

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-108957- -00000-0000

Fecha: 2013-04-30 11:02:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 59

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ CUANTIFICACION Y CARACTERIZACION DE ALERGENOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ DOW AGROSCIENCES LLC

DOMICILIO _____ INDIANAPOLIS, INDIANA, U.S.A.

74. APODERADO _____ LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO de radicación
No. 13-108967- -00000-0000
Fecha: 2013-04-30 11:02:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 59

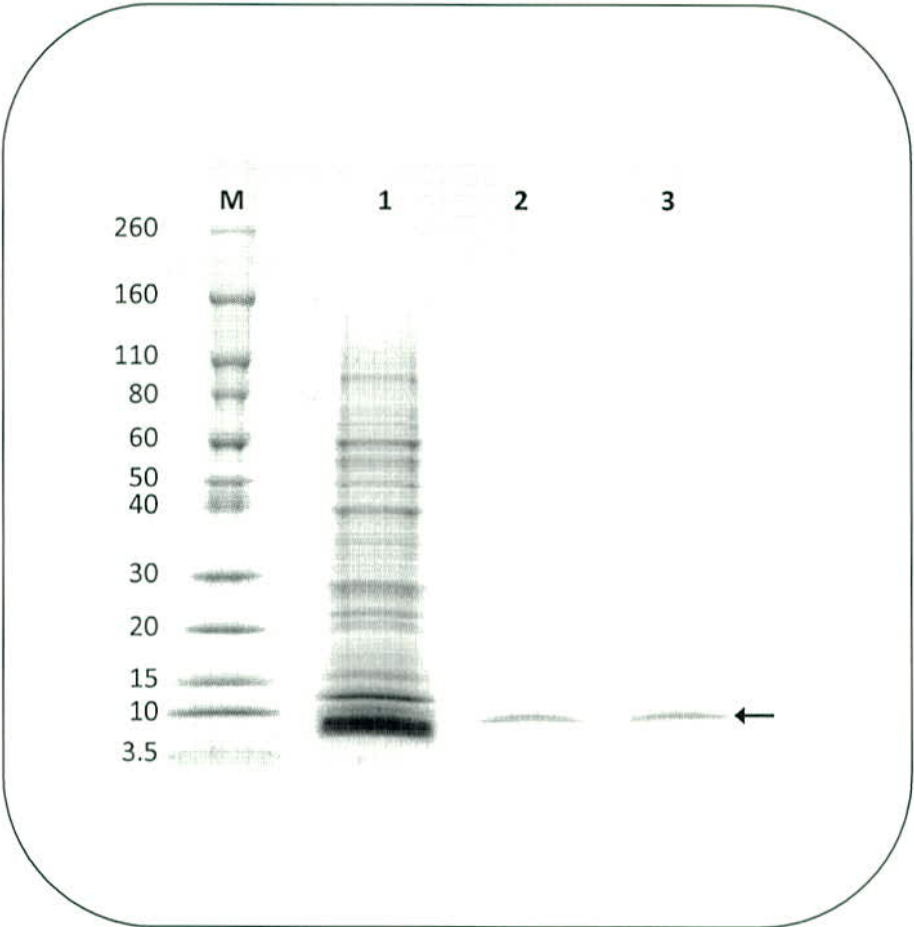
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención	☐ Patente de Modelo de Utilidad
		☒ Capítulo I	☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
	Solicitud Internacional No.	PCT/US2011/048645	Fecha 2011/08/22
	Publicación Internacional No.	WO 2012/044411 A3	Fecha 2012/04/05
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALÉRGENOS			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
	G01N 030/002, G01N 030/072, G01N 030/074, G01N 033/000, G01N 033/068		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
1.	DOW AGROSCIENCES LLC		
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
	DIRECCIÓN	9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268, Estados Unidos de América	No. TELÉFONO 3 47 36 11
	CIUDAD	Indianapolis	CORREO ELECTRÓNICO clientes@cavelier.com
	DEPARTAMENTO/ESTADO	Indiana	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
	PAÍS DE RESIDENCIA	Estados Unidos de América	Estado de Delaware, Estados Unidos de América
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1.	YOUNG	Scott A.	Estadounidense
2.	SCHAFER	Barry W.	Estadounidense
3.	KUPPANNAN	Krishna	Hindú
4.	JULKA	Samir	Hindú
5.	ALBERS	David R.	Estadounidense
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
	PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD DIRECCIÓN
1.	Estados Unidos de América	Michigan	Midland 4400 Partridge Lane, Midland, Michigan 48640,
2.	Estados Unidos de América	Indiana	Cicero 23229 Marin Drive, Cicero, Indiana 46034,
3.	Estados Unidos de América	Michigan	Midland 1403 Colorado Street, Midland, Michigan 48642,
4.	Estados Unidos de América	Michigan	Midland 5816 Tennis Court, Midland, Michigan 48642,
5.	Estados Unidos de América	Michigan	Midland 1314 Whitehall, Midland, Michigan 48642,
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			

9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO				
APELLIDOS De Páez		NOMBRES Luz Clemencia		IDENTIFICACIÓN C.C . 35.456.344 T.P . 23.555	
DIRECCIÓN Carrera 4ª No. 72-35		No. TELÉFONO 3 47 36 11		CORREO ELECTRÓNICO cavelier@cavelier.com	
CIUDAD BOGOTA		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL			
PAÍS COLOMBIA					
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO				
(33) PAÍS DE ORIGEN U.S.A.		CÓDIGO PAÍS US		(31) NÚMERO 61/388,748	(32) FECHA (AAAA/MM/DD) 2010/10/01
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS				
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>					
☐ SI ☐ NO					
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.					
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES				
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>					
☐ SI ☐ NO					
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.					
13	REDUCCIÓN DE TASAS				
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>					
☐ SI ☐ NO					
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.					
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐					
Universidades públicas o privadas ☐					
Entidades sin ánimo de lucro ☐					
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos					
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO				
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.					
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO		No. <u>13-0038050</u> No. <u>13-0038038</u>		Fecha: <u>2013/04/23</u> Fecha: <u>2013/04/23</u>
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL				
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)					
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ			Firma <u>Luz Clemencia De Páez</u> <u>TPA 23.555 - CSI</u>		
C.C 35.456.344 de Usaquen			Tarjeta Profesional 23.555		

17	ANEXOS
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: <u>23</u> 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: <u>19</u> 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: <u>7</u> 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☒ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.	Documentación Jurídica 9. ☒ Poder de DOW AGROSCIENCES LLC 10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. (Declaraciones de acuerdo con la Regla 4.17 del PCT) 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$500.000. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por 9 reivindicaciones adicionales a 10 por \$270.000.

FIGURA CARACTERISTICA



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
5 April 2012 (05.04.2012)



(10) International Publication Number
WO 2012/044411 A3

(51) International Patent Classification:

G01N 30/02 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01) G01N 33/00 (2006.01)
G01N 30/74 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2011/048645

(22) International Filing Date:

22 August 2011 (22.08.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/388,748 1 October 2010 (01.10.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **DOW AGROSCIENCES LLC** [US/US]; 9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **YOUNG, Scott A.** [US/US]; 4400 Partridge Lane, Midland, Michigan 48640 (US). **SCHAFER, Barry W.** [US/US]; 23229 Marin Drive, Cicero, Indiana 46034 (US). **KUPPANNAN, Krishna** [IN/US]; 1403 Colorado Street, Midland,

Michigan 48642 (US). **JULKA, Samir** [IN/US]; 5816 Tennis Court, Midland, Michigan 48642 (US). **ALBERS, David R.** [US/US]; 1314 Whitehall, Midland, Michigan 48642 (US).

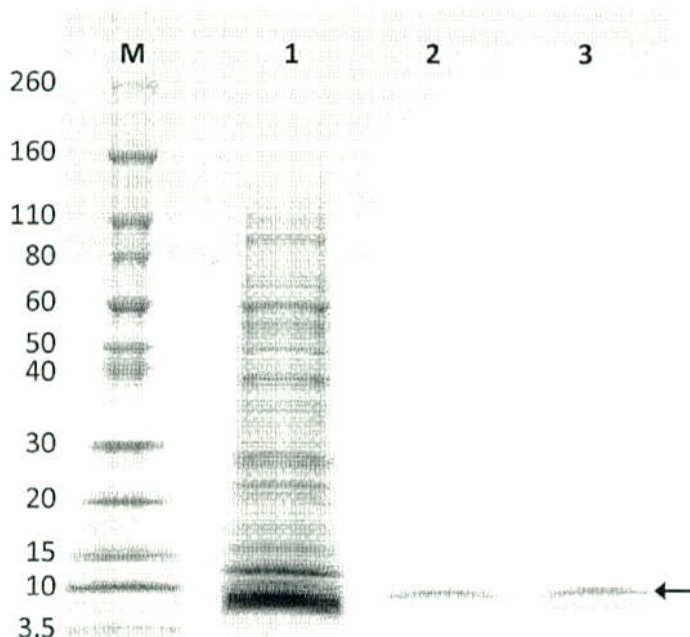
(74) Agents: **CATAXINOS, Edgar R.** et al.; TraskBritt, PO Box 2550, Salt Lake City, Utah 84110 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,

[Continued on next page]

(54) Title: QUANTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ALLERGENS



(57) Abstract: Embodiments of the invention include methods of determining the allergen content of a composition. Embodiments of the invention may include providing a composition comprising an allergen; at least partially purifying the allergen from the composition to form an extract; and determining the amount of allergen in the extract using liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection.

WO 2012/044411 A3

WO 2012/044411 A3

MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). — before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

(88) Date of publication of the international search report:
31 May 2012

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
5 April 2012 (05.04.2012)

(10) International Publication Number
WO 2012/044411 A2

PCT

- (51) International Patent Classification:
G01N 30/02 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01) G01N 33/00 (2006.01)
G01N 30/74 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2011/048645

(22) International Filing Date:
22 August 2011 (22.08.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/388,748 1 October 2010 (01.10.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US): DOW AGROSCIENCES LLC [US/US]; 9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): YOUNG, Scott A. [US/US]; 4400 Partridge Lane, Midland, Michigan 48640 (US). SCHAFER, Barry W. [US/US]; 23229 Marin Drive, Cicero, Indiana 46034 (US). KUPPANNAN, Krishna [IN/US]; 1403 Colorado Street, Midland, Michigan 48642 (US). JULKA, Samir [IN/US]; 5816 Tennis Court, Midland, Michigan 48642 (US). ALBERS, David R. [US/US]; 1314 Whitehall, Midland, Michigan 48642 (US).

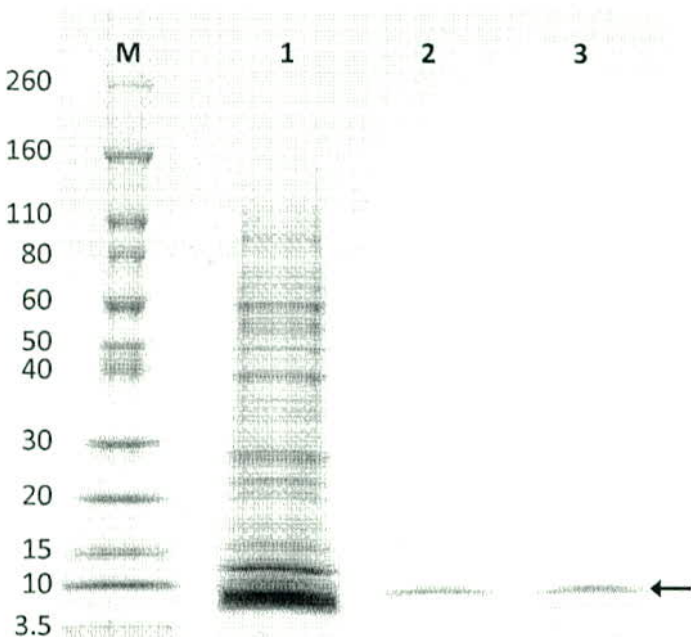
(74) Agents: CATAXINOS, Edgar R. et al.; TraskBritt, PO Box 2550, Salt Lake City, Utah 84110 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

[Continued on next page]

(54) Title: QUANTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ALLERGENS



(57) Abstract: Embodiments of the invention include methods of determining the allergen content of a composition. Embodiments of the invention may include providing a composition comprising an allergen; at least partially purifying the allergen from the composition to form an extract; and determining the amount of allergen in the extract using liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection.

WO 2012/044411 A2

WO 2012/044411 A2



EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *without international search report and to be republished
upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(ii))*

TÍTULO DE LA INVENCION

CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALÉRGENOS

RECLAMO DE PRIORIDAD

Esta solicitud reclama el beneficio de la fecha de presentación de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Número de Serial 61/388,748, presentada el 1 de octubre de 2010, para "CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALÉRGENOS."

