reivindicación 1 en donde la purificación de la etapa d) se efectúa empleando una columna de sefarosa CL4B activada con divinilsulfona acoplada con β -Mercapto etanol, en donde el soporte activo se equilibra en tampón de fosfatos adicionado con Na_2SO_4 , y posteriormente se adiciona una dilución de la muestra en tampón de equilibrio, y la elusión de los anticuerpos policlonales IgY se obtiene mediante la adición de un tampón de fosfatos.

15

9. El método de la Reivindicación 1 que adicionalmente comprende la etapa de marcar los anticuerpos policlonales IgY.

10. El método de la Reivindicación 1 que adicionalmente comprende la etapa de generar
20 inmunos conjugados de los anticuerpos policlonales IgY.

11. El método de la Reivindicación 9 donde la marcación se efectúa empleando fluorocromos, enzimas, metales preciosos, o ligandos radiomarcados.

25 12. El método de la Reivindicación 10 en donde los inmunos conjugados se seleccionan del grupo



que consiste de inmunos conjugados IgY-nanopartículas de oro e inmunos conjugados IgY-biotina.

13. El método de la Reivindicación 1 que adicionalmente comprende una etapa de validación de los anticuerpos con extractos alérgenos crudos y alérgenos purificados a través de ensayos
5 inmunológicos.

14. Una composición de anticuerpos policlonales IgY obtenidos por el método de la Reivindicación 1, donde los anticuerpos policlonales IgY son específicos para ácaros.

10 15. Un kit analítico para detección de ácaros que comprende la composición de anticuerpos de la Reivindicación 14.

16. Un método para la detección de alérgenos de ácaros en muestras de polvo provenientes de espacios intramuros usando anticuerpos policlonales IgY específicos para las proteínas
15 alérgicas de ácaros intradomiciliarios comprende los siguientes pasos:

- i) toma de muestras de polvo de ambientes en los cuales este presente o se sospeche están presentes los ácaros intradomiciliarios;
- ii) preparación de extracto de proteínas de las muestras de polvo;
- 20 iii) desarrollo de pruebas inmunológicas con la composición de anticuerpos policlonales IgY evaluando la presencia de los alérgenos en las muestras colectadas previamente.

17. El método de la Reivindicación 16 que se realiza empleando el dispositivo para muestreo
25 dilución y análisis de partículas, divulgado en la patente CO09-008859.

18. El método de la Reivindicación 13, donde en el paso (ii) las muestras se preparan empleando un buffer de extracción (PBS - Tween), agitación, centrifugación y filtración con un filtro de

0,22 μ m. usando el sobrenadante y deccartando los solidos retenidos en el filtro.

19. El método, según la Reivindicación 16, donde en el paso (iii) se lleva a cabo el contacto del extracto proteico con la composición de anticuerpos policlonales IgY y la detección de los alérgenos de ácaros se efectua por la correlación del cambio de color o fluorescencia a la presencia de los alérgenos de ácaros.

20. El método, según las Reivindicaciones 16, donde el paso (iii) comprende el contacto del extracto proteico con la composición de anticuerpos policlonales IgY y la detección del alérgeno de manera directa o indirecta.

21. El método, según las Reivindicacion 16, donde la etapa (iii) comprende el contacto del extracto proteico con la composición de anticuerpo IgY y la detección del alérgeno se efectúa mediante anticuerpos anti-IgY conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) diluidos 1/1000, y la prueba se revela con sustrato TMB 3,3',5,5'tetrametilenzidina.

22. El método de la Reivindicación 16 donde la detección del alérgeno de ácaro se efectúa mediante una prueba inmunocromatográfica (lateral Flow Immunoassays) con immunoconjugados seleccionados entre immunoconjugado IgY-nanoparticulas de oro coloidal, e immunoconjugado IgY-biotina.

23. El método de la Reivindicación 22 donde la prueba inmunocromatográfica se efectua empleando el dispositivo divulgado en la patente CO09-008859.

Anexo No 1.

Secuencias de aminoácidos para los polipeptidos sintéticos.

