(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 618 898**

(51) Int. CI.:

C07K 7/08 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/35 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2011 PCT/IB2010/000554**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2010 WO10146420**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2010 E 10789072 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2431381**

(54) Título: **Oligopéptidos sintéticos diseñados de cistein proteasas de ácaros y métodos para la producción de anticuerpos policlonales IgY para la detección de ácaros intradomiciliares**

(30) Prioridad:

17.03.2009 CO 09027540
02.03.2010 CO 10024590

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2017

(73) Titular/es:

FUNDACION UNIVERSIDAD DEL NORTE (50.0%)
Km. 5 Antigua vía a Puerto Colombia
Puerto Colombian, CO y
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA (50.0%)

(72) Inventor/es:

EGEA, EDUARDO;
BARRERA, LUIS, ALEJANDRO;
ESPEJO, JOHANA;
SOSA, CATALINA;
NAVARRO, ELKIN;
GARAVITO, GLORIA y
MENDOZA, DARY, LUZ

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Oligopéptidos sintéticos diseñados de cistein proteasas de ácaros y métodos para la producción de anticuerpos policlonales IgY para la detección de ácaros intradomiciliares

1. BREVE DESCRIPCIÓN DEL INVENTO

Acá se divulga el diseño, síntesis y evaluación de 6 péptidos sintéticos, no descritos previamente diseñados a partir de las secuencias de las proteínas naturales de los alergenos del grupo I de los ácaros intradomiciliarios de las especies *Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae y Blomia tropicalis,* capaces de desencadenar respuestas inmunológicas específicas. Por lo tanto, se divulgan seis fragmentos oligopéptídicos, evaluados de forma individual en su capacidad inmunogénica que presentan en su estructura epítopes T y B, de los alergenos Der p I, Der f I y Blo t I. Adicionalmente, también se divulgan los usos ventajosos de estos péptidos sintéticos y/o fragmentos de los mismos, en el desarrollo de métodos de diagnóstico y protocolos de inmunomodulación en sujetos con sistemas inmunocompetentes. La presente invención está descrita con mayor detalle en las siguientes secciones.

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

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

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

2. ESTADO DE LA TÉCNICA

Las enfermedades alérgicas se caracterizan por tener una alta prevalencia, morbilidad y comorbilidad. El uso de péptidos sintéticos se ha convertido en un área de investigación y desarrollo que provee herramientas diagnósticas y terapéuticas más eficaces para este tipo de enfermedades. La evidencia citada en la literatura, muestra que en estudios de fase I y fase II, péptidos provenientes de alérgenos de himenópteros, pólenes y felinos, son eficaces en modular la respuesta inmune tanto en modelos experimentales como en humanos. Las evidencias anexa aquí nos permiten solicitar protección sobre seis oligopéptidos sintéticos diseñados a partir de las secuencias de las proteínas naturales de los alérgenos del grupo I de ácaros intradomiciliarios (1).

2.1. Los Alérgenos

Los alérgenos son moléculas, generalmente de naturaleza proteica, que en individuos atópicos, el sistema inmunitario las reconoce como "extrañas" diferentes al polimorfismo antigénico propio, induciendo una respuesta inmune adaptativa exagerada tipo Th2 con la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13, promoviendo en los linfocitos B la producción de altas cantidades de anticuerpos IgE alergeno-especificas, que en posteriores contactos al mismo inmunógeno producirá la liberación de mediadores químicos, en particular la histamina, que producirán los síntomas típicos de la reacción alérgica. En general las proteínas alergénicas exhiben dos o tres propiedades moleculares distintas: la propiedad de sensibilizar, es decir inducir al sistema inmunológico a producir una respuesta inmune adaptativa de anticuerpos IgE de alta afinidad; y la capacidad para provocar una respuesta inflamatoria alérgica, es decir desencadenar síntomas y signos característicos de las enfermedades alérgicas en individuos previamente sensibilizados. Adicionalmente un alérgeno tiene la propiedad de unir anticuerpos IgE específicos. Un alérgeno es una proteína que comúnmente induce una respuesta inmune exagerada mediada por anticuerpos IgE en individuos genéticamente predispuestos. (1)

Los análisis de la base de datos de proteínas sugieren que el universo de los alérgenos abarca más de 120 familias distintas de proteínas. (2) Muchas proteínas pueden tener actividad biológica que influencia la respuesta inmune. Sin embargo, la mayoría de alérgenos purificados no tienen efectos sobre la piel, tracto digestivo, nariz, y otros, en individuos no alérgicos. (3) Los alérgenos se derivan de proteínas con una variedad de funciones biológicas, incluyendo enzimas, proteínas de unión, proteínas estructurales, proteínas de transferencia de lípidos, profilinas, proteínas de unión a calcio, y otros. La función biológica de las enzimas proteolíticas de los ácaros del polvo intradomiciliario, influencian directamente el desarrollo de las respuestas de IgE y pueden iniciar procesos inflamatorios en el pulmón y otros órganos diana a las cuales se asocia el asma. Las características estructurales o

biológicas pueden también influenciar el tiempo que los alérgenos persisten en los ambientes interiores y al aire libre, así como la conservación de su alergenicidad en el tracto digestivo. (4)

2.1.1. Características moleculares de las proteínas alergénicas

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

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

2.1.2. Alérgenos de los ácaros del polvo intradomiciliarios

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

Dermatophagoides pteronyssinus es la especie de ácaros intradomiciliarios más importante en Europa Occidental, Australia, Inglaterra y Nueva Zelanda. *Dermatophagoides farinae* es el ácaro predominante en los Estados Unidos y Japón, aunque *D. pteronyssinus* es el más prevalente en algunas regiones de estos países (10-11), pero la infestación con una u otra especie de ácaro depende no solo de la ubicación geográfica, sino también de las condiciones ambientales de cada hogar. El ácaro *Blomia tropicalis* es importante en regiones tropicales y subtropicales particularmente en Suramérica y el Sureste Asiático. (12). Las especies del género *Dermatophagoides* y del genero *Blomia* son evolutivamente dispares y por lo que presentan baja reactividad cruzada en sus proteínas, debido a que presentan secuencias aminoacídicas disímiles. (13)

Los alérgenos para el ácaro del polvo han sido divididos en grupos de acuerdo a la función biológica que cumplen estas proteínas. Los alérgenos del grupo I (Der p 1, Der f 1 y Blo t 1), son cistein-proteasas, con preferencia por sustratos con una cadena lateral hidrofóbica grande en la posición P2 o con residuos básicos; pueden actuar como enzimas digestivas del ácaro y se encuentran en concentraciones elevadas en las heces de los mismos (partículas de 10-20 micras de diámetro) (13). El alérgeno Der p1 es una proteína de 360 aa, y un peso molecular de 36104 Da (NCBI Cod. AAB60215). El alérgeno Der f 1 es una proteína de 361 aa con un peso molecular de 36391 Da (NCBI Cod. P16311). El alérgeno Blo t 1 es una proteína de 221 aa con un peso molecular de 25126 Da (NCBI Cod. AAK58415).

Los alérgenos de un mismo grupo presentan un alto grado de homología en su secuencia amino acídica, razón por la cual se manifiesta el fenómeno de reactividad cruzada, éste ocurre cuando anticuerpos originalmente aumentados para un alérgeno se unen o reconocen un epítope (fracción) en una proteína similar de un recurso diferente. Así, la interacción con tales proteínas homólogas puede desencadenar reacciones alérgicas o puede ser completamente irrelevante para el paciente (27).

Los ácaros de polvo doméstico son organismos complejos y en ellos se producen miles de proteínas diferentes y otras macromoléculas. Se han caracterizado hasta el momento más de 21 grupos de alérgenos en nueve especies de ácaros diferentes y se han clasificado de acuerdo a su identidad bioquímica. El primer alérgeno de ácaros descrito fue Der p 1 de *Dermatophagoides pteronyssinus* (16). Der f 1 fue después caracterizado por diversos investigadores. Der p 1 fue también el primer alérgeno con el que se desarrolló un análisis con cDNA. El análisis del cDNA reveló que ellas eran cistein proteasas de la misma familia de la papaína y actinidina. (28) El grupo de alérgenos 1 ha sido identificado como alérgenos mayores a partir de estudios con extractos alergénicos estos se unen a IgE de sujetos alérgicos a los ácaros con alta frecuencia. Estas proteínas están presente en heces de los ácaros en altas concentraciones. La actividad proteolítica de estas cistein proteasas, se ha propuesto que aumentan su capacidad de sensibilizar seres humanos (29). La IgE dirigida contra Der p 1 está notablemente en un rango del 50 - 70% en el suero de estos mismos pacientes alérgicos (30).

2.1.3. Las Cisteína proteasas de ácaros intradomiciliarios. Características biológicas y moleculares

Las proteasas se agrupan en clanes y familias. Los clanes son grupos de familias para quienes hay evidencia de ascendencia común. Las familias son agrupadas por su tipo catalítico: A, aspartato; C, cisteína; G, ácido glutámico; S, serina; T, treonina; y U, desconocido. Las serin, treonin y cistein proteasas utilizan en su sitio activo un

aminoácido nucleófilo y forman un estado intermediario acilo y pueden también actuar fácilmente como transferasas. (64)

La cistein proteasa del ácaro *D. pteronyssinus* (Der p 1) es una proteína de 25 Kda, codificado por un único gen, que presenta frecuentes polimorfismos, los cuales han sido ya secuenciados. (26) Tiene una variación prevalente de la secuencia alanina - valina en la posición 124 y aparecen variaciones esporádicas que difieren en 2 - 3 residuos. (57-59)

El marco abierto de lectura codifica un péptido señal de 18 aa, un pro-péptido de 80 aa, y la región de la proteína madura abarca 222 aa. La secuencia incluye cuatro sitios de potencial N-glicosilación, tres en la secuencia madura y uno en el pro-péptido. Der p 1 es producida como una enzima inactiva, que se activa después de la separación del pro-péptido. Aparte de inhibir la actividad de la pro-enzima, el pro-péptido puede también actuar como plataforma de plegamiento para la maduración de Der p 1, según lo sugerido para otras proteasas. Cuando Der p 1 se extrae de las heces del ácaro, está presente en la forma madura (nDer p 1). (60-61)

Las cistein proteasas se dividen en cinco clanes, cada una contiene a un número de familias, agrupadas basados en la arquitectura de su díada o triada catalítica. Der p 1 pertenece al clan CA, a la familia C1, que también incluye a la papaína y a sus parientes. Las estructuras cristalinas de la papaína y de varias proteasas estrechamente relacionadas de esta misma familia han sido determinadas, y los residuos catalíticos se han identificado como Cys, His, y Asn. Además, un residuo conservado de Gln es esencial para la actividad catalítica y se cree que ayuda a formar el agujero del oxianionico, el cual estabiliza el estado transitorio durante la catálisis. (62).

En la Figura 1 se observa la estructura biológica Der p 1 **A.** proDer p 1 y **B** Der p 1 maduro y completamente activo.(33) Fuente de libre acceso : PDB.

Los residuos catalíticos Cys e His se piensa forman un Ion tiolato-imidazolium estabilizado por un puente de Hidrógeno directo entre las cadenas laterales de los residuos catalíticos His y Asn. (64)

La mayoría de los miembros de la familia C1 tienen pro-péptidos homólogos al de la papaína (115 aa), aunque la longitud puede variar. Se estima que el pro-péptido actúa ocultando el sitio activo y blindándolo del acceso a los sustratos, de tal modo que inhibe la actividad enzimática. La proteólisis del mismo es evitada ligando el pro-péptido en la orientación reversa comparada con la de un sustrato. El pro-péptido de Der p 1 tiene solo 17 residuos idénticos al ser alineada su secuencia con el propéptido de la papaína. (65)

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

***Epítopes moleculares de la Proteína Der P 1*.**

La región entre los aminoácidos 15-- 33 de la proteína madura es accesible a la interacción con paratopes de anticuerpos IgE, pero es relativamente extendida y podría constituir epítopes discontinuos con partes de la región entre los aminoácidos 188 - 199. La región 34 - 47, la cual contiene residuos de cisteína catalíticos, es una hélice enterrada en el interior de la molécula. El segmento que comprende los residuos 52 a 111 está bien expuesto sobre la superficie y podría ser subdivido en pequeños segmentos: 52 - 56, 60 - 80, 81-94, y 101 - 111, correspondiendo a epítopes lineales o epítopes discontinuos. El epítope 81 - 94 consiste de dos epítopes continuos separados por los aminoácidos 101 - 111, y este mismo es también expuesto a la superficie y constituye un epítope lineal ideal, al igual que el epítope 117 - 133. La región 155 - 175 está parcialmente enterrada en la interface de un dímero y puede ser parte de un epítope discontinuo con el segmento adyacente 176 - 187, o con parte del segmento 60 - 80. Finalmente, la región 188 - 199 es suficientemente compacta para constituir un epítope lineal o combinado con 15 - 33. Hay variaciones en todos los epítopes descritos comparados con Der f 1 y Eur m 1 con la excepción de la región 60 - 80, la cual está completamente conservada con respecto a Der f 1. (63)

Se han reportado por lo menos 12 isoformas de Der p 1 (36). Los residuos amino acídicos dentro del propéptido median su asociación a la membrana, y desempeñan un papel en el transporte de la proenzima a los lisosomas. (67-68)

El grupo 1 de ácaros intradomiciliarios está constituido por las cistein proteasas de cada una de las diferentes especies de ácaros. Estas proteínas provocan síntomas clínicos claros en >80% pacientes alérgicos a los ácaros. Se han caracterizado hasta el momento las cistein proteasas de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1)*, Dermatophagoides farinae (*Der f 1)*, Blomia tropicalis* (Blo t 1)*, Dermatophagoides microceras* (Der m 1) *y Euroglyphus maynei (*Eur m 1) (13). Entre las proteínas que producen síntomas clínicos se destacan las cistein proteasas Der p 1, que es positiva en el 92% de los pacientes alérgicos a los ácaros por RAST (39) y Der f 1 que en el 87% de los pacientes alérgicos a ácaros, elicita anticuerpos IgE contra Der f 1. (70)

En la Figura 2 Estructura secundaria de Der p 1 completamente activo. (63) Fuente de libre acceso: PDB.

Estas cisteín proteasas han sido implicadas en enfermedades humanas como cáncer, artritis reumatoide, osteoporosis y enfermedad de Alzheimer's. (71) Por esta razón consideramos a las cistein proteasas de ácaros intradomiciliarios como moléculas blanco para el diseño de estrategias encaminadas al diagnóstico, tratamiento, y control de enfermedades alérgicas. (72)

Reactividad cruzada entre cistein proteasas

El fenómeno de reactividad cruzada ocurre cuando anticuerpos IgE, originalmente aumentados para un alérgeno, se unen o reconocen un epítope (fracción) en una proteína similar de un recurso diferente. La interacción con tales proteínas homólogas puede desencadenar reacciones alérgicas o puede ser completamente irrelevante para el paciente. (73-75)

El grupo 1 de ácaros intradomiciliarios comparten características estructurales que permite agruparlas dentro del clan CA, en la familia C1, que también incluye a la papaína, catepsinas de mamíferos (B, C, F, H, L, K, O, S, V, X y W) y a sus parientes. Estas proteínas poseen dominios muy conservados (ver Figura 3) que hacen que estas proteínas alergénicas sean reconocidas por anticuerpos IgE de pacientes sensibilizados contra cistein proteasas de un recurso diferente. Es decir estas proteínas presentan reactividad cruzada entre sí, por lo que un grupo muy diverso de recursos pueden elicitar síntomas alérgicos comunes. (76-77) Se ha comprobado que Der p I y Der f I tienen reactividad cruzada superior al 80 %. (78-79).

En la Figura 3 se observan los dominios Conservados de pro Der p 1. (80) Fuente de libre acceso: NCBI.

Entre otros recursos relevantes con reactividad cruzada con el grupo 1 de ácaros intradomiciliarios tenemos a las catepsinas, un grupo de exopeptidasas lisosomales expresadas en todos los tejidos humanos, involucrada en la degradación de proteínas, procesamiento de antígenos, activación de proenzimas y en procesos apoptóticos. (81-82). Las catepsinas de plantas las cuales son utilizadas en la movilización de proteínas de reserva. (83-85)

Respuesta inmune a las cistein proteasa

Aunque hay una comprensión creciente de los mecanismos implicados en el desarrollo de la inflamación alérgica, una vez la sensibilización ha ocurrido, los mecanismos de la interacción entre Der p 1 y las poblaciones celulares de la vía aérea y su papel en el proceso de sensibilización siguen siendo confusos. (86)

El epitelio bronquial es la primera barrera encontrada por los antígenos inhalados, esta proporciona un acoplamiento importante entre el medio externo y el interior del cuerpo. La activación de células dendríticas por los antígenos inhalados conduce normalmente a la inducción de la tolerancia de la inhalación más que a la inflamación alérgica. Los mecanismos implicados en la interrupción de esta tolerancia en individuos alérgicos se desconocen. Se ha demostrado que una corta exposición a altas concentraciones de Der p 1 o la exposición prolongada a bajas concentraciones causó degradación de las uniones estrechas en células epiteliales bronquiales en pacientes asmáticos y también en las células de individuos no asmáticos. Esto incrementa la permeabilidad del epitelio, lo cual podría favorecer la penetración en la mucosa de la vía aérea, no solo de Der p 1, sino también de otros antígenos desprovistos de actividad proteolítica, de tal modo que aumenta la probabilidad de encontrar células presentadoras de antígenos y causar sensibilización. Tal fenómeno explicaría por qué la sensibilización contra los antígenos del ácaro del polvo doméstico se asocia con frecuencia a la sensibilización con múltiples antígenos (87).

La exposición de las células epiteliales de la vía respiratoria a Der p1 induce la secreción de citosinas pro inflamatorias, particularmente (GM-CSF), e IL -6. La secreción de estos mediadores de las células epiteliales bronquiales de pacientes asmáticos se asocia al transporte intracelular del alérgeno y ocurre después de una breve exposición a concentraciones bajas de Der p1. (88) De esta forma la actividad catalítica cistein-proteasa del alérgeno de ácaro de polvo casero Der p 1 se asocia con el incremento de la permeabilidad en el epitelio bronquial, facilitando así su propio procesamiento.

En la Figura 4 se observa el incremento en la permeabilidad de membrana por acción proteolítica de Der p 1. (89)

Este alérgeno es capaz también de cortar a CD23 (receptor de baja afinidad para IgE´s, el cual regula la síntesis de estas inmunoglobulinas) y a CD25 (la subunidad α del receptor para interleucina-2). Como resultado del clivaje del CD25 de superficie, los linfocitos T de sangre periférica disminuyen su proliferación y la secreción IFN-γ como respuesta a una estimulación. Las poblaciones de la célula Th1 y Th2 promueven el desarrollo de células del mismo subconjunto, mientras que suprime la propagación de los del otro subconjunto. Por lo tanto, el clivaje inducido por Der p 1 de CD25 probablemente conduce al crecimiento deteriorado de las células del subconjunto Th1 y al consiguiente aumento de los del subconjunto Th2.(113) Este subset de células T produce un perfil de citoquinas que incluyen IL-4, IL-5, IL-6, e IL-13, las cuales ejercen sus efectos sobre los mismos linfocitos T, pero también sobre otro tipo de células incluyendo linfocitos B y células presentadoras de antígenos tales como monocitos y células dendríticas. La IL-4 sirve como factor de crecimiento de los linfocitos B e induce la producción

de los isótipos IgE e IgG_4. En la exposición inicial al alérgeno, los linfocitos T son estimulados, y la producción de IgE es inducida; estos anticuerpos se unen a los receptores de la superficie de los mastocitos. (89-90).

2.2. Los ácaros intradomiciliarios y su asociación con las enfermedades alérgicas.

Estudios epidemiológicos, inmunológicos y clínicos en Colombia, sustentan el concepto que la sensibilización (producción de IgE específicos para alérgenos de ácaros y clonas de linfocitos T alérgeno-específicos) por los alérgenos de ácaros, es una causa de asma y rinitis, mas no simplemente un factor desencadenante. Estos hallazgos son coherentes con lo informado en la literatura científica. Estudios previos en nuestro país muestran que la prevalencia de sensibilización a los antígenos de ácaros en pacientes asmáticos, en la ciudad de Barranquilla, tiene un patrón similar de comportamiento que a nivel mundial (80-85%). En estos mismos estudios, se describe que las especies de ácaros más frecuentemente encontradas en los ecosistemas de los pacientes hogareños son: *Dermatophagoides farinae, Dermatophagoides pteronyssinus y Blomia tropicalis*. (2-4)

Estos artrópodos son organismos complejos en su composición proteica. Actualmente se han caracterizado más de 21 grupos de alérgenos en nueve especies de ácaros diferentes y se han clasificado de acuerdo a su identidad bioquímica (5-6).

El grupo 1 de ácaros intradomiciliarios, de interés para esta propuesta, se caracteriza por tener cistein proteasas que provocan síntomas clínicos claros en más del 80% de pacientes alérgicos a los ácaros. A la fecha se conocen las características bioquímicas y moleculares de las cistein proteasas de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1), *Dermatophagoides farinae* (Der f 1), *Blomia tropicalis* (Blo t 1) de interés para esta solicitud (7-8).

2.3. Estudios experimentales con oligopéptidos que producen inmunomodulación.

Se ha demostrado que péptidos sintéticos inducen tolerancia antígeno específica, así como hipo respuesta en diversos modelos murinos tanto en enfermedades autoinmunes como en enfermedades alérgicas (9). Briner, et al., sensibilizaron ratones con el alérgeno de gato Fel d 1 y posteriormente demostraron la capacidad de péptidos derivados de alergenos para inhibir la producción de citocinas de células Th2 (10). Hoyne et al., administraron péptidos de Der p 2 intranasalmente a ratones. Los resultados demostraron un cambio en la respuesta Th2 hacia Th1, luego de estimulación con la proteína natural intacta. (11) Astori, et al. al administrar oligopéptidos con epítopes de células T del alergeno Bet v 1 a ratones CBA/J. encontraron una proliferación de células T especificas hacia este alérgeno, la cual fue inhibida por tratamientos terapéuticos con el epítope antes descrito (12).

En otro modelo experimental murino, el alérgeno del veneno de Himenópteros, fosfolipasa A2 (PLA2; Api m 1). moduló negativamente la síntesis de IgE específica, demostrándose una inhibición en su síntesis. Posterior al protocolo con IT experimental se confirma la modulación. (19) En conjunto, los estudios descritos anteriormente apoyan el uso de oligopéptidos provenientes de alérgenos nativos para modular la respuesta y la polarización Th1/Th2 de células T.

2.3.1 Estudios experimentales con oligopéptidos en Humanos

Existe considerable evidencia experimental que demuestra que la Inmuno Terapia (IT) con péptidos modula la respuesta inmune. A la fecha se han desarrollado estudios con oligopéptidos sintéticos provenientes de 4 alérgenos: el alérgeno de gato Fel d 1, el alérgeno del veneno de abeja Api m 1, el alergeno del polen de ambrosia Amb a 1 y el alérgeno de polen del cedro Japonés Cry j 2. (13)

Los primeros estudios emplearon una combinación de dos péptidos, provenientes de Fel d 1. (Allervax Cat, ImmuLogic Corp., Waltham, Mass). Al finalizar el tratamiento de IT en estos pacientes, se evidenció una mejoría significativa de los síntomas en los sujetos de estudio (14).

En otro estudio, doble ciego, placebo controlado con grupos paralelos, utilizando péptidos de Fel d 1 o placebo, administrados semanalmente en inyecciones subcutáneas (4x250 ug) en 42 pacientes con rinitis y/o asma alérgica a los alérgenos de gato, se obtuvieron resultados similares a el estudio anterior (15).

Recientemente se han desarrollado otros estudios clínicos, usando mezclas de péptidos de secuencia corta de Fel d 1. Estos péptidos fueron administrados intradérmicamente a pacientes con asma alérgica sensibilizados con Fel d 1. Se demostró mejoría en los síntomas a pruebas de reto con este alérgeno en los sujetos del estudio, sin embargo se presentaron efectos adversos. Crisis asmáticas que fueron dependientes de la dosis, se observaron con una única inyección de la mezcla de 12 péptidos. Sin embargo se pudo evidenciar tolerancia al desafío varios meses después. Adicionalmente, la evaluación de la respuesta de los PBMC a los alérgenos *in vitro* demostró reducción en la producción de las citocinas del perfil TH2 y marcada secreción de IFN-g. (13-15)

La misma mezcla de 12 péptidos fue administrada en dosis crecientes por dos semanas en un estudio doble ciego placebo controlado con 24 pacientes asmáticos alérgicos a los alérgenos de gato. Posteriormente se les hizo pruebas de provocación, inhalando metacolina PC20 y alérgeno PD20. El tratamiento demostró una significativa

reducción tanto en las reacciones cutáneas de fase temprana como en la de fase tardía al desafío intradérmico con el alérgeno. En este mismo trabajo, también se pudo evidenciar una reducción en la respuesta proliferativa alérgeno específico, al igual que una reducción en la producción de citocinas del perfil Th2. Otro hallazgo importante de este estudio fue un incremento en la producción de IL-10 por parte de los PBMC. (13)

2.4. Producción de anticuerpos IgY policlonales usando oligopéptidos sintéticos

Los anticuerpos son proteínas presentes en el suero y en los tejidos de los vertebrados y se unen específicamente a moléculas extrañas (antígenos), en una respuesta inmune adaptativa. Son un instrumento valioso en investigación con una amplia aplicación como reactivo diagnóstico y como herramienta terapéutica para el tratamiento de diversas enfermedades. Los anticuerpos actualmente disponibles son anticuerpos monoclonales o policlonales comúnmente producidos en mamíferos como conejos, hámster, cabras, ovejas y caballos. El uso de estos animales presentan algunas dificultades: las dos primeras especies mencionadas, que son las más usadas, generan cantidades reducidas de suero y las otras son de difícil mantenimiento por su talla, alto costo de dieta y difícil manipulación (16). Una alternativa actual es la producción de anticuerpos policlonales obtenidos en yema de huevo de gallina (IgY). Esta tecnología ha sido ampliamente utilizada en inmunología, bioquímica, biotecnología, salud humana y animal. En Alergología Experimental se ha demostrado que los anticuerpos IgY son capaces de identificar y cuantificar alergenos de nuez de Brasil, maní, péptidos alergénicos nativos de Fel d 1 y Amb a 1 recombinante.

En la producción y purificación de anticuerpos policlonales a partir de sangre de mamíferos se obtienen bajos niveles de rendimiento y con procedimientos laboriosos en muchos casos. Las desventajas de las técnicas disponibles y la preocupación por los derechos de los animales realzan el interés en desarrollar métodos alternativos para la producción de anticuerpos. En el sentido de la protección animal, el uso de aves para la producción del anticuerpos representa un refinamiento en el que no hay que llevar a cabo procedimientos dolorosos para la toma de muestras de sangre. Todo esto es substituido por la recolección de los huevos. Aunque el hecho de que las gallinas inmunizadas transfieran anticuerpos a la yema de huevo se conoce hace mucho tiempo, esta posibilidad alternativa de producir anticuerpos ha atraído la atención solamente en la última década (17-20).

Esta gran cantidad de anticuerpos producidos en la yema de huevo de gallinas, muy bien almacenados y muy estables, facilita su producción y aplicación en la detección de antígenos para diagnóstico en medicina humana, como también en producción de conjugados. Además, disminuye considerablemente el número de animales utilizados para la producción, con respecto a otras especies (21).

Por ejemplo, Finlay W, et al., usaron el sistema de inmunoglobulinas aviares para proveer un método rápido para la generación de anticuerpos altamente específicos contra los alérgenos Fel d 1 recombinante y Amb a 1 nativo (22). Al evaluar sus resultados por ELISA y Western blot lograron demostrar que obtuvieron anticuerpos IgY específicos contra estos alérgenos. Blais BW, et al., desarrollaron un inmunoensayo enzimático, Dot blot, para la detección de alergenos de maní, utilizando anticuerpos IgY pegados a platos de poliestireno y revelando con anticuerpos anti-alérgenos de maní conjugados con peroxidasa; obteniendo resultados excelentes (23). Burton WB, por su parte utilizó IgY en una ELISA sándwich para capturar y detectar inmunoespecíficamente proteínas alergénicas de nuez de Brasil, logrando buenos resultados y recomendándolo como un método simple que podría apoyar a las agencias reguladoras de la industria alimenticia para descartar la presencia de alérgenos no declarados en alimentos y productos relacionados. Lo anterior ha demostrado que los anticuerpos IgY son capaces de identificar y cuantificar alérgenos en concentraciones menores de 1ppm en ensayos inmunohistoquímicos. (24)

2.5. Tecnología IgY en la detección de alérgenos

Los aeroalérgenos son partículas transportadas por el aire, capaces de producir alergia respiratoria, cutánea o conjuntival. Las sustancias que con mayor frecuencia producen cuadros alérgicos a través de la inhalación son: los pólenes, esporas de hongos, diferentes tipos de ácaros, cucaracha, epitelio de animales, y otras sustancias que afectan directamente la mucosa respiratoria a través de una serie de procesos inmunológicos. La mayor parte de los alérgenos transportados por el aire suelen ser proteínas o sustancias unidas a proteínas. La mayoría resultan ser glicoproteínas solubles, sin características físico-químicas especiales, salvo un peso molecular comprendido entre 10,000 y 40,000 Da. El tamaño de los aeroalérgenos es también importante. Los alérgenos mejor conocidos varían entre 1 y 60 µm (91-93).

Los mecanismos protectores de la mucosa nasal y de las vías respiratorias (a través de los cilios que transportan las partículas a la orofaringe, siendo éstas deglutidas y desnaturalizadas rápidamente en el estómago) eliminan la mayoría de las partículas más grandes, de tal manera que sólo aquéllas de 3 µm o menores son capaces de alcanzar los alvéolos pulmonares. Ello explica una mayor exposición de las mucosas nasal y conjuntival, y de las vías respiratorias superiores. Sin embargo, puesto que la mayoría de las partículas, dado su tamaño, no penetran en los bronquios terminales y alvéolos, deben considerarse otros mecanismos alternativos de respuesta de las vías aéreas. Un aeroalérgeno tendrá importancia clínica cuando reúna estas dos circunstancias: (1) poseer grupos antigénicos específicos capaces de provocar respuestas de hipersensibilidad en el hombre; y (2) encontrarse en concentración suficiente en el aire, de tal modo que el nivel de exposición sea adecuado para evocar una respuesta inmunológica. Tales criterios, aparentemente sencillos, no siempre se consiguen a la vez en muchas de las

partículas alergénicas posibles. Existen muchas sustancias transportadas en el aire, tanto de origen vegetal y animal, como productos químicos, capaces de provocar síntomas alérgicos en individuos humanos sensibilizados. La respuesta individual depende de múltiples factores, tanto inherentes al sujeto alérgico, como al propio alérgeno: estado del sistema inmune, dosis de alérgeno, frecuencia y ruta de penetración, características físico-químicas, etc. (94) Entre los aeroalérgenos más importantes tenemos las proteínas de ácaros intradomiciliarios y cucaracha. Anticuerpos IgY fueron usados por investigadores del Food and Drug Administration en Rockville, Maryland, Estados Unidos para la identificación y caracterización de nuevos alérgenos en extractos de cuerpo entero de *Blattella germanica* y *Periplaneta americana* demostrando gran especificidad y sensibilidad a estos anticuerpos. (95)

Investigadores del centro de Evaluación e Investigación Biológica en Bethesda, Maryland, Estados Unidos, desarrollaron un sistema de inmunoglobulinas aviar para producir anticuerpos recombinantes altamente específicos para un alérgeno particular (Fel d 1 recombinante o Amb a 1 nativo) o para múltiples alérgenos (Fel d 1 recombinante y Amb a 1 nativo) de un mínimo de animales experimentales. Los fragmentos de anticuerpos IgY generados demostraron ser eficientes en identificación y cuantificación de alérgenos, en comparación con los inmunoensayos estándares. (96)

La alergia a los alimentos se presenta en el 1-8% de la población. (96-97) La presencia de alérgenos no declarados en alimentos representa un serio riesgo para individuos alérgicos, que pueden inducir reacciones a su exposición desde leves hasta severas. En Norte América y Europa, los alérgenos alimenticios comúnmente implicados en las reacciones alérgicas incluyen huevo, crustáceos, leche, pescado, soya, trigo, maní, nuez, frutos secos (tales como avellanas, nuez de Brasil, etc.). (98-99)

Maní, nuez, y otros productos con componentes alergénicos son frecuentemente usados como ingredientes en la elaboración de alimentos para mejorar su sabor y calidad nutricional, y su presencia en tales alimentos debe ser claramente indicada para permitir su identificación por parte individuos alérgicos. Dado el riesgo de contaminación inadvertida de alimentos con productos alergénicos durante su proceso de fabricación, la industria alimenticia y las agencias regulatorias requieren herramientas para monitorear la presencia de alérgenos. (100)

En este sentido la Agencia Canadiense para la Inspección de Alimentos desarrolló un Dot Blot para la detección de proteínas de maní en alimentos usando anticuerpos IgY anti-maní, y las proteínas de maní unidas fueron detectadas por reacciones secuenciales con anticuerpos anti-IgY conjugados con peroxidasa y reveladas con un sustrato cromogénico. El ensayo dio resultados discernibles con concentraciones tan pequeñas como 0.03 ug/ml. Mientras que el umbral de la dosis exacta para las reacciones adversas en las personas sensibles al maní no se conoce, en un estudio se demostró que la ingestión de un mínimo de 100 mg de proteína de maní es capaz de provocar síntomas de una reacción alérgica. (101) Por tanto, este ensayo usando anticuerpos IgY demostró ser adecuado para la detección de proteínas de maní a los niveles asociados con una reacción alérgica. La especificidad de los anticuerpos IgY contra las proteínas de maní, fue confirmada en estos experimentos, en donde se evaluó con extractos de legumbres, lentejas, frijol rojo, así como también con extractos similares de frutos secos, avellana, nuez de Brasil. (102) Sin embargo, dado que el Dot Blot es una prueba que no nos permite establecer las características dosis-respuestas precisas, Investigadores del Centro de Química Analítica en el Instituto de Agrobiotecnología, Konrad Lorenz, Tulln-Austria, desarrollaron un inmunoensayo enzimático competitivo indirecto basado en la tecnología IgY, para la detección de proteínas de avellana en los alimentos, logrando un límite de detección de 10 ug/l y un límite de cuantificación de 30 ug/l. También reportaron una reactividad cruzada con diversos alimentos entre otros soya, frijoles, arroz, huevo, trigo. Esta reactividad cruzada disminuyó con la purificación de los anticuerpos IgY. (103-104)

Los ensayos descritos hasta ahora se diseñaron para la detección de alérgenos particulares. En el centro canadiense para la inspección de alimentos antes mencionado, diseñaron una prueba inmunoquímica para la detección simultánea de múltiples alérgenos usando anticuerpos IgY anti proteínas de avellana, nuez de Brasil, y maní, obteniendo límites de detección entre 1.0 y 0.1 ug / g; demostrando la viabilidad del diseño de pruebas inmunoquímicas con anticuerpos IgY contra múltiples alérgenos. (104-105)

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

US 5820862A divulga un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No 1. Este péptido contiene epítopos T que son reconocidos por los pacientes alérgicos a los ácaros intradomiciliarios. Este documento establece que los péptidos pueden comprender sustituciones de aminoácidos. El péptido divulgado en este documento está comprendido en una composición farmacéutica y se usa en métodos diagnósticos y terapéuticos.

Garavito et al. (Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2009, 123, S223) divulga la generación de anticuerpos específicos para Der pl, Der fl y Blot tl usando péptidos derivados de estas proteínas, aunque las secuencias exactas de los péptidos usados para generar los anticuerpos no se describen específicamente.

W02007/140505 describe anticuerpos IgY contra 8 péptidos derivados del alérgeno de ácaros Der pl.

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

3. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención aquí descrita corresponde a un método para producir una composición de anticuerpos policlonales IgY útil como reactivo de diagnóstico, caracterizado porque comprende las etapas de:

a) preparar una composición inmunogénica que comprende al menos un péptido que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID Nos. 1, 2, 3, 5 y 6;
b) hiperinmunizar un ave con dicha composición inmunogénica;
c) extraer los anticuerpos policlonales IgY de la yema de huevo puesto por el ave;
d) purificar los anticuerpos policlonales IgY;
e) opcionalmente marcar los anticuerpos policlonales IgY; y,
f) opcionalmente generar inmunoconjugados de los anticuerpos policlonales IgY. Debido a que estos fragmentos proteicos se comportan como epítopeos T y B, de los alérgenos Der p I, Der f I y Blo t I, esto permitiría el uso de estas secuencias peptídicas sintéticas cortas, como una estrategia para la inducción de tolerancia periférica y de modulación del balance Th2/Th1, que conlleven en un futuro al diseño de protocolos terapéuticos en el manejo de estas patologías. Adicionalmente, dada su capacidad para funcionar como antígenos con muy buena avidez para unir anticuerpos específicos, son usados adicionalmente en el desarrollo de pruebas diagnósticas que detecten alérgenos del grupo I de ácaros intradomiciliarios.

La invención está fundamentada en la evaluación y confirmación que los péptidos sintéticos aquí descritos son inmunógenos que inducen la producción de anticuerpos específicos para epítopos presentes en los alérgenos del grupo I de los ácaros intradomiciliarios *Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae y Blomia tropicalis*. Estos péptidos corresponden a fragmentos proteicos diseñados y obtenidos de las proteínas alergénicas del grupo I de ácaros intradomiciliarios, Der p I, Der f I y Blo t I. Las ventajas del uso de estos péptidos sintéticos incluyen, pero no se limita, a su capacidad para inducir respuestas de células inmunocompetentes.

Para este efecto, los péptidos de la presente invención son incluidos en composiciones adecuadas para diferentes rutas de administración, por ejemplo, para administración vía parenteral y/o intramuscular en una solución acuosa estéril. Para la administración intravenosa, los transportadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, buffer fosfato salino (PBS), etc. Las soluciones inyectables estériles pueden ser preparadas por incorporación de los compuestos activos (péptidos sintéticos), en las cantidades requeridas en un solvente apropiado, y/o vehículo adecuado con una o más combinaciones con los ingredientes mencionados anteriormente.

Sin limitarlo a un mecanismo particular, los seis péptidos sintéticos inducen una respuesta inmune que permite identificar alérgenos del grupo I de ácaros intradomiciliarios y distinguen entre las especies de *Dermatophagoides spp.* y *Blomia tropicalis.* Los péptidos aquí descritos son químicamente puros e inducen respuestas específicas. Los seis péptidos sintéticos se encuentran libres de material biológicamente activo, de suspensiones celulares, de restos de tejidos o de precursores químicos provenientes de su síntesis química.

Para determinar la homología de secuencias de aminoácidos entre los péptidos sintéticos y las proteínas naturales, las secuencias fueron alineadas con el propósito de una óptima comparación. Cuando el aminoácido de una secuencia correspondió con el aminoácido ubicado en la segunda secuencia, se consideró que estas secuencias eran idénticas en esta posición. El número de aminoácidos que comparten posiciones idénticas determinan el grado de homología entre las secuencias comparadas.

Esta invención es un modelo experimental que induce la producción de anticuerpos específicos para epítopos de los alérgenos del grupo I de los ácaros intradomiciliarios (*Dermatophaoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae y Blomia tropicalis)*.

Las manipulaciones de las secuencias están incluidas dentro del alcance de la divulgación, estas modificaciones pueden ser desarrolladas durante su traducción o síntesis por ejemplo: glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, amidaciones, clivaje proteolítico, etc. Sustituciones de aminoácidos conservativas, pueden ser realizadas en los péptidos de uno o más residuos de aminoácidos no esenciales para la respuesta inmunológica.

Seis oligopéptidos sintéticos, inmunogénicos, diseñados a partir de la secuencia amino acídicas de las proteínas naturales de los alérgenos del grupo I de los ácaros intradomiciliarios: *Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae y Blomia tropicalis,* los cuales son epítopos lineales con múltiples aplicaciones, tales

como la inducción de la producción de anticuerpos policlonales son acá divulgados. Las secuencias correspondientes a cada uno de los fragmentos oligopeptídicos y sus correspondientes números de identificación, los cuales incluyen secuencias de 17, 18, 19 y 20 aminoácidos, según sea cada caso específico, se relacionan a continuación:

Asimismo la presente invención corresponde a un primer método para producir una composición de anticuerpos policlonales IgY útil como reactivo de diagnóstico, caracterizado porque comprende las etapas de:

a) preparar una composición inmunogénica que comprende al menos un péptido que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID Nos. 1, 2, 3, 5 y 6;
b) hiperinmunizar un ave con dicha composición inmunogénica;
c) extraer los anticuerpos policlonales IgY de la yema de huevo puesto por el ave;
d) purificar los anticuerpos policlonales IgY;
e) opcionalmente marcar los anticuerpos policlonales IgY; y,
f) opcionalmente generar inmunoconjugados de los anticuerpos policlonales IgY, y a un segundo método para la detección de alérgenos de ácaros que emplea la composición de anticuerpos IgY desarrollada en el primer método. La presente invención también comprende la composición como tal de los anticuerpos policlonales IgY desarrollados en el primer método.

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

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

3.1. DISEÑO DE LOS PÉPTIDOS

3.1.1. Análisis de secuencias

Con el propósito de determinar homología entre las secuencias (similitud e identidad. (Anexo 1) se desarrollaron alineamientos de las secuencias de aminoácidos usando los softwares ***BLAST*** (Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., and. Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research 25(17): 3389-3402.)*, ***ClustalW*** (Higgins D., Thompson J., Gibson T., Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.(1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research 22: 4673-4680.)* y **Protscale** (Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server;*(In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Human Press (2005). pp. 571-607).

Los resultados de estos análisis (Figuras 18-23) permiten establecer regiones consenso entre los tres diferentes alérgenos del grupo 1 de interés para esta solicitud. Con la información anterior se diseñaron dos péptidos universales identificados como secuencia 2 y 3. Las regiones disimiles identificadas en el análisis anterior fundamentaron el diseño de los cuatro péptidos restantes.

Breve Descripción de las Figuras 18-22 de alineamiento de secuencias.

Fig. 18. Representa el alineamiento de los alérgenos del grupo 1 de ácaros intradomiciliarios, (proDer p 1, proDer f 1, y Blo t 1) en este podemos observar un alto grado de homología entre las proDer p 1 y pro Der f 1, con un porcentaje de identidad del 83 %, entre pro Der p 1 y Blo t 1 de 33 % y entre pro Der f 1 y Blo t 1 del 34%.

Fig. 19. Representa el alineamiento de los alérgenos del grupo 1 de ácaros intradomiciliarios, (proDer p 1, proDer f 1, Blo t 1 y Seq Nº 3) en esta podemos observar que la Seq Nº 2 comparte 12 de sus 17 aminoácidos.

Fig. 20. Representa el alineamiento de los alérgenos del grupo 1 de ácaros intradomiciliarios, (proDer p 1, proDer f 1, Blo t 1 y Seq Nº 4) en esta podemos observar que la Seq Nº 3 comparte solo 2 de sus 20 aminoácidos, permitiría discriminar entre los géneros *Dermatophagoides* y el género *Blomia*.

Fig. 21. Representa el alineamiento de los alérgenos del grupo 1 de ácaros intradomiciliarios, (proDer p 1, proDer f 1, Blo t 1 y Seq Nº 5) en esta podemos observar que la Seq Nº 4 comparte solo 3 de sus 20 aminoácidos, permitiría discriminar entre los géneros *Dermatophagoides*, del género *Blomia*.

Fig. 22. Representa el alineamiento de los alérgenos del grupo 1 de ácaros intradomiciliarios, (proDer p 1, proDer f 1, Blo t 1 y Seq Nº 6) en esta podemos observar que la Seq Nº 5 comparte solo 2 de sus 20 aminoácidos, permitiría discriminar entre los géneros *Dermatophagoides*, del género *Blomia*.

Fig. 23. Representa el alineamiento de los alérgenos del grupo 1 de ácaros intradomiciliarios, (proDer p 1, proDer f 1, Blo t 1 y Seq Nº 8) en esta podemos observar que la Seq Nº 6 comparte solo 3 de sus 20 aminoácidos, permitiría discriminar entre los géneros *Dermatophagoides*, del género *Blomia*.

A continuación se presentan y se identifican las secuencias correspondientes a cada uno de los seis péptidos:

SEQ ID Nº 1 DER P 1 UN1: Fragmento oligopeptídico diseñado a partir de la región consenso entre las proteínas Derp 1, Derf 1 y Blot 1 y que presenta la secuencia específica

TNACSINGNAPAEIDLRQMR (20 aa)

SEQ ID N°2 DER P 1 PUJ1 homólogo**.-** Fragmento oligopeptídico diseñado a partir de la región consenso entre las proteínas Derp 1, Derf 1 y Blot 1 y que presenta la secuencia específica

PIRMQGGCGSCWAFSGV (17 aa)

SEQ ID N°3 DER P 1 PUJ2 homólogo: Fragmento oligopeptídico diseñado a partir de la región consenso entre las proteínas Derp 1, Derf 1 y Blot 1 y que presenta la secuencia específica

DYWIVRNSWDTNWGDNGYGY (20 aa)

SEQ ID N° 4 DER P 1 PUJ3: Fragmento oligopeptídico diseñado a partir de la región consenso entre las proteínas Derp 1, Derf 1 y Blot 1 y que presenta la secuencia específica
FRHYDGRTIIQRDNGYQPNY (20 aa)

SEQ ID N° 5 BLO T 1 UN2: Fragmento oligopeptídico diseñado a partir de la región consenso entre las proteínas Derp 1, Derf 1 y Blot 1 y que presenta la secuencia específica
IPANFDWRQKTHVNPIRNQG (19 aa)

SEQ ID N° 6 BLO T 1 PUJ4:- Fragmento oligopeptídico diseñado a partir de la región consenso entre las proteínas Derp 1, Derf 1 y Blot 1 y que presenta la secuencia específica

AHFRNLRKGILRGAGYNDAQ (20 aa)

3.1.2. Mapeo de epítopos

Con el propósito de establecer si nuestras secuencias estaban informadas en la base de datos *Immuneepitope,* (NIAID-NIH) se utilizaron los softwares *Epitope sequence and 3D structural homology mapping y Epitope viewer (Beaver JE, Bourne PE, Ponomarenko JV. 2007. EpitopeViewer: a Java application for the visualization and analysis of immune epitopes in the Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB). Immunome Res 3:3.)*, para definir en una búsqueda entre las secuencias informadas de epítopos en estas bases de datos, si las secuencias de los oligopéptidos descritas en esta invención eran idénticas a las descritas a la fecha para las proteínas de esta base de datos y para evidenciar las características estructurales de las secuencias en la estructura tridimensional de la proteína Der p1 (PDB).

Experiencias previas nos han permitido diferenciar enzimas homólogas de una misma familia haciendo uso de la metodología descrita. La gran mayoría de la experiencia que la literatura reporta en la modulación de la respuesta inmune, cuando de evaluación de la cascada inmunológica alérgica se trata, se ha logrado con proteínas y/o péptidos recombinantes. Podemos asegurar que no existe a la fecha informes previos del uso de péptidos sintéticos de alérgenos de ácaros intradomiciliarios para producir respuestas adaptativas específicas en organismos inmunocompetentes.

En la industria farmacéutica se desarrolla actualmente la búsqueda de nuevos fármacos y/o medicamentos en la terapia biológica, que incluyen el uso de proteínas completas o péptidos recombinantes. El uso de péptidos sintéticos provenientes de diferentes alérgenos, con capacidad de generar respuesta inmune adaptativa representa un modelo experimental hacia el logro de estos objetivos

A continuación se presentan los resultados de los análisis que soportan que los péptidos acá divulgados no han sido identificados como epítopos en las bases de datos para tal fin, así como tan poco se han reportado péptidos similares.

PÉPTIDO 1

En la Figura 5A se presenta el Péptido 1, diseñado con base en las proteínas alergénicas del grupo I. Esta no ha sido reportada en la base de datos “ImmuneEpitope”, dado que no se resalta en naranja.

Podemos observar en esta Figura 5B cómo el péptido 1, presenta aminoácidos enterrados (azul) aminoácidos expuestos (rojo), y aminoácidos medio expuestos y medio enterrado enterrados (sin color). Esta secuencia se encuentra en la superficie de la **proteína madura**. (Ver imagen 3D)

PÉPTIDO 2

En la Figura 6A observamos al Péptido 2, diseñado con base en las proteínas alergenicas del grupo I, se encuentra en la **proteína madura**. Esta no ha sido reportada en la base de datos*"ImmuneEpitope",* dado que no se resalta en naranja.

Podemos observar en la Figura 6B como la secuencia 2, presenta aminoácidos enterrados (azul) aminoácidos expuestos (rojo), y aminoácidos medio expuestos y medio enterrado enterrados (sin color). Esta secuencia presenta una gran región enterrada, debido a esto es posible que los epítopes presentes en esta secuencia se encuentre entre los aminoácidos entre la prolina (24) y la cisterna (31) de la **proteína madura**. (Ver imagen 3D)

PÉPTIDO 3

En la Figura 7A observamos el Péptido 3, diseñado con base en las proteínas alergénicas del grupo I. Esta secuencia se encuentra en la **proteína madura**. Esta no ha sido reportada en la base de datos "ImmuneEpitope", pues no aparece en color naranja.

En la Figura 7B podemos observar como la secuencia 3, en la estructura tridimensional presenta aminoácidos enterrados: (azul) aminoácidos expuestos (rojo) y aminoácidos expuestos parcialmente (sin color). La secuencia del péptido 1 se encuentra en la superficie de la **proteína madura**. (Ver imagen 3D)

PÉPTIDO 4

En la Figura 8A observamos al Péptido 4, diseñado con base en las proteínas alergenicas del grupo I, esta secuencia se encuentra en la **proteína madura**. Esta no ha sido reportada en la base de datos immune epítopo, dado que no se resalta en naranja.

Podemos observar en la Figura 8B como la secuencia 4, presenta aminoácidos enterrados (azul) aminoácidos expuestos (rojo), y aminoácidos medio expuestos y medio enterrado enterrados (sin color). Esta secuencia se encuentra en la superficie de la **proteína madura**. (Ver imagen 3D)

PÉPTIDO 5

En la Figura 9A observamos al Péptido 5, diseñado con base en las proteínas alergenicas del grupo I. Esta no ha sido reportada en la base de datos "ImmuneEpitope", dado que no se resalta en naranja. Para Blo t 1 no se ha reportado experimentalmente su estructura 3D, por tal razón, realizamos el mapeo en la estructura de la **proteína madura** Der p 1 con la cual presento una identidad del 37 % (11 de 19 aminoácidos) (ver segundo alineamiento). Podemos observar en esta gráfica como la secuencia 6, presenta aminoácidos enterrados (azul) aminoácidos expuestos (rojo), y aminoácidos medio expuestos y medio enterrados (sin color) en la Figura 9B.

PÉPTIDO 6

En la Figura 10 A observamos al Péptido 6, diseñado con base en las proteínas alergénicas del grupo I. Esta no ha sido reportada en la base de datos "ImmuneEpitope, dado que no se resalta en naranja. Para Blo t 1 no se ha reportado experimentalmente su estructura 3D. Podemos observar en esta gráfica como la secuencia 5, presenta aminoácidos enterrados (azul) aminoácidos expuestos (rojo), y aminoácidos medio expuestos y medio enterrado enterrados (sin color) en la Figura 10B.

3.1.3. Descripción de la síntesis de los péptidos

Los oligopéptidos anteriormente descritos en la presente invención fueron producidos por síntesis química aplicando química F-moc en fase sólida. El principio general de este método se basa en ciclos repetidos de acoplamiento y desprotección usando al 9*H*-(f)luoren-9-yl(m)eth(o)xy(c)arbonil, como grupo protector del extremo N-terminal de los péptidos en crecimiento. Se utilizó la máquina 396 de Advantace Chemtech, se purificaron por cromatografías FPLC y posteriormente liofilizados. La pureza de los péptidos se verifico por: RP-HPLC usando un cromatógrafo Waters. A cada uno de ellos se le confirmo su identidad por espectrometría de masas y su longitud oscilo entre 17 y 20 aminoácidos.

3.1.4. Evaluación capacidad inmunogénica:

EJEMPLO 1:

***OLIGOPÉPTIDO SINTÉTICO - PÉPTIDO 2 - DISEÑADO A PARTIR DE LAS SECUENCIAS HOMÓLOGAS DE LOS ALÉRGENOS DEL GRUPO I DE ÁCAROS INTRADOMICILIARIOS QUE PRODUCE* ANTICUERPOS IGY POLICLONALES ANTI-ALÉRGENOS DEL GRUPO I DE ÁCAROS INTRADOMICILIARIOS**

PÉPTIDO EVALUADO PÉPTIDO 2:

SECUENCIA: PIRMQGGCGSCWAFSGV

Para demostrar la capacidad inmunogénica de este péptido, se describe el uso de esta secuencia en la generación de anticuerpos específicos. En el grupo de experimentos se utilizó un modelo experimental aviar, representado por gallinas Hi Line Brown, inmunizadas con el péptido 2, usando adyuvante completo de Freund durante la primera inmunización y adyuvante incompleto de Freund, para las tres inmunizaciones posteriores descritas en el protocolo de inmunización utilizado. Como control positivo, se inmunizaron gallinas con BSA y como control negativo, gallinas sin ninguna inmunización. Los anticuerpos se extrajeron de la yema de huevo usando un solvente orgánico y se purificaron por cromatografía tiofílica. Se desarrollaron pruebas ELISA Indirecta para medir el título de anticuerpos y se determinó su especificidad por ELISA Indirecta. (25-26)

A continuación se presentan los resultados de un conjunto de experimentos que validan la inmunogenicidad de los péptidos. Como reactantes se utilizaron: l extractos alergénicos de Dpt, y Bt.

En la Figura 11 se ilustra el Elisa para el péptido 2. Los resultados de muestran los valores de DENSIDAD OPTICA (DO) resultantes de la interacción de los anticuerpos IgY anti - P02 con los extractos usados.

Resultado:

Las DO para los IgY anti P02 presentan un comportamiento semejante a lo largo de las fechas evaluadas con los extractos de Dpt y Bt. Se aprecia una mayor DO de estos IgY anti P06 contra las proteínas de Bt. Los picos de DO sobresalientes en la gráfica coinciden para las proteínas de las tres especies estudiadas.

Conclusiones: El oligopéptido sintético P02 (péptido universal de grupo 1 de ácaros intradomiciliarios) induce la producción de anticuerpos IgY anti-P06 que reconocen epítopes B y/o T en las proteínas nativas de las especies de los ácaros intradomiciliarios Df, Dp y Bt.

EJEMPLO 2:

***OLIGOPÉPTIDO SINTÉTICO - PÉPTIDO 6 - DISEÑADO A PARTIR DE LA SECUENCIA DE EL ALÉRGENO BLO T 1, QUE PRODUCE* ANTICUERPOS IGY POLICLONALES ANTI-ALÉRGENOS DEL GRUPO 1 DE ÁCAROS INTRADOMICILIARIOS**

PÉPTIDO EVALUADO PÉPTIDO 6:

SECUENCIA: AHFRNLRKGILRGAGYNDAQ

Para demostrar la capacidad inmunogénica de este péptido se describe el uso de este oligopéptido en la generación de anticuerpos IgY que reconocen alérgenos de los géneros Dp y Bt, En el grupo de experimentos se utilizó un modelo experimental aviar, representado por gallinas Hi Line Brown, inmunizadas con el péptido 2, usando adyuvante completo de Freund durante la primera inmunización y adyuvante incompleto de Freund, para las tres inmunizaciones posteriores descritas en el protocolo de inmunización utilizado. Como control positivo, se inmunizaron gallinas con BSA y como control negativo, gallinas sin ninguna inmunización. Los anticuerpos se extrajeron de la yema de huevo con un solvente orgánico y se purificaron por cromatografía tiofílica. Se desarrollaron pruebas ELISA Indirecta para medir el título de anticuerpos, y se determinó su especificidad por ELISA Indirecta. (25-26)

Se desarrollaron ELISAS indirectas usando como antígenos extractos de Dpt, y Bt. Se evalúo con los extractos de Anticuerpo IgY anti P02. En la Figura 12 se ilustran los resultados de Elisa para el péptidos 6.

Resultado: Las DO para las IgY anti P02 presentan un comportamiento semejante a lo largo de las fechas evaluadas con los extractos de Dpt y Bt. Se aprecia una mayor DO de estos IgY anti P02 contra las proteínas de Bt. Los picos de DO sobresalientes en la gráfica coinciden para las proteínas de las especies estudiadas.

Se logró obtener anticuerpos IgY policlonales específicos para los géneros Dp y Bt del grupo 1 de ácaros intradomiciliarios utilizando oligopéptidos sintéticos P02.

Conclusiones: El oligopéptido sintético P02 del grupo 1 de ácaros intradomiciliarios induce la producción de anticuerpos IgY anti-P06 que reconocen epítopes B y/o T en las proteínas nativas de los ácaros pertenecientes a los géneros Dp y Bt.

EJEMPLO 3:

***OLIGOPÉPTIDO SINTÉTICO - PÉPTIDO 1 - DISEÑADO A PARTIR DE LAS SECUENCIAS DE LOS ALÉRGENOS DER P1 Y DER F1 DEL GENERO DERMATOPHAGOIDES QUE PRODUCE* ANTICUERPOS IGY POLICLONALES ANTI-ALÉRGENOS DEL GRUPO 1 DE ÁCAROS INTRADOMICILIARIOS**

PÉPTIDO EVALUADO PÉPTIDO 1:

SECUENCIA: TNACSINGNAPAEIDLRQMR

Para demostrar la capacidad inmunogénicas de este péptido se describe el uso de este oligopéptido en la generación de anticuerpos IgY que reconocen alérgenos de los géneros Dp y Bt, En el grupo de experimentos se utilizó un modelo experimental aviar, representado por gallinas Hi Line Brown, inmunizadas con el péptido 4, usando adyuvante completo de Freund durante la primera inmunización y adyuvante incompleto de Freund, para las tres inmunizaciones posteriores descritas en el protocolo de inmunización utilizado. Como control positivo, se inmunizaron gallinas con BSA y como control negativo, gallinas sin ninguna inmunización. Los anticuerpos se extrajeron de la yema de huevo con un solvente orgánico y se purificaron por cromatografía tiofílica. Se desarrollaron pruebas ELISA Indirecta para medir el titulo de anticuerpos, y se determinó su especificidad por ELISA Indirecta. (25-26)

Se desarrollaron ELISAS INDIRECTAS usando como antígenos los extractos de Dpt y Bt. Se evalúo con los extractos crudos de Anticuerpo IgY anti P04. En la Figura 13 se ilustran los resultados del ELISA para el péptido 1.

Experimento:
Se desarrollaron ELISAS INDIRECTAS usando como antígenos los extractos de Dpt, y Bt. Se evalúo con los extractos crudos de Anticuerpo IgY anti P04

Resultado:
Las DO para los IgY anti P01 presentan un comportamiento semejante a lo largo de las fechas evaluadas con los extractos de Dpt y Bt. Se aprecia una mayor DO de estos IgY anti P01 contra las proteínas Bt. Los picos de DO sobresalientes en