ARTE PREVIO

Las proteínas de transporte de lípidos (LTPs - *Lipid Transfer Proteins*) son proteínas de bajo peso molecular, que se pensaba anteriormente que jugaban un papel fisiológico importante en transportar lípidos entre membranas *in vitro*. Las proteínas se han caracterizado en muchas especies de plantas y se encuentran en una variedad de tejidos y etapas evolutivas¹. Forman una familia multigénica y en las bases de datos genómicas se encuentran registradas más de 50 secuencias de aminoácidos de LTPs de plantas. Se han aislado dos familias principales con diferentes masas moleculares. Una está compuesta por proteínas con una masa molecular de alrededor de 9 kDa y la otra por proteínas con una masa molecular de 7 kDa, denominadas LTP1 y LTP2, respectivamente. Las proteínas LTP1 son básicas, presentando puntos isoelectrónicos (pI) de entre 9 y 10. Entre las secuencias conocidas de LTP1 todas se caracterizan por tener 90-95 residuos de aminoácidos, de los cuales ocho son cisteínas conservadas en posiciones similares a lo largo de la estructura primaria. Estos residuos de cisteína se encuentran involucrados en puentes disulfuro intramoleculares, los cuales se han conservado estrictamente entre LTP1s¹. Por lo demás, las LTPs no contienen residuos de triptófano aromático o fenilalanina. Dos residuos de tirosina bien conservados se localizan hacia los términos N y C de la estructura básica de los polipéptidos (*polypeptide backbone*). Las proteínas en ambas familias se sintetizan como proteínas precursoras y entran en la ruta secretora luego de una escisión del péptido señal. LTP1s de varias especies de plantas se localizan en la pared celular en semillas de *Arabidopsis thaliana*¹, *Zea mays*³, *Ricinus communis*⁴, y *Vigna unguiculata*^{5,6}.

El papel funcional de las LTPs en plantas se ha debatido extensivamente. En

10

granos de *R. communis*, se ha encontrado una isoforma de LTP dentro de un organelo, que se caracterizó como el glioxisoma. Se demostró que esta LTP aumenta la actividad de la enzima acetil-CoA oxidasa en pruebas *in vitro*, sugiriendo la implicación en la β -oxidación, posiblemente en la regulación del catabolismo del almacenamiento de lípidos⁶. En *Brassica oleracea* var. *italica*, se encontró LTP asociada con la superficie cerosa de las hojas. El patrón de expresión sugiere un papel de la LTP en el transporte de monómeros de cutina⁴. Además, se ha descrito que factores de estrés abiótico, tales como sequía, frío y sal, regulan por aumento miembros de la familia LTP en algunas especies de plantas^{1,7-9}. La estabilización de las membranas, la deposición de la cutícula y/o cambios en la organización de la pared celular se han aducido como sus presuntos papeles en las respuestas a estos factores de estrés^{7,9,10}. Adicionalmente, las LTPs tienen un papel potencial en el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluyendo embriogénesis¹, germinación¹¹ e interacción polen-pistilo¹². Aunque el papel de las LTPs continúa siendo todavía oscuro, el rol en los mecanismos de defensa de las plantas contra fitopatógenos tales como bacterias, hongos y virus parece estar bien establecido^{1,13,14}. Esto ha llevado a la clasificación de las LTPs como proteínas relacionadas con la patogénesis (PR - *pathogenesis-related*), las cuales se incluyen en la familia PR-14¹⁴.

Más aún, recientemente las LTPs se han identificado como alérgenos alimentarios vegetales. Se han identificado como alérgenos alimentarios completos, ya que son capaces de sensibilizar, es decir, inducir IgE específica, así como de provocar síntomas severos. Aparentemente las LTPs son un fuerte alérgeno alimentario, que es resistente al ataque proteolítico y al procesamiento de alimentos. La estabilidad le permite al alérgeno alcanzar el sistema inmunitario gastrointestinal en una conformación inmunogénica y alergénica, posibilitando la sensibilización y la inducción de síntomas sistémicos. Se ha informado la presencia de LTPs en frutos de rosáceas^{15,16,17} y vitáceas¹⁸, así como en otras especies de plantas tales como *Asparagus officinalis* y *B. oleracea* var. *capitata*^{19,20}. Recientemente, el grupo de Pastorello condujo un estudio exhaustivo en alérgenos del maíz. Se confirmó que LTP era el principal alérgeno del maíz detectando selectivamente sueros de 22 pacientes con síntomas sistémicos, luego de la ingestión de maíz, identificándose en 19 (86%) de los pacientes la proteína LTP de 9 kDa. En un estudio de seguimiento, se encontró que la LTP es una proteína extremadamente estable, y que mantiene la actividad de unión a IgE incluso después de una cocción a 100°C²². Además, la LTP del maíz parece ser asimismo resistente a la digestión gastrointestinal²³. Colectivamente, estas propiedades permiten que miembros de la clase LTP de

proteínas sean un fuerte alérgeno alimentario que puede causar reacciones graves. De un modo interesante, se ha descubierto que la LTP del maíz es un alérgeno relevante únicamente en Europa del Sur y asimismo en un pequeño grupo de pacientes de los Estados Unidos, sugiriendo que la sensibilización a la LTP es relativamente poco común²⁴. Es ampliamente conocido que ocho alimentos son responsables de más del 90% de las alergias alimentarias, incluyendo cacahuetes, nueces, trigo, leche, huevos, crustáceos, soya y pescado.

El papel de las LTP es aún en muchos casos oscuro porque la cuantificación absoluta y exacta de la proteína es difícil. Muchos de los estudios previos afrontan el reto de una extensiva preparación de las muestras o bioensayos *in vitro* inadecuados, no sensibles e inespecíficos. Los métodos analíticos comúnmente empleados para este propósito se basan en enfoques inmunológicos. Aunque, por lo general, los métodos inmunoquímicos son altamente sensibles y compatibles con un rendimiento elevado (*high throughput*), adolecen de especificidad limitada. Más aún, el desarrollo de anticuerpos para la proteína diana es un proceso dispendioso.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

Modalidades de la invención incluyen métodos de determinar el contenido de alérgeno de una composición. Modalidades de la invención pueden incluir proveer una composición que contiene un alérgeno; purificar por lo menos parcialmente el alérgeno de la composición para formar un extracto; y determinar la cantidad de alérgeno en el extracto usando cromatografía líquida con detección espectrométrica de masas y ultravioleta.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1 describe un análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE - *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) de LTP endógena de semilla de maíz luego de la purificación. M, marcadores de peso molecular; calle 1 extracto de semilla de maíz; calle 2, fracción LTP aislada de semilla de maíz durante análisis LC-UV; calle 3, referencia final LTP. La flecha indica la banda LTP detectada.

FIG. 2 describe un cromatograma LC-UV/MS (215 nm) de MW intacto del estándar de referencia LTP.

FIG. 3 representa un espectro de masas deconvolucionado de referencia LTP (recuadro: espectro de masas de la envoltura de carga múltiple).

FIG. 4 describe la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína de transporte de lípidos del maíz. Los péptidos Lys-C y tripsina usando huella peptídica (*peptide mass fingerprinting*) se subrayan y somborean, respectivamente.

FIG. 5(A) describe un cromatograma LC-UV/MS (215 nm) obtenido del análisis de extracto de granos de maíz, enriquecido con LTP de referencia, con una concentración de LTP total de 113,6 µg/mL, FIG. 5(B) describe un cromatograma LC-UV/MS (215 nm) obtenido del análisis de extracto de granos de maíz, enriquecido con LTP de referencia con una concentración de LTP total de 4,08 µg/mL, y FIG. 5(C) describe una curva estándar típica para la determinación de LTP en el rango de 4,1-147 µg/mL.

FIG. 6(A) describe un cromatograma UV (215 nm) de extractos de granos de maíz de la Línea #13. FIG. 6(B) describe un espectro de masas deconvolucionado de los componentes con el tiempo de retención de 12,34 minutos. FIG. 6(C) describe un cromatograma UV (215 nm) de extractos de granos de maíz de la Línea #5. El eje Y se ha normalizado a la Línea #13 de granos de maíz. FIG. 6(D) describe un espectro de masas deconvolucionado de los componentes con el tiempo de retención de 12,74 minutos. FIG. 6(E) describe un cromatograma UV (215 nm) de extractos de granos de maíz de la Línea #5. El eje Y se ha normalizado a la Línea #4 de granos de maíz. FIG. 6(F) describe un espectro de masas deconvolucionado de los componentes con el tiempo de retención de 13,14 minutos.

MODO(S) PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Modalidades de la invención incluyen métodos de determinar el contenido de alérgeno de una composición. Modalidades de la invención pueden incluir proveer una composición que contiene un alérgeno; purificar por lo menos parcialmente el alérgeno de la composición para formar un extracto; y determinar la cantidad de alérgeno en el extracto usando cromatografía líquida con detección espectrométrica de masas y ultravioleta.

Tal como se emplea aquí, un "alérgeno" es cualquier sustancia que induce

una respuesta hipersensible o alérgica. En modalidades, el alérgeno puede ser un alérgeno conocido, v.g. una sustancia que es conocida por producir una respuesta hipersensible o alérgica en sujetos particulares. En modalidades, el alérgeno puede seleccionarse para análisis por los métodos de la invención, por la razón de que es un alérgeno conocido.

Tal como se emplea aquí, una "respuesta alérgica" o "alergia" es una respuesta hipersensible o hipersensibilidad causada por la exposición a un alérgeno particular, resultante en un marcado aumento en la reactividad a ese alérgeno luego de subsiguiente exposición.

En modalidades de la invención, la cromatografía líquida puede ser unidimensional o bidimensional.

Tal como se emplea aquí, "purificar por lo menos parcialmente el alérgeno de la composición para formar un extracto" significa, en el caso de composiciones sólidas que contienen el alérgeno, extraer por lo menos una porción del alérgeno de la composición sólida incorporándola en una composición fluida para formar un extracto apropiado para cromatografía líquida con detección espectrométrica de masas y ultravioleta. En modalidades, extraer por lo menos una porción del alérgeno de la composición sólida incorporándola en una composición fluida puede llevarse a cabo en cualquier manera al alcance de una persona de versación ordinaria en el arte. La extracción de proteínas u otros alérgenos de composiciones sólidas es bien conocida en el arte y puede llevarse a cabo en procesos de un solo paso o pasos múltiples. Ejemplos de técnicas que pueden utilizarse en la extracción de proteínas u otros alérgenos a partir de composiciones sólidas incluyen, pero no se limitan a, maceración, licuefacción, lisis, sonicación, ciclos de congelamiento/descongelamiento, homogenización, filtración, electroforesis, permeabilización, precipitación, desnaturalización, centrifugación, cromatografía, solubilización diferencial y filtración.

En el caso de composiciones líquidas que contienen el alérgeno, "purificar por lo menos parcialmente el alérgeno de la composición para formar un extracto," puede considerarse realizado por el paso de cromatografía líquida, que separará el alérgeno de uno o más de los demás componentes en el líquido.

En modalidades particulares, el alérgeno puede ser un alérgeno alimentario,

un alérgeno de un látex, y/o un aero-alérgeno. Ejemplos de alérgenos alimentarios incluyen, pero no se limitan a, alérgenos de un cereal alimenticio, cacahuetes, frijoles, guisantes, frutas, apio, ajonjolí, nueces, leche, huevos, crustáceos, pescado, o papa. Ejemplos de alérgenos de cereal alimenticio incluyen, pero no se limitan a, alérgenos de soya, maíz y trigo. En modalidades, el alérgeno puede ser proteína de transporte de lípidos de maíz.

Tal como se emplea aquí, "aero-alérgeno" es cualquier sustancia transportada por el aire que puede causar una respuesta alérgica. Ejemplos de aero-alérgenos incluyen, pero no se limitan a, pólenes y esporas.

Modalidades de métodos de acuerdo con la invención pueden comprender asimismo proveer o aislar una fuente de alérgeno purificado; y usar el alérgeno purificado para calibrar el equipo usado para realizar la cromatografía líquida con detección espectrométrica de masas y ultravioleta.

En otras modalidades, la composición que contiene el alérgeno puede comprender múltiples isoformas o variantes de un alérgeno. En modalidades adicionales, métodos de acuerdo con la invención pueden utilizarse para determinar cantidades de múltiples isoformas o variantes diferentes de un alérgeno en una muestra. En modalidades, la determinación de cantidades de isoformas o variantes diferentes de un alérgeno puede determinarse con un paso único de cromatografía líquida con un paso de detección espectrométrica de masas y/o ultravioleta.

Recientemente se han desarrollado exitosamente métodos LC-MS para cuantificar e identificar diferentes biomarcadores debido a su elevada especificidad, sensibilidad y precisión en matrices complejas^{25,26}. La cuantificación de proteínas por LC-MS puede llevarse a cabo en el nivel del péptido (péptidos distintivos después de la proteólisis) o en el nivel de la proteína (análisis de proteína intacta). La metodología de la cuantificación de proteínas analizando un péptido distintivo de tripsina, usando un análogo sintético isotópicamente marcado como el estándar interno se ha descrito en detalle²⁷. No obstante, el enfoque de péptido distintivo (*signature peptide*) puede plantear varios desafíos incluyendo, (a) tener que encontrarse un péptido apropiado cuya secuencia sea específica únicamente a la proteína de interés²⁷, (b) el comportamiento del estándar interno puede diferir significativamente, comparado con el de la proteína intacta antes de la digestión, y (c) se basa en que la digestión con tripsina de la proteína sea completa²⁸. La

cuantificación de la proteína intacta por LC-UV/MS evita el paso dispendioso y potencialmente problemático de la digestión. Además, pueden resolverse y cuantificarse diferentes isoformas o variantes que podrían pasarse por alto por un enfoque de péptido distintivo.

Como se describe aquí, LTP y análogos se purificaron y se caracterizaron a partir de granos de maíz. Para obtener una especificidad y sensibilidad elevadas para la detección de LTP, se desarrolló un método LC-UV/MS para identificación y cuantificación rápidas. Este método se desarrolló para demostrar la especificidad, sensibilidad y exactitud de la cuantificación del análisis en la comparación de 14 líneas de maíz. El uso de LC-UV/MS puede resultar en una manipulación de las muestras reducida al mínimo, menor tiempo de análisis, y permitir una cuantificación precisa de las muestras de la composición para la evaluación de las concentraciones de alérgeno.

EJEMPLOS

La presente invención se describe con mayor detalle en los siguientes ejemplos, los cuales se ofrecen a modo de ilustración y no pretenden limitar la invención en modo alguno.

Métodos y Materiales Usados en los Ejemplos:

Materiales:

Bicarbonato de amonio y amortiguador MES se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO). Alcohol isopropílico (IPA) grado HPLC, hidróxido de amonio grado oligoelemento metálico, hidróxido de sodio, cloruro de sodio, glicerol, ácido trifluoroacético (TFA) grado LC/MS, cloruro de hidrógeno, ditioeritritol (DTE) y β -mercaptoetanol se adquirieron de Thermo Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). Acetonitrilo (ACN) grado HPLC y metanol se adquirieron de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ). El sistema Steriflip de filtración en vacío, desechable, con filtro de membrana de 0,22 μ m se adquirió de Millipore (Billerica, MA). Columnas SP Sepharose de intercambio catiónico se adquirieron de GE Healthcare BioSciences (Piscataway, NJ). Insertos de viales de polipropileno para el autocargador de muestras se adquirieron de Agilent (Santa Clara, CA). Geles Tris-HCl 4-20% Criterion se adquirieron de Bio-Rad (Hercules, CA). Lys-C y tripsina se obtuvieron de Roche

Applied Sciences (Indianapolis, IN). Para todos los análisis, se usó agua desionizada Milli-Q (Millipore, Billerica, MA).

Preparación de LTP de Referencia: Purificación de LTP de semilla de maíz no transgénico.

La extracción y el aislamiento de la proteína LTP, derivada del maíz, se realizaron en la siguiente forma. Granos de maíz convencionales se molieron hasta obtener un polvo fino con un molino Robot Coupe (Modelo #: RSI 2Y-1, Robot Coupe USA, Inc.), que contenía una cantidad igual de hielo seco. Se descargó el hielo seco durante la noche a -20 °C y, al día siguiente, se re-suspendieron 50 gramos de granos pulverizados en 350 mL de 125 mM de amortiguador de bicarbonato de amonio. Se ajustó el pH de la mezcla a 8,0 con NaOH y la muestra se calentó a 72 °C durante 2 horas mezclando continuamente. El particulado insoluble se eliminó centrifugando la muestra a 37000g durante 5 minutos a 20 °C. El sobrenadante resultante se filtró a través de un papel filtrante grado P8 y la muestra se digirió con 5 mg de tripsina (Sigma Catálogo # T7168) durante la noche a 40 °C. Luego de la proteólisis, se redujo el pH de la muestra a 5,2 con HCl y la muestra se clarificó aún más por centrifugación a 30000g durante 15 minutos a 20 °C. El sobrenadante resultante se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y la muestra se cargó en una columna SP Sepharose (5 mL/minuto, mezclada 50/50 con agua Milli-Q), pre-equilibrada con 50 mM de amortiguador MES, pH 5,5 (amortiguador A). Luego de la carga de la muestra, la columna se lavó extensivamente en el amortiguador A hasta que la A_{280} se redujo a los valores de referencia. Las proteínas ligadas se eluyeron con un gradiente lineal de amortiguador A a amortiguador B (amortiguador A + 0,5 M NaCl) y las fracciones recogidas se examinaron por SDS-PAGE. Se combinaron las fracciones que contenían la proteína LTP de ~ 9 kDa y se determinó la concentración de la proteína mediante análisis cuantitativo de aminoácidos. Se tomaron alícuotas de las fracciones combinadas en viales y se almacenaron a -80 °C.

Preparación de la Muestra: Aislamiento de LTP y Variantes de LTP de Granos de Maíz.

La extracción de LTP de granos de maíz molidos se realizó como se informa previamente con algunas modificaciones.²¹ Concretamente, granos de maíz molido almacenados a -20 °C se descongelaron a temperatura ambiente en una caja seca (*dry box*) que contenía Dry-Rite™. Se pesaron aproximadamente 100 mg de granos

de maíz molidos y se agregaron 700 μ L de 0,125 M de amortiguador de bicarbonato de amonio, pH 8,3, y se mezclaron a 1.100 rpm durante 2 horas a 22 °C usando un ThermoMixer™. La muestra se clarificó por centrifugación a 16100g durante 30 minutos y el sobrenadante resultante se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5-mL. Antes de transferir una alícuota a un vial autocargador de muestras, se centrifugó el extracto nuevamente durante 2 minutos a 16100g.

Análisis SDS-PAGE y Digestión de la Proteína.

Para facilitar la identificación y la caracterización de la LTP se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) con geles Tris-HCl 4-20% Bio-Rad (Hercules, CA). En síntesis, las muestras se diluyeron en amortiguador de Laemmli con β -mercaptoetanol al 5%. La muestra resultante se centrifugó a 371g durante 45 segundos y luego se calentó a 95°C durante 1,5 minutos. Las proteínas separadas se detectaron con azul Coomassie brillante R-250. Luego de la separación y la tinción, las bandas de proteína de interés se escindieron y se incubaron con tripsina o Lys-C a 37°C durante la noche. Los péptidos se extrajeron de los geles con ACN al 50% y TFA al 0,5% en 25 mM de amortiguador de bicarbonato de amonio. Los péptidos que quedaron en el gel se extrajeron luego con ACN al 70% y ácido fórmico al 5% en 25 mM de amortiguador de bicarbonato de amonio. Los extractos se combinaron y se secaron en un Vacufuge. Los péptidos secados se reconstituyeron en 18 μ L. Los péptidos proteolíticos resultantes se analizaron directamente mediante espectrometría de masas.

Condiciones Espectrométricas de Masas para Caracterización de LTP y Variantes.

Todos los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de masas Agilent 6520 Q-TOF con un sistema de Cromatografía Líquida Agilent 1200SL. La cromatografía se llevó a cabo por elución de gradiente de una columna C18 Acquity BEH130 (Waters, Milford, MA) a 50 °C con dimensiones de la columna de 100 x 2,1 mm y un tamaño de partícula de 1,7 μ m en un sistema Agilent 1200SL Agilent (Santa Clara, CA). La columna se equilibró usando 95% de fase móvil A (0,1 % (v/v) FA en agua; MPA) y 5% de fase móvil B (0,1 % (v/v) FA en acetonitrilo; MPB) con un caudal de 200 μ L/minuto. Los volúmenes de inyección se variaron entre 5 y 20 μ L. Se empleó un gradiente lineal de 5% MPB a 40% MPB durante 17,2 minutos y de 40% MPB a 45% MPB durante 1,7 minutos. La columna se re-equilibró entonces a las condiciones iniciales durante 6 minutos.

Se obtuvieron datos UV (210 - 600 nm) y MS (200 - 1800 amu, 1 Hz). Los datos UV se obtuvieron usando un detector de arreglo de diodos Agilent 1200SL Agilent (Santa Clara, CA). Se llevó a cabo ionización positiva por electroaspersión (ESI) en un espectrómetro de masas 6520 QTOF Agilent (Santa Clara, CA) con una fuente de iones ESI dual. Los parámetros instrumentales para la adquisición de espectros de masas fueron los siguientes: VCap se fijó en 3500 V, fragmentor en 145 V, skimmer1 en 65 V, temperatura de gas en 350 °C, flujo de gas en 8 L/minuto, nebulizador en 310 kPa. Durante los experimentos MS en tándem, se empleó MS/MS dirigida (*targeted MS/MS*) con rangos de exclusión estática. Se aislaron los picos para MS en tándem con un ancho de 9 amu y se aplicó una energía de colisión incrementada (*ramped collision energy*) de 3,6V/100Da + 2V. Todos los datos obtenidos (MS y MS/MS) se procesaron manualmente.

Condiciones de Espectrometría de Masas y Cromatográficas para la Caracterización y la Cuantificación.

Se realizó cromatografía por elución de gradiente de una columna C4 Acquity BEH300 (Waters, Milford, MA) a 70 °C con dimensiones de la columna de 100 x 2,1 mm y tamaño de partícula de 1,7 µm en un sistema Acquity UPLC (Waters, Milford, MA). La columna se equilibró usando 93% fase móvil A (0,1 % (v/v) TFA en agua; MPA) y 7% fase móvil B (0,1 % (v/v) TFA en IPA; MPB) con un caudal de 300 µL/minuto. Las muestras se inyectaron usando un modo de inyección de llenado en ciclo parcial (*partial loop fill injection mode*) y volúmenes de inyección de 5 µL. Se empleó un gradiente lineal de 7% MPB a 14,5% MPB durante 15 minutos; MPB se incrementó entonces linealmente a 50,5 % durante 7 minutos. La columna se re-equilibró entonces a las condiciones iniciales durante 5 minutos. Antes de la inyección de la muestra, la aguja del autocargador de muestras se lavó con IPA (lavado fuerte) y agua (lavado débil) para minimizar el arrastre de las muestras (*sample carryover*).

Se obtuvieron datos UV (215 nm, 10 Hz) y MS (700-2300 amu, 1 Hz). Los datos UV se obtuvieron usando un detector Acquity TUV Waters (Milford, MA). Los parámetros instrumentales para la adquisición de UV fueron los siguientes: longitud de onda a 215 nm, velocidad de muestreo a 10 puntos/segundo, y constante de tiempo a 0,2 segundos. Se llevó a cabo ionización positiva por electroaspersión (ESI) en un espectrómetro de masas Q-ToF*micro*[™] (Waters, Milford, MA) con un interface

lock-spray. Antes de la entrada MS, se inyectó (*was tee'd-in*) una solución de glicerol al 7 %/agua al 68 %/acetonitrilo al 25 % para mejorar la eficiencia de ionización en la presencia de ácido trifluoroacético. Los parámetros instrumentales para la adquisición de espectros de masas fueron los siguientes: el capilar se fijó en 2850 V, el cono de la muestra en 35 V, el cono de extracción en 1,5 V, la temperatura de desolvatación en 410 C, temperatura de la fuente en 100 C, resolución de masas alta y baja en 5, gas de desolvatación en 600 L/hora, gas de cono en 50 L/hora, detector MCP en 2350 V, tiempo de barrido 0,9 segundos, retraso *interscan* 0,1 segundo y energía de colisión en 10.

Desarrollo del Método

La cuantificación de LTP por ELISA ha sido el método de elección.²⁹ En el caso de la LTP de maíz, debido a la falta de un anticuerpo específico, se consideraron enfoques alternativos a la LTP cuantitativa. Esto llevó a la decisión de desarrollar un método para la determinación cuantitativa de LTP de maíz en la fracción soluble de extracto de maíz por análisis LC-UV/MS. La ausencia de residuos de triptófano en LTP de maíz motivó el uso de la longitud de onda de 215 nm. La longitud de onda de 215 nm se eligió cuidadosamente para minimizar la absorbencia de las fases móviles (IPA y TFA), maximizar la sensibilidad del analito y mantener constantes los valores de referencia en todo el gradiente del disolvente. Se ha demostrado previamente que el uso de IPA y temperatura elevada para separaciones de proteína de fase inversa es crítico para obtener una buena recuperación y resolución³⁰. Para abordar el problema de la especificidad, se monitoreó igualmente la respuesta MS. Para mejorar la respuesta del espectrómetro de masas en la presencia de TFA, se realizó un adición pre-MS de una solución de glicerol en una mezcla de agua/acetonitrilo. Se observó una relación aumentada de señal a ruido y un cambio a estados de carga más altos. La corriente de iones totales observada en la presencia de la mezcla de glicerol/agua/acetonitrilo fue equivalente a la señal observada en la presencia de ácido fórmico, el aditivo de la fase móvil. Se ha demostrado previamente que la adición de glicerol aumenta dramáticamente la ionización de proteína y los complejos de proteína durante la ionización por electroaspersión.³¹

Durante el desarrollo del método, se observó la unión de la LTP de referencia a los viales de vidrio. Esta pérdida de LTP debida a la adsorción se observó al analizar la LTP de referencia purificada. Para minimizar las pérdidas debidas a la

adsorción a los viales del autocargador de muestras, se usaron insertos de viales de polipropileno para todos los análisis. Adicionalmente, durante el análisis LC-UV/MS de la LTP de referencia, se incluyó asimismo albúmina sérica bovina en una concentración de 0,3 mg/mL. Tanto la adición de albúmina sérica bovina como el uso de viales de polipropileno fueron esenciales para mantener la linealidad con concentraciones más bajas.

Ejemplo 1: Caracterización MS de LTP.

Aunque las proteínas de transporte de lípidos son los principales alérgenos del maíz, los métodos para su cuantificación no han sido bien establecidos. Múltiples formas moleculares e isómeros de LTP se han observado en muchos tejidos diferentes; como resultado, el análisis requiere alta sensibilidad y selectividad debido a la baja concentración de las isoformas y las similitudes estructurales de estas proteínas. Esto llevó a la purificación y caracterización de LTP. La LTP endógena en granos de maíz se analizó por SDS-PAGE luego de la purificación. Como se muestra en Fig. 1, se observó una banda de proteína con aproximadamente 9 kDa, que representa una forma monomérica de LTP. Figs. 2 y 3 describen el cromatograma de iones totales y el espectro de masas correspondiente de la proteína purificada. El espectro de masas reveló la presencia de un componente principal que produce un ión $[M + H]^+$ en m/z 9047.1. Esta masa medida estaba dentro del 0,01% de un ión de masa precursora teórica $[M + H]^+$ en m/z 9046.

La identidad de la banda de proteína de aproximadamente 9 kDa se confirmó posteriormente por huella peptídica (PMF - *peptide mass fingerprinting*), luego de la digestión en gel, usando tripsina y proteasas Lys-C. Comparada con péptidos de tripsina y péptidos Lys-C basados en la secuencia de aminoácidos de la LTP del maíz, se consiguió la cobertura completa de la LTP (Figura 4). El péptido de tripsina N-terminal, AISCGQVASAIAPCISYAR, y el péptido C-terminal escindido con Lys-C, CGVSIPYTISTSTDCSRVN, se secuenciaron posteriormente para confirmación por MS/MS usando LC-MS/MS. La interpretación manual de los espectros MS/MS y MS de barrido completo de todos los estados de carga de precursor observados revelaron la secuencia. Cada residuo de aminoácido se confirmó en un mínimo, por una serie de iones y o b , generados por iones de fragmento.

Ejemplo 2: Experimentos de Validación.

La exactitud del análisis para medir LTP se evaluó analizando inyecciones duplicadas de extractos de granos de maíz enriquecidos con LTP de referencia en niveles de concentración elevados (en el rango de 4,1 a 147 $\mu\text{g/mL}$). Se realizó una calibración delimitada de punto único (*bracketed single point*) usando LTP de referencia (84,7 $\mu\text{g/mL}$). Para determinar la concentración de LTP en el extracto no enriquecido, se llevaron a cabo cinco inyecciones de extracto no enriquecido. Se calculó la exactitud del análisis (error relativo porcentual, % RE) y se presenta en Tabla 1 (*concentraciones de LTP se señalan tanto en términos de la concentración en la solución como la concentración correspondiente en la semilla.). Se determinó igualmente la linealidad del método usando los mismos datos. Se obtuvo una curva de linealidad graficando el área pico de LTP versus la concentración. Se empleó una regresión lineal para obtener una ecuación lineal en el rango de 4,1 - 147 $\mu\text{g/mL}$. Para cálculos de la curva de linealidad, la ecuación no se forzó hasta el origen.

Tabla 1. Exactitud Multi-Punto para LTP enriquecida en un Extracto de Granos de Maíz.

LTP Esperada, $\mu\text{g/g}^*$	LTP Esperada, $\mu\text{g/mL}^*$	LTP Observada, $\mu\text{g/mL}$	Exactitud (% RE)
28,6	4,1	4,2	3,5
43,6	6,2	6,3	1,6
58,0	8,3	8,3	0,00
142	20,3	19,5	-3,9
235	33,6	32,0	-4,7
332	47,5	45,3	-4,7
414	59,1	56,1	-5,1
513	73,3	74,9	2,1
596	85,1	84,9	-0,3
795	114	115	1,1
1030	147	144	-1,7
		Promedio	-1,1

Se evaluó la precisión del análisis para medir LTP en cada uno de cuatro días analizando tres preparaciones de réplica de granos molidos (inyecciones duplicadas para cada preparación) en tres niveles de concentración (baja, media y alta). Un conjunto de muestras durante cada día se limitó por un estándar de calibración de LTP de referencia de punto único (85 $\mu\text{g/mL}$). La precisión del análisis en un solo día y entre días subsiguientes (coeficiente porcentual de variación, % CV) se calculó y se presenta en Tabla 2.

Tabla 2. Precisión en un solo Día y entre Días subsiguientes para la

Determinación de LTP presente en tres diferentes Líneas de Maíz usando Calibración Estándar de Referencia de Punto Único.

Día/Analizador/		Conc. Muestra de Validación			Estadística
Instrumento	Estadística	Baja	Media	Alta	Combinada
1/A/X	Media (µg/g)	51,2	238	472	
	Precision (% CV)	4,0	7,7	15,8	10,4
	n	3	3	3	9
2/A/X	Media µg/g)	64,8	273	555	
	Precision (% CV)	6,7	1,8	8,4	6,3
	n	3	3	3	9
3/A/X	Media (µg/g)	51,3	233	480	
	Precision (% CV)	6,7	8,0	3,2	6,3
	n	3	3	3	9
4/B/Y	Media (µg/g)	53,7	227	472	
	Precision (% CV)	20,8	2,6	2,7	12,2
	n	3	3	3	9
Media Global	Media µg/g)	55,3	243	495	
	Precision (%CV)	14,4	9,1	10,7	11,6
	n	12	12	12	36

Los valores se han redondeado para mostrar dígitos significativos; los cálculos estadísticos se han hecho con total precisión.

Debido a la presencia de LTP endógena en todas las muestras de semilla de maíz, se midió la selectividad del análisis mediante la determinación de masa molecular intacta por ESI-LC/MS y análisis de la fracción LC (LTP) por SDS-PAGE. Adicionalmente, se evaluó el arrastre del analito (*analyte carryover*) analizando los blancos de disolvente inmediatamente después de la muestra estándar más alta. Para determinar la robustez del método, se investigaron los siguientes parámetros: eficiencia de la extracción, temperatura de la columna, concentración del TFA, y estabilidad de la solución de la LTP de referencia y extractos de granos de maíz.

Se determinó la eficiencia de la extracción de LTP de granos de maíz. Granos de maíz molidos de las líneas de referencia 3 y 13 se extrajeron mediante el protocolo detallado más arriba durante 1 hora, 2 horas, 5 horas o 17 horas. La concentración de la LTP extraída en estos diferentes puntos de tiempo se determinó

mediante análisis LC-UV/MS. Además, la muestra de extracción de 2 horas, luego del retiro de 400 µL de sobrenadante, se sometió posteriormente a una segunda ronda de extracción durante otras 2 horas con la adición posterior de 500 µL de amortiguador de bicarbonato de amonio. Luego de la extracción, se determinó la concentración de LTP mediante análisis LC-UV/MS y se aplicó una corrección para justificar el remanente de LTP de la primera ronda de extracción.

Se evaluaron el efecto de la temperatura de la columna (65°C, 70°C y 75°C) y la concentración de TFA (0,09 %, 0,1 % y 0,11 %) sobre la resolución cromatográfica y la cuantificación de LTP usando extractos de granos de maíz molidos. Para la determinación de la concentración, se analizó igualmente la LTP de referencia bajo las mismas condiciones experimentales.

Se evaluó la estabilidad de la LTP de referencia y los extractos de granos de maíz a temperatura ambiente y a 4°C durante un período de 48 horas. Una alícuota de extracto de granos de maíz y LTP de referencia se almacenaron a 4°C y a temperatura ambiente durante 48 horas. La respuesta de la LTP de referencia y el extracto de granos de maíz se midió inmediatamente después de la preparación de la muestra. Luego del almacenamiento, las muestras de estabilidad se analizaron mediante LC-UV/MS. Se evaluó la estabilidad comparando las muestras almacenadas con LTP de referencia recién preparada.

Para caracterizar las variantes de LTP con tiempos de retención de 12,7 y 13,1 minutos, 20 mL de extractos de granos de maíz (línea #5 de referencia) se inyectaron muchas veces y se recogieron fracciones manualmente. Las fracciones recogidas se combinaron, se evaporaron en un aparato Centrивap y se sometieron a SDS-PAGE. Bandas de proteína se escindieron y se sometieron a digestión con tripsina o Lys-C y se extrajeron los péptidos del gel. Los péptidos extraídos se analizaron entonces por LC-MS/MS.

Los extractos acuosos de granos de ciertas líneas de maíz contienen variantes de proteína que son similares en masa y tienen características similares de retención en la columna de fase inversa. La especificidad del método para resolver LTP de otras proteínas con características similares de retención de fase inversa puede inferirse de Figura 5. Aunque el pico con un tiempo de retención de 12,3 minutos en Figura 6 corresponde a LTP de maíz, el pico a 12,7 y 13,1 minutos corresponde a las variantes A y B de LTP, respectivamente. La resolución de los

valores de referencia (*baseline*) se obtiene para la separación de estas dos proteínas con una resolución medida de 1,6. La pureza del pico LTP se ilustra con más detalle en la SDS-PAGE mostrada en Figura 1 (calle 2). La posterior caracterización de las variantes A y B de LTP se condujo recogiendo las fracciones LC y sometiénolas a proteólisis en solución con tripsina o endoproteinasa Lys-C y analizando luego los péptidos por LC-MS/MS. La huella peptídica y los datos MS en tándem revelaron que la variante A de LTP tenía un polimorfismo de aminoácido único en la posición 34 (arginina a lisina). Esto se corroboró igualmente por la diferencia de 28 amu observada entre LTP y la variante A de LTP por mediciones de peso molecular intacto (Figura 6 B y D). Basándose en la huella peptídica parcial y el análisis de peso molecular intacto, no pudo (pudieron) confirmarse el (los) sitio(s) exacto(s) de modificación (+33 amu) para la variante B de LTP. Estos resultados ilustran con más detalle la especificidad del método LC-UV/MS desarrollado. La temperatura de la columna fue un factor crítico en obtener la resolución de estos dos componentes. Con temperaturas de 60°C y 90°C, la resolución entre estos dos pares de componentes fue inadecuada.

La presencia de LTP endógena en los granos de maíz complicó la preparación de muestras del estándar de referencia de LTP para la validación general del análisis. Por consiguiente, para desarrollar un estudio de validación, la concentración de LTP en extracto de granos de maíz no enriquecido se determinó primero usando del estándar de referencia de LTP. Se descubrió que el nivel de LTP endógena presente en la línea de granos de maíz usada para estudios de linealidad y precisión era de 58 µg/g. La linealidad y la precisión del análisis se midieron con 11 concentraciones usando extracto de granos de maíz enriqueciendo con LTP de referencia o diluyendo con amortiguador de bicarbonato de amonio. Se observó que el análisis era lineal en el rango de 4,1-147 µg/mL para LTP en extracto de granos de maíz (Figura 5) con un valor R^2 de 0,999. Este rango de concentración corresponde a 28,6 a 1030 µg/g de LTP en granos de maíz. El rango de precisión del análisis (% RE) fue de 0-5,1% con recuperaciones en el rango de 94,9 - 103 % (Tabla 1). Se observó una respuesta de señal a ruido de 215 con la concentración mínima medida de LTP, 4,1 µg/mL.

Para determinar la linealidad del método, se llevó a cabo una dilución en serie de la LTP de referencia en albúmina sérica bovina. Aunque se obtuvo una respuesta lineal con un valor R^2 de 0,999, se observó una rápida disminución del factor de respuesta (área/concentración) con concentraciones de LTP menores que 44,2

µg/mL. Esta disminución no se observó cuando LTP endógena en extracto de granos de maíz se diluyó en serie con amortiguador hasta una concentración de LTP de 10,4 µg/mL. Estas observaciones podrían ser indicativas de una pérdida de LTP, debida a la adsorción en la ausencia de componentes de la matriz.

Los resultados de la validación para la precisión en un solo día y entre días subsiguientes se presentan en Tabla 2. Se midió la precisión mediante el uso de tres diferentes líneas de granos de maíz, que previamente se había determinado que tenían concentraciones bajas, medias y altas de LTP. Se evaluó asimismo la precisión intermedia mediante el uso de dos analizadores, dos lotes de columnas, y dos diferentes sistemas LC. El rango de precisión (% CV) fue de 9,1 – 14,4 % con una desviación estándar relativa combinada de 11,6 % sobre todas las muestras en este período de cuatro días. Se descubrió que el arrastre absoluto presente en la muestra blanco, que siguió a la línea de granos de maíz con LTP elevada, era de aproximadamente 0,6 %. Esto se traduce en una concentración de LTP de 6 µg/g en los granos de maíz. Para mitigar aún más cualesquiera efectos de arrastre, los blancos de disolvente se pusieron en todo el conjunto para separar muestras de interés analítico.

Para determinar la eficiencia de la extracción, se midió la concentración de LTP extraída después de los pasos de extracción primero y segundo. Se aplicó un factor de corrección a la LTP extraída luego del segundo paso de extracción. Después de esta corrección, las concentraciones de la LTP extraída en los pasos de extracción primero y segundo fueron 32,1 y 1,61 µg/mL de la línea de referencia 3 y 88,2 y 8,75 µg/mL de la línea de referencia 13, respectivamente. La eficiencia de la extracción en el primer paso está entre 91 - 95 %. El efecto de la eficiencia del tiempo de extracción se determinó asimismo para las líneas de referencia 3 y 13 en 1 hora, 2 horas, 5 horas y 17 horas. Para la línea de referencia 3, las concentraciones de LTP fueron 204, 225, 241 y 220 µg/g, respectivamente. Para la línea de referencia 13, las concentraciones de LTP fueron 526, 619, 658 y 648 µg/g, respectivamente. Colectivamente, para ambas líneas de referencia la eficiencia de la extracción en 2 horas es 94 % de la eficiencia observada en 5 horas.

Se evaluó la variación de la temperatura de la columna y su efecto sobre la determinación de la concentración de LTP. Con temperaturas de la columna de 65°C, 70°C y 75°C, se determinó que las concentraciones de LTP eran 44,7, 48,1 y 47,2 µg/mL respectivamente. Luego de la variación, las concentraciones de TFA de 0,09

%, 0,1 % y 0,11 % en las fases móviles A y B, las concentraciones de LTP determinadas fueron 46,1, 43,8 y 47,1 µg/mL. Las desviaciones observadas aquí, debidas a la variación en la temperatura de la columna, y las concentraciones de TFA se encuentran dentro de la desviación estándar relativa porcentual (% RSD) del método.

Se evaluó la estabilidad del analito de la LTP de referencia en solución y la LTP en el extracto de granos a 4°C y temperatura ambiente. Se observó una pérdida de 1,91% y 4,75 % para la LTP de referencia en solución después de 48 horas a 4°C y temperatura ambiente, respectivamente. Se observó una pérdida de 8,3 % y 11,5% para la LTP en el extracto de granos después de 48 horas a 4°C y temperatura ambiente, respectivamente. Para dar cuenta de estas pérdidas, aunque la pérdida está dentro de la precisión del análisis, se analizó la LTP estándar de referencia al comienzo, a la mitad y al final de cada conjunto de muestras.

Ejemplo 3: Análisis de LTP en Líneas de Maíz

Catorce diferentes líneas de semillas de maíz se prepararon en triplicado como se describe. Inyecciones duplicadas de cada preparación se sometieron a análisis LC-UV/MS. El análisis se delimitó por un estándar de referencia LTP de punto único como el calibrante. El calibrante se diseminó durante el análisis de las líneas de referencia. El factor de respuesta de la LTP de referencia se utilizó para determinar el nivel de LTP y las dos variantes (a y b) en tiempos de retención de 12,7 y 13,1 minutos, respectivamente. Los resultados se presentan en Tabla 3.

Tabla 3. Determinación de LTP y variante A de LTP y B de LTP de diferentes líneas de maíz.

Línea#	Nombre de la Línea	Concentración LTP, µg/g	Precisión (% CV)	Concentración, LTP Variante A µg/g	Precisión (%CV)	Concentración, LTP Variante B µg/g	Precisión (%CV)	Combinada µg/g
1	CROP LAN 691	575	5,1	44	12,0	42.4	3,5	661
2	DEKALB DKC62-30	218	5,2	345	4,8	44.6	8,1	607
3	DEKALB DKC63-43	203	1,4	346	0,8	49.2	4,4	598
4	LG 2597	304	3,3	49	12,9	51,6	15,5	405
5	LG2615CL	286	5,6	528	4,5	47,4	11,7	861
6	PIONEER 32T16	466	10,0	31,2	30,1	20,5	11,5	518
7	MIDLAND PHILLIPS 7B15P	58.4	3,0	261	3,0	22.0	7,5	341
	NORTHRU P KING							

8	NK72-G8	74.3	3,4	319	5,0	38,2	4,5	432
9	LG2620	512	9,4	56.9	15,4	38,7	12,8	608
10	PIONEER 33T56	422	2,6	228	1,8	42,0	3,6	692
11	MYCOGEN 2M796	126	14,5	503	9,9	25,3	25,7	654
12	BURRUS6 45	72.3	15,3	284	5,6	20,3	20,2	377
13	MYCOGEN 2M746-1	678	5,6	59,7	10,4	43,0	10,6	781
14	MYCOGEN 2M746-2	516	12,7	42,0	32,3	27,4	23,2	586

Los valores se redondearon para mostrar dígitos significativos; los cálculos estadísticos se hicieron con precisión total. El % CV reportado se basa en µg/g.

El nivel de LTP y sus variantes presentes en 14 líneas de granos de maíz de interés se determinó usando el análisis desarrollado. La concentración de LTP y las variantes A y B en las 14 líneas varió entre 58 - 678 µg/g, 31-528 µg/g, y 21-52 µg/g, respectivamente (Tabla 3). Previamente se ha demostrado que el nivel de expresión de LTP es dependiente del tejido que se está analizando y la etapa de desarrollo del tejido³. Este estudio muestra que los niveles variables de LTP en granos de maíz pueden depender de los antecedentes genéticos o condiciones de cultivo de las líneas individuales de maíz. La precisión (% CV) obtenida para el análisis de las 14 líneas de maíz es consistente con la precisión del análisis determinada durante los estudios de validación. Estos resultados indican que los niveles de LTP pueden medirse reproduciblemente usando el método de análisis.

Ejemplo 4: Análisis de Composiciones que Contienen Alérgeno

Se obtienen extractos de alérgenos de cereales alimenticios, cacahuetes, nueces, leche, huevos, crustáceos, pescado, o papas, así como estándares de referencia para cada alérgeno. Inyecciones duplicadas de cada extracto se someten a análisis LC-UV/MS. El análisis se delimita por un estándar de referencia de punto único como el calibrante. El calibrante se diseminó igualmente durante el análisis de las líneas de referencia. El factor de respuesta del estándar de referencia se utilizó para determinar el nivel de alérgeno y sus variantes. La precisión (% CV) obtenida por el análisis de los diferentes extractos es consistente con la precisión del análisis determinada durante los estudios de validación. Estos resultados indican que los niveles de alérgeno pueden medirse reproduciblemente usando el método de análisis.

Aunque esta invención se ha descrito en ciertas modalidades, la presente

invención puede modificarse aún más dentro del espíritu y ámbito de la divulgación. Por lo tanto, esta solicitud pretende cubrir cualesquiera variaciones, usos, o adaptaciones de la invención usando sus principios generales. Además, esta solicitud pretende cubrir tales desviaciones de la presente divulgación como surgen dentro de la práctica conocida o rutinaria en el arte al cual pertenece esta invención y que caen dentro de los límites de las reivindicaciones anexas.

REFERENCIAS

1. Kader, J.-C, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1996, 47, 627-654.
2. Thoma S.L.; Kaneko Y.; Somerville C. *Plant J* 1993, 3, 427-37.
3. Sossountzov, L.; Ruiz-Avila, L.; Vignols, F.; Jolliot, A.; Arondel, V.; Tchang, F.; Grosbois, M.; Guerbette, F.; Miginiac, E.; Delseny, M.; Puigdomenech, P.; Kader, J.-C. *The Plant Cell*, 1991, 3, 923-933.
4. Pyee, J.; Yu, H.; Kolattukudy, P.E. *Arch Biochem Biophys* 1994, 311, 460-468.
5. Carvalho, A.O.; Teodoro, C.E.S.; Da Cunha, M.; Okorokova-Facanha, A.L.; Okorokov, L.A.; Fernandes, K.V.S.; Gomes, V.M. *Physiol Plant* 2004, 122, 328-336.
6. Tsuboi, S.; Osafune, T.; Tsugeki, R.; Nishimura, M.; Yamada, M. *J. Biochem.* 1992, 111, 500-508.
7. Kader, J.C. *Trends Plant Sci.* 1997, 2, 66-70.
8. Gaudet, D.; Laroche, A.; Frick, M.; Huel, R.; Puchalski, B. *Physiol. Plant.* 2003, 117, 195-205.
9. Bubier, J.; Schlappi, M. *Plant Cell Environ.* 2004, 27, 929-936.
10. Douliez, J.; Michon, T.; Elmorjani, K.; Marion, D. *J. Cereal Sci.* 2000, 32, 1-20.
11. Eklund, D.M.; Edqvist, J. *Plant Physiol.* 2003, 132, 1249-1259.
12. Park, S.Y.; Jauh, G.Y.; Mollet, J.C; Eckard, K.J.; Nothnagel, E.A.; Walling, L.L.; Lord, E.M. *Plant Cell* 2000, 12, 151-164.
13. Garcia-Olmedo, F.; Molina, A.; Segura, A.; Moreno, M. *Trends Microbiol.* 1995, 3, 72-74.
14. van Loon, L.; van Strien, E. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1999, 55, 514-519.

15. Diaz-Perales, A.; Garcia-Casado, G.; Sanchez-Monge, R.; Garcia-Salles, F.J.; Barber, D.; Salcedo, G. *Clin. Exp. All.* 2002, 32, 87-92.
16. Pastorello, E.A.; Farioli, L.; Pravettoni, V.; Ortolani, C; Ispano, M.; Monza, M.; Baroglio, C; Scibola, E.; Ansaloni, R.; Incorvaia, C; Conti, A. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999, 103, 520-526.
17. Pastorello, E.A.; Farioli, L.; Pravettoni, V.; Giuffrida, M.G.; Ortolani, C; Fortunato, D.; Trambaioli, C; Scibola, E.; Calamari, A.M.; Robino, A.M.; Conti, A. *J. Chrom. B. Biomed. Sci. Appl.* 2001, 756, 95-103.
18. Pastorello, E.A.; Farioli, L.; Pravettoni, V.; Ortolani, C; Fortunato, D.; Giuffrida, M.G.; Perono Garoffo, L.; Calamari, A.M.; Brenna, O.; Conti, A. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003, 111, 350-359.
19. Diaz-Perales, A.; Tabar, A.I.; Sanchez-Monge, R.; Garcia, B.E.; Gomez, B.; Barber, D.; Salcedo, G. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002, 110, 790-796.
20. Palacin, A.; Cumplido, J.; Figueroa, J.; Ahrazem, O.; Sanchez-Monge, R.; Carrillo, T.; Salcedo, G.; Blanco, C. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006, 117, 1423-1429.
21. Pastorello, E.A.; Farioli, L.; Pravettoni, V.; Ispano, M.; Scibola, E.; Trambaioli, C; Giuffrida, M.G.; Ansaloni, R.; Godovac-Zimmermann, J.; Conti, A.; Fortunato, D.; Ortolani, C. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000, 106, 744-751.
22. Pastorello, E.A.; Pompei, C; Pravettoni, V.; Farioli, L.; Calamari, A.M.; Scibilia, J.; Robino, A.M.; Conti, A.; Iametti, S.; Fortunato, D.; Bonomi, S.; Ortolani, C. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003, 112, 775-783.
23. Maleki, S.J. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2004, 4, 241-245.
24. Nakajima, O.; Teshima, R.; Takagi, K.; Okunuki, H.; Sawada, J. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2007, 47, 90-95.
25. Ji, Q. C; Rodila, R.; Gage, E. M.; El-Shourbagy, T. A. *Anal. Chem.* 2003, 75, 7008-7014.
26. Czerwenka, C; Maier, I.; Potocnik, N.; Pittner, F.; Lindner, W. *Anal. Chem.* 2007, 79, 5165-5172.

27. Kirkpatrick, D.S.; Gerber, S.A.; Gygi, S.P. *Métodos* 2005, 35, 265-273.
28. Barnidge, D. R.; Hall, G. D.; Stacker, J. L.; Muddiman, D. C. *Proteome Res.* 2004, 3, 658-661.
29. Borges, J.P.; Jauneau, A.; Brule, C; Culerrier, R.; Barre, A.; Didier, A.; Rouge, P. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, 44(10), 535-542.
30. Dillon, T.M.; Bondarenko, P.V.; Rehder, D.S.; Pipes, G.D.; Kleemann, G.R.; Ricci, M.S. *J. Chrom. A*, 2006, 1120, 112-120.
31. Iavarone, A.T.; Jurchen, J.C.; Williams, E.R. *Anal. Chem.* 2001, 73, 1455-1460.
32. Sossountzov, L.; Ruiz-Avila, L.; Vignols, F.; Jolliot, A.; Tchang, V.A.F.; Grosbois, M.; Guerbette, F.; Miginiac, E.; Delseny, M.; Puigdomenech, P.; Kader, J-C. *The Plant Cell*, 1991, 5, 923-933.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Un método de determinar el contenido de alérgeno de una composición, método que comprende:
proveer una composición que contiene un alérgeno;
purificar por lo menos parcialmente el alérgeno de la composición para formar un extracto; y determinar la cantidad de alérgeno en el extracto usando cromatografía líquida con detección espectrométrica de masas y/o ultravioleta.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cromatografía líquida es cromatografía líquida bidimensional.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el alérgeno es un alérgeno alimentario, un alérgeno de un látex, y/o un aero-alérgeno.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el alérgeno alimentario es un alérgeno de un cereal alimenticio, cacahuete, nuez, leche, huevo, crustáceo, pescado, o papa.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el alérgeno de cereal alimenticio es proteína de transporte de lípidos de maíz.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el aero-alérgeno es un polen o una espora.

7. Un método de determinar el contenido de alérgeno de una composición, método que comprende:
proveer una composición que contiene un alérgeno;
purificar por lo menos parcialmente el alérgeno de la composición para formar un extracto;
determinar la cantidad de alérgeno en el extracto usando cromatografía líquida con detección espectrométrica de masas y/o ultravioleta;
proveer una fuente de alérgeno purificado; y

33

calibrar el equipo utilizado para realizar la cromatografía líquida con detección espectrométrica de masas y/o ultravioleta con la fuente de alérgeno purificado.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la cromatografía líquida es cromatografía líquida bidimensional.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el alérgeno es un alérgeno alimentario, un alérgeno de un látex, y/o un aero-alérgeno.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el alérgeno alimentario es un alérgeno de un cereal alimenticio, cacahuete, nuez, leche, huevo, crustáceo, pescado, o papa.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el alérgeno de cereal alimenticio es proteína de transporte de lípidos de maíz.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el aero-alérgeno es un polen o una espora.

13. Un método de determinar el contenido de alérgeno de una composición, método que comprende:

proveer una composición que contiene múltiples isoformas o variantes de un alérgeno;

purificar por lo menos parcialmente el alérgeno de la composición para formar un extracto; y determinar la cantidad de alérgeno en el extracto usando cromatografía líquida con detección espectrométrica de masas y ultravioleta.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde determinar la cantidad de alérgeno en el extracto usando cromatografía líquida con detección espectrométrica de masas y ultravioleta comprende determinar las cantidades de una o más variantes o isoformas del alérgeno con detección espectrométrica de masas y ultravioleta.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la cromatografía líquida es cromatografía líquida bidimensional.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el alérgeno es un alérgeno alimentario, un alérgeno de un látex, y/o un aero-alérgeno.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el alérgeno alimentario es un alérgeno de un cereal alimenticio, cacahuete, nuez, leche, huevo, crustáceo, pescado, o papa.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el alérgeno de un cereal alimenticio es proteína de transporte de lípidos de maíz.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el aero-alérgeno es un polen o una espora.

CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALÉRGENOS

RESUMEN

Modalidades de la invención incluyen métodos de determinar el contenido de alérgeno de una composición. Modalidades de la invención pueden incluir proporcionar una composición que contiene un alérgeno; purificar por lo menos parcialmente el alérgeno de la composición para formar un extracto; y determinar la cantidad de alérgeno en el extracto usando cromatografía líquida con detección espectrométrica de masas y ultravioleta.

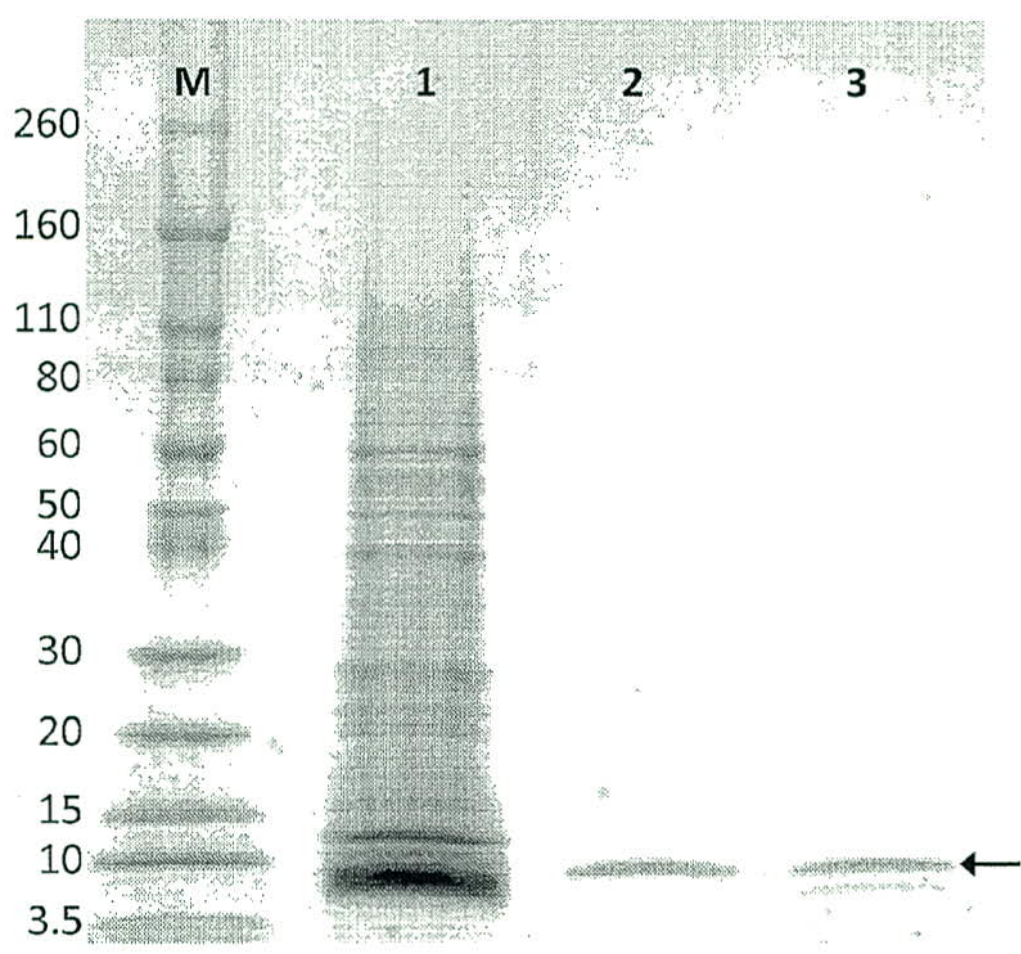


Fig. 1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

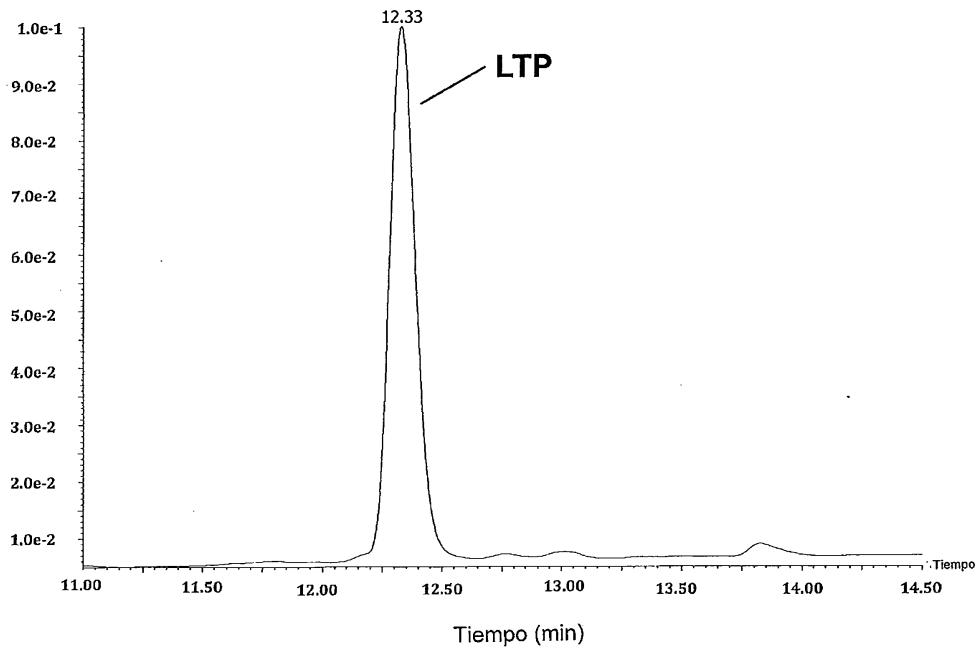


Fig. 2

27

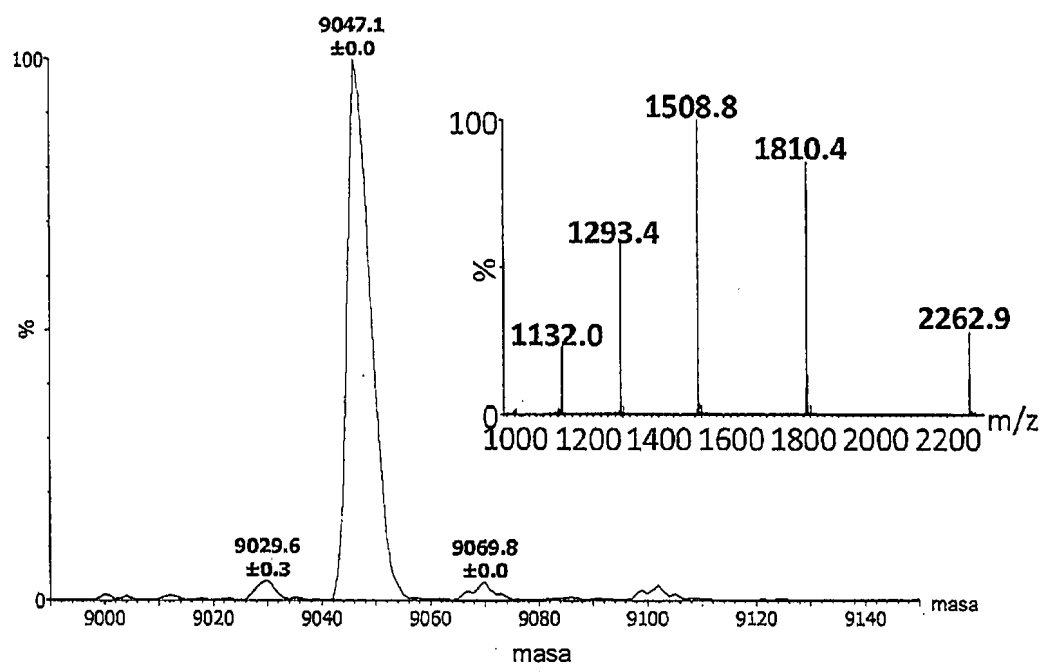


Fig. 3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

1 AISCGQVASAIAPCISYARGQSGPSAGCCS 31
32 GVRSLNNAARTTADRRAACNCLKNAAAGVSG 62
61 LNAGNAASIPSKCGVSIPYTISTSTDCSRVN 93

Fig. 4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

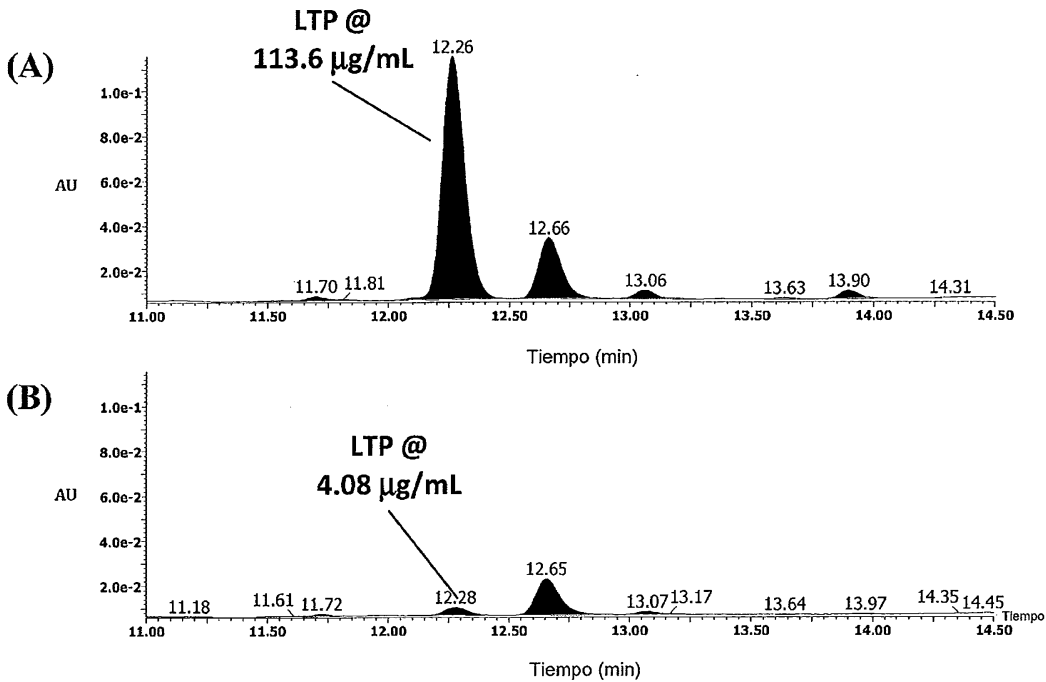


Fig. 5

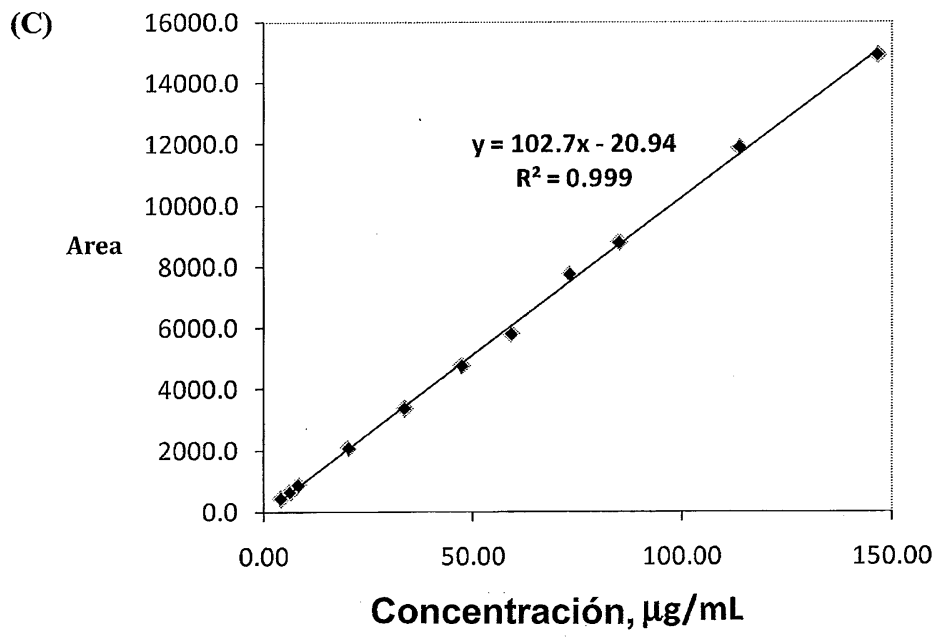


Fig. 5

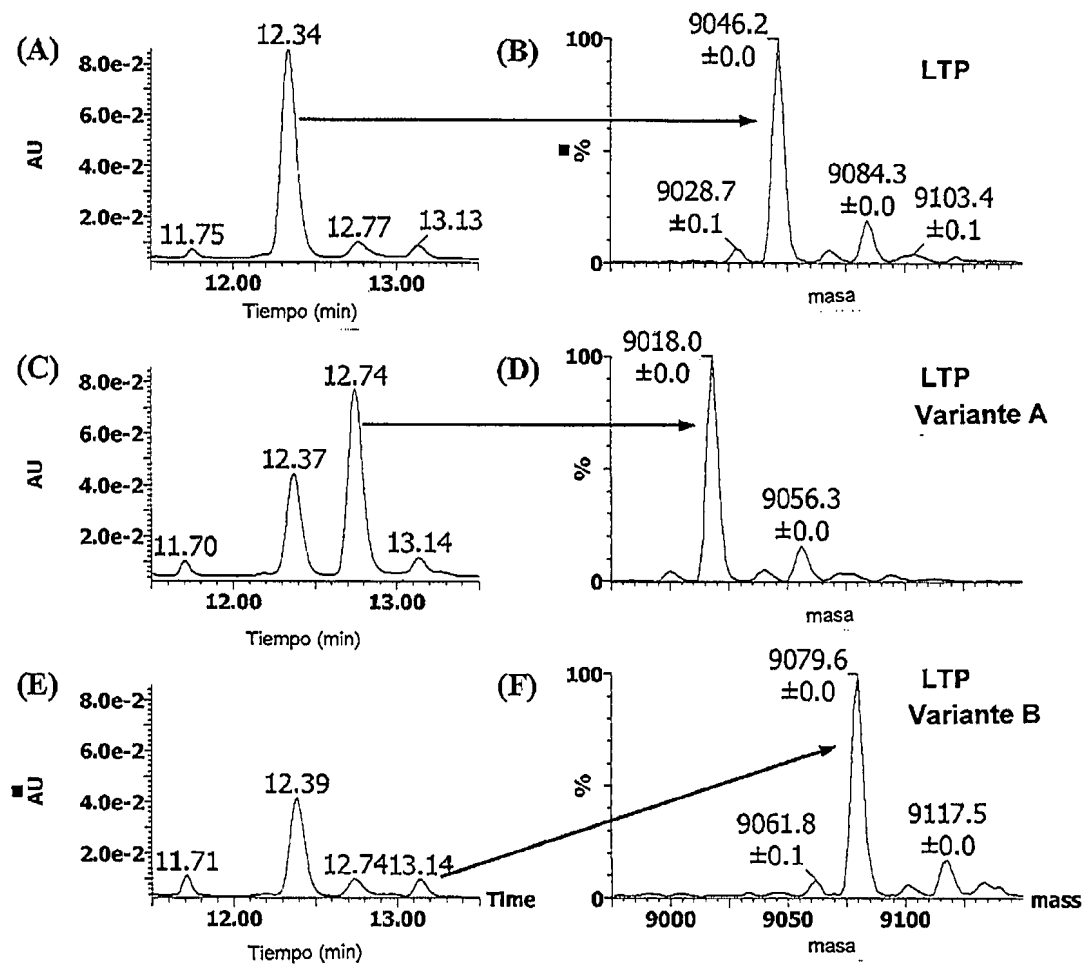


Fig. 6

SECUENCIAS 10975-841-154-9.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Young, Scott A.
Schafer, Barry W.
Kuppanan, Krishna
Julka, Samir
Albers, Dave R.

<120> QUANTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ALLERGENS

<130> 2971-P10168.1US (70259-US-PCT)

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 93
<212> PRT
<213> Zea mays

<400> 1

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

<210> 2
<211> 19
<212> PRT
<213> Zea mays

<400> 2

Ala Ile Ser Cys Gly Gln Val Ala Ser Ala Ile Ala Pro Cys Ile Ser
1 5 10 15
Tyr Ala Arg

<210> 3
<211> 19
<212> PRT
<213> Zea mays

<400> 3

Cys Gly Val Ser Ile Pro Tyr Thr Ile Ser Thr Ser Thr Asp Cys Ser
1 5 10 15
Arg Val Asn

SECUENCIAS 10975-841-154-9.txt

Dependencia: 2020	Fecha: 2013 / 04 / 30 / AAAA MM DD	Recorrido: -
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		
Radicador:		Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	13 - 108957 - 0		
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
☒	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:

folio 45 C.D

Ce.

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4ª N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

REPRESENTACION, RATIFICACION Y PODER

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTATION, RATIFICATION AND POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned / Yo (nosotros), abajo firmado (s)

Dow AgroSciences LLC

of/domiciliado (s) en 9330 Zionsville Road,
Indianapolis, Indiana 46268, United
States of America,

por el presente ratificamos la

presentada por

como agente oficioso ante

en

y por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad,

hereby ratify the

filed without a Power of Attorney by

before

in

on and do hereby appoint GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, in due compliance with the terms of Paragraph 1st. of Article 543 of the Commercial Code, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of

A la vuelta →

Over →

© CAVELIER ABOGADOS
WPPODERE-21 (MINUTA N° 12.1.12.9.r USA)

medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this/Dado y firmado hoy _____

February 6, 1998

In/en Indianapolis, Indiana 46268

United States of America

Kenneth L. Loertscher
Signature _____ Firma

Kenneth L. Loertscher
Assistant Secretary
& General Patent Counsel





Consulado General de Colombia

500 NORTH MICHIGAN AVENUE, SUITE 2040
CHICAGO, ILLINOIS 60611

TEL (312) 923-1196 FAX (312) 923-1197

No. 254

Chicago, FEB 20 1998

El suscrito Cónsul General de Colombia, CERTIFICA, que el señor (a)
MARY REEVER, quien como

SECRETARIA DELEGADA ESTADO, IN., autenticó la

firma del signatario del poder precedente, ejercía en la fecha las
funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este
Consulado; que la compañía DOW AGROSCIENCES LLC

es una sociedad constituida de acuerdo con las leyes de
DELAWARE y cumple su objeto conforme a las mismas;

que el (a) señor (a) KENNETH L. WERTSCHER,

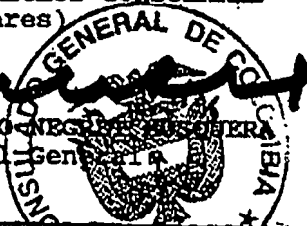
quien en su carácter de REPRESENTANTE LEGAL

de la citada compañía confiere el poder precedente, es su
representante legal en este país.

El Cónsul General no asume responsabilidad alguna por el contenido
del documento.

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE Y DERECHOS CONSULARES
US\$56.00 (Cincuenta y seis dólares)


CARLOS ALFONSO NEGRET MOSQUERA
Cónsul General



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

221220
Negot
CITA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
FURETOMES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1998 MAR 11 11:55

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

Bernardo R. de Marilnes
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 653 Minjusticia 1991

UNITED STATES OF AMERICA
CERTIFICATE OF OFFICE
STATE OF INDIANA

I, Sue Anne Gilroy, Secretary of State of Indiana, DO HEREBY CERTIFY: That,
according to records on file in my office, Lydia S. Owens was duly elected
or appointed to the office of Notary Public in and for Hendricks County
and that the term of said office included the date of February 6, 1998; that to all his/her official acts as said official, full faith and credit ought to be given in all Courts of Justice and elsewhere. In testimony whereof, I have here unto set my hand and affixed the Great Seal of the State of Indiana, at Indianapolis, this Tenth day of February, 1998

The Great Seal of the State of Indiana is circular with a serrated edge. It features a central figure of a Native American holding a bow and arrow, with a star above. The text "THE STATE OF INDIANA" is around the top and "1816" is at the bottom.

Sue Anne Gilroy
Secretary of State

by: CHICAGO Mary Beaver
Deputy

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 6 días del mes de FEBRERO de 19 98
 ante mí, Notario Público de ESTADO DE INDIANA
 compareció(eron) personalmente KENNETH L. LOERTSCHER

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es) tiene(n) capacidad legal para otorgarlo.

Notario Público — Notary Public

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy, 6 de FEBRERO de 19 98
 compareció(eron) ante mí
KENNETH L. LOERTSCHER

a quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en representación de la Sociedad/compañía denominada Dow AgroSciences LLC

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:
 CERTIFICADO DE CONSTITUCION, FECHADO 1 JULIO 1997
 CERTIFICADO DE MODIFICACION, FECHADO 1 OCT. 1997
 RESOLUCION JUNTA DIRECTIVA, FECHADO 23 OCT. 1997
 CONSENTIMIENTO ESCRITO DE LA JUNTA, 1 JULIO 1997

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que Dow AgroSciences LLC

es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente

de acuerdo con las leyes de 1 Estado de Delaware,
Estados Unidos de América

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana
46268, Estados Unidos de America.

2.3. Que el objeto u objeto para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) KENNETH L. LOERTSCHER
SECRETARIO ASISTENTE Y ASESOR LEGAL PATENTES

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad INDIANAPOLIS

Estado INDIANA

Hoy 6 FEB. de 19 98

Notario Público — Notary Public

Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this 6th day of February 19 98
 before me, a Notary Public of State of Indiana
 personally appeared Kenneth L. Loertscher

to me known, and known to me to be the person(s) who executed that foregoing document, and who has(have) legal capacity to execute it.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 6th day of February 19 98
 appeared before me
Kenneth L. Loertscher

who(m) I know personally and who(m) signed this document as representative(s) of the Dow AgroSciences LLC Limited Liability Company, named Dow AgroSciences LLC Company.

I Certify:

1. That I have seen the following documents:

Certificate of formation, dated July 1, 1997
 Certificate of amendment, dated October 1, 1997
 Board resolution, dated October 23, 1997
 Board written consent, dated July 1, 1997

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Dow AgroSciences LLC

is a Limited Liability Company legally constituted and in existence

in accordance with the laws of the State of Delaware,
United States of America

2.2. That the domicile of said Limited Liability Company is
9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana
46268, United States of America.

2.3. That the purpose of purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of the mentioned Limited liability company.

2.4. That Mr.(Messrs.) Kenneth L. Loertscher
Assistant Secretary and General Patent Counsel
 is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

City Indianapolis

State Indiana

This 6th day of Feb 19 98

Lydia S. Owens

Lydia S. Owens
 Notary Public, State of Indiana
 Hendricks County
 My Commission Expires 03/05/00

Documents must be identified with date and origin.

Dow Agrosciences LLC

**CERTIFICACION NOTARIAL
Y AUTENTICACION CONSULAR**

1. Es necesaria la legalización con certificado notarial. El Notario Público debe certificar:
 - 1.1. Que la compañía está legalmente constituida y actualmente existente.
 - 1.2. Su domicilio.
 - 1.3. Que el propósito del poder está incluido en el objeto social de la compañía.
 - 1.4. Que el poderdante está autorizado para dar el poder en nombre de la compañía.
2. Los documentos que hay que mostrarle al Notario Público para probar los puntos anteriores, deben estar expresados en el Certificado Notarial con fecha y origen:
 - 2.1. Respecto a los puntos 1.1, 1.2 y 1.3 sugerimos referirse a los artículos de constitución con fecha y lugar de otorgamiento; y
 - 2.2. Para el punto 1.4 -sugerimos mencionar la resolución de la Junta Directiva o los estatutos, según los cuales la persona que otorga el poder está autorizada para ello.
3. Enseguida el Señor Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

**NOTARIAL CERTIFICATION AND
CONSULAR AUTHENTICATION**

1. Notarial legalization is necessary. The Notary Public must certify:
 - 1.1. That the company is legally constituted and presently existent.
 - 1.2. Its place of business.
 - 1.3. That the purpose of the Power-of-Attorney is included in the activities of the company.
 - 1.4. That the grantor is empowered to give the Power of Attorney in the name of the company he represents.
2. The documents which the Notary Public had before him to prove the above points must be listed by him in the Notarial Certificate with dated and origin:
 - 2.1. In connection with points 1.1., 1.2. and 1.3 we suggest referring to the articles of incorporation with date and place of execution.
 - 2.2. For point 1.4 we suggest to mention the resolution of the Board of Directors and/or the by-laws whereby the person who grants the Power of Attorney has been authorized to give it.
3. Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL COLOMBIANO: Según el artículo 259 del C. de P.C. el Señor Cónsul debe autenticar la última precedente autenticación.

52

TRADUCCION OFICIAL No.03.075.98 de un documento escrito en inglés el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor al mismo tiempo que la presente. Esta traducción ha sido preparada por Bernarda R. de Martínez, Traductora Oficial debidamente reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores y aprobada por el Ministerio de Justicia de Colombia mediante Resolución No. 683 de 1991.

(Se traducen sellos y legalizaciones que aparecen a continuación de un documento escrito en inglés y español por medio del cual Dow AgroSciences LLC, otorga Poder a favor de GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO, EMILIO FERRERO y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ.)

Dado y firmado hoy 6 de febrero de 1998, en Indianápolis, Indiana, E.E.U.U., por Kenneth L. Loertscher, Subsecretario y Asesor General de Patentes.

(Sellos parciales en tinta del Consulado General de Colombia en Chicago.)

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO), en inglés y español referente a la capacidad legal que tenía KENNETH L. LOERTSCHER para otorgar el documento antes mencionado, expedido el 6 de febrero de 1998 en el Estado de Indiana.

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD), en inglés y español referente a la existencia legal de la sociedad Dow AgroSciences LLC, expedido en la Ciudad de Indianápolis, Indiana, E.E.U.U., el 6 de febrero de 1998.

(Firmado), Lydia S. Owens, Notario Público
(Sello notarial en tinta), LYDIA S. OWENS Notario Público,
Estado de Indiana, Condado de Hendricks Mi comisión expira el
03/05/00
(Sello notarial seco), LYDIA S. OWENS NOTARIO PUBLICO INDIANA
(Sello parcial en tinta del Consulado General de Colombia en
Chicago.)

ESTADO UNIDOS DE AMERICA
CERTIFICADO DEL CARGO
ESTADO DE INDIANA

Yo, SUE ANN GILROY, Secretario de Estado de Indiana, POR EL
PRESENTE CERTIFICO: que, de acuerdo con los archivos que obran
en mi oficina, LYDIA S. OWENS fue debidamente elegido y
nombrado para el cargo de NOTARIO PUBLICO en y para el Condado
de Hendricks y que el término de dicho cargo incluía la fecha
del 6 de febrero de 1998: que a todos sus actos oficiales se
les debe dar completa fe y crédito dentro y fuera de todas las
Corte de Justicia. EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he firmado y
estampado el Gran Sello del Estado de Indiana, en Indianápolis,
hoy 10 de febrero de 1998.

(Firma facsimilar), Sue Ann Gilroy
Secretario de Estado

(Firmado), Por: Mary Reeve
Suplente

(Adherido se encuentra sello de oblea dorado con texto en
relieve), SELLO DEL ESTADO DE INDIANA 1816

(Sello parcial en tinta del Consulado General de Colombia en Chicago.)

(En español), Certificación de la firma y cargo de MARY REEVER, de la existencia legal de la compañía DOW AGROSCIENCES LLC y de la autoridad que tenía su representante Legal, KENNETH L. LOERTSCHER, para otorgar el poder mencionado arriba. Esta certificación fue expedida por el CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA EN CHICAGO, ILLINOIS, bajo el N° 254, de fecha 20 de febrero de 1998 y firmada por Carlos Alfonso Negret Mosquera, Cónsul General. Pagados Impuesto de Timbre y Derechos Consulares por valor de veintiún dólares.

(Sello parcial en tinta del Consulado General de Colombia en Chicago.)

(al dorso), Legalización de la firma que antecede expedida por el MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES bajo el No. 221220, de fecha 11 de marzo de 1998 y firmada por el Jefe de Legalizaciones.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual se remito.

Bogotá, 17 de marzo de 1998

COLO 6641-801-001-3

BRM.137

Bernarda R. de Martínez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 683 Minjusticia 1994

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIRMA(S) PUESTA(S) POR

[Signature]

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 17 MAR 1998



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

98 MAR 18 AMU 156

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

[Signature]

022686

CUVA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑAR
LAS FUNCIONES INDICADAS

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72-35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : DOW AGROSCIENCES LLC

Poder conferido el : 06/02/1998 .

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:



LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ
 RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
 Bogotá, D.C.
 Ante mí AMPARO QUINTERO AVALUADOR
 NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE
 BOGOTÁ, D.C.
 Comparado(aron) *Emilio Fendato*
Williamson y Luz Clemencia
Gómez de Páez
 Quien(esa) exhibi(eron) la(s) C.C.
 CC. 2138019 TP 34929
 CC. 35456344 TP 23335
 y declará(aron) que la(s) firma(s) que exhibi(eron)
 en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
 que el contenido del mismo es cierto.
 En constancia se firma esta diligencia.

Emilio Fendato
Luz Clemencia Gómez



VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application DOW AGROSCIENCES LLC is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i) v)		an assignment from YOUNG, Scott A. to DOW AGROSCIENCES LLC, dated 22 November 2010 (22.11.2010)
VIII-2-1(i) v)		an assignment from SCHAFER, Barry W. to DOW AGROSCIENCES LLC, dated 29 November 2010 (29.11.2010)
VIII-2-1(i) v)		an assignment from KUPPANNAN, Krishna to DOW AGROSCIENCES LLC, dated 23 November 2010 (23.11.2010)
VIII-2-1(i) v)		an assignment from JULKA, Samir to DOW AGROSCIENCES LLC, dated 22 November 2010 (22.11.2010)
VIII-2-1(i) v)		an assignment from ALBERS, David R. to DOW AGROSCIENCES LLC, dated 22 November 2010 (22.11.2010)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

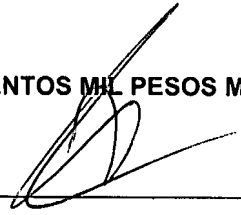
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0038050
		Bogotá D.C., Abril 23 de 2013 - 16:18:43

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	196871850	23/04/2013	11.238.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01	SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00 500.000.00
			===== \$500.000.00 =====

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-108957- -00000-0000
Fecha: 2013-04-30 11:02:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Follos: 59

Colo - 10975 - 841 - 154 - 9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0038038

Bogotá D.C., Abril 23 de 2013 - 16:18:43

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	196871850	23/04/2013	11.238.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr UNDITARIO	Vr CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1850 SOL. TRANSFERENCIA / LICENCIA USO MULTI-MARCA / LEMA	270.000.00	270.000.00
				\$270.000.00

SON: **DOSCIENTOS SETENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-108957- 00000-0000

Fecha: 2013-04-30 11:02:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 59

0010 - 10975 - 841-154-9.

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

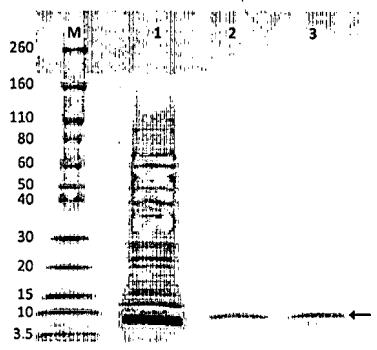
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 23 de 2013 - 16:18:48

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD FASE NACIONAL PCT		
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: G01N 030/002		
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) DOW AGROSCIENCES LLC		
(30) Prioridad	(31) Prioridad 61/388,748	(32) Fecha 2010/10/01	(33) País US	
		(72) Inventor(es) SCOTT A. YOUNG Y OTROS		
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ		
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 2013/05/01		(87)	Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT			Fecha: 2012/04/05
	Fecha de presentación de la solicitud: 2011/08/22			N° publicación: WO 2012/044411 A3
	No. de solicitud PCT/US2011/048645			
(54) Título: CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALÉRGENOS				

Resumen:

Modalidades de la invención incluyen métodos de determinar el contenido de alérgeno de una composición. Modalidades de la invención pueden incluir proporcionar una composición que contiene un alérgeno; purificar por lo menos parcialmente el alérgeno de la composición para formar un extracto; y determinar la cantidad de alérgeno en el extracto usando cromatografía líquida con detección espectrométrica de masas y ultravioleta.



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 ☐

FIN2-FPA (2009-11-18)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-108957-00000-0000

Fecha: 2013-04-30 11:02:47

Tra. 11 PATENTE IYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 59

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha: <u>2013</u> / <u>05</u> / <u>02</u> AAAA MM DD	Recorrido:
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		
Radicador:		Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	13 - 108957	0	
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

<i>Item</i>	<i>Unidad de Conservación</i>
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
<i>Item</i>	<i>Soporte Documental</i>
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:

Ob: ervaciones:

NO se puede subir informacion electronica del CD ANEXO A ESTE Documento ya que contiene Archivo en formato tipo TEXTO por el cual no permite su indexacion correcta puesto que el sistema solo permite Archivo en formato tipo PDF

Yenny Antonobago