- 5
- Seq. 1. DYWIVRNSWDTNWGDNGYGY
- Seq. 2. AHFRNLRKGILRGAGYNDAQ
- 10
- Seq.3. FRHYDGRTHIQRDNGYQPNY
- Seq.4. TNACSINGNAPAEIDLRQMR
- 5
- Seq.5. PANFDWRQKTHVNPIRNQG
- 20
- Seq.6. PIRMQGGCGSCWAFSGV

(21) N° de solicitud:				(51) Int Cl:
(22) Fecha de solicitud:				(71) Solicitante(s) FUNDACION UNIVERSIDAD DEL NORTE
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País	(72) Inventor(es) Eduardo Egea, Luis Alejandro Barrera, Johana Espejo, Elkin Navarro, Gloria Garavito, Dary Luz Mendoza
	09-008.859	30/01/2009	CO	
	09-027.540	17/03/2009	CO	
				(74) Apoderado: CARLOS R. OLARTE
(54) Título: MÉTODO Y COMPOSICIÓN INMUNOQUÍMICA PARA LA DETECCIÓN DE ALÉRGENOS DE ÁCAROS USANDO ANTICUERPOS POLICLONALES IgY				

Resumen - Reivindicación(es):

La presente invención corresponde a un método para la obtención de una composición de anticuerpos policlonales IgY útil como reactivo de diagnóstico de bajo costo y alta reactividad frente a ácaros intradomiciliarios, y a un método para la detección de alérgenos de ácaros que emplea la composición de anticuerpos IgY desarrollada en el primer método. La presente invención también comprende a la composición como tal de los anticuerpos policlonales IgY.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION ☒ PCT _____ MODELO DE UTILIDAD _____ DISEÑO INDUSTRIAL _____

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional:

(71) Solicitante(s) **FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DEL NORTE**

(72) Inventor(es): Eduardo Egea, Luis Alejandro Barrera, Johana Espejo, Elkin Navarro, Gloria Garavito, Dary Luz Mendoza

(74) Apoderado: **CARLOS R. OLARTE**

(30) Prioridad

(31) **No. Prioridad**

(32) **Fecha**

(33) **País**

09-008.859

30/01/2009

CO

09-027.540

17/03/2009

CO

(85) Fecha límite inicio fase nacional:

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **Fecha (dd/mm/aa)**

Fecha de presentación de la solicitud: **Fecha (dd/mm/aa)**

N° publicación: **WO**

No. de solicitud **PCT/**

(54) Título: **MÉTODO Y COMPOSICIÓN INMUNOQUÍMICA PARA LA DETECCIÓN DE ALÉRGENOS DE ÁCAROS USANDO ANTICUERPOS POLICLONALES IgY**



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION X PCT MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud: 17/03/2009	
(51) Clasificación Internacional:			
(71) Solicitante(s) FUNDACION UNIVERSIDAD DEL NORTE			
(72) Inventor(es) Eduardo Egea, Luis Alejandro Barrera, Johana Espejo, Elkin Navarro, Gloria Garavito, Dary Luz Mendoza			
(74) Apoderado: CARLOS R. OLARTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	09-008.859	30/01/2009	CO
	09-027.540	17/03/2009	CO
(85) Fecha límite inicio fase nacional:		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solici. PCT		Fecha:	
Fecha de presentación de la solicitud:		No. Publicación: WO	
No. de solicitud PCT/			

(54) Título: **MÉTODO Y COMPOSICIÓN INMUNOQUÍMICA PARA LA DETECCIÓN DE ALÉRGENOS DE ÁCAROS USANDO ANTICUERPOS POLICLONALES IgY**

(57) Resumen

La presente invención corresponde a un método para la obtención de una composición de anticuerpos policlonales IgY útil como reactivo de diagnóstico de bajo costo y alta reactividad frente a ácaros intradomiciliarios, y a un método para la detección de alérgenos de ácaros que emplea la composición de anticuerpos IgY desarrollada en el primer método. La presente invención también comprende a la composición como tal de los anticuerpos policlonales IgY.



No. 10-024590-00000-0000

Fecha: 2010-03-02 16:57:42 Dep.: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act: 411 PRESENTACION Folios: 44

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD

☐

Art 33 Decisión 486/00

☒

Indicación que se solicita una patente.

☒

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☒

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa

☐

Incompleta

☐

PATENTE DE INVENCION PCT

☐

MODELO DE UTILIDAD PCT

☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐

Indicación que se solicita una PCT

☐

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa

☐

Incompleta

☐

DISEÑO INDUSTRIAL

☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa

☐

Incompleta

☐

ESQUEMA DE TRAZADO

☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa

☐

Incompleta

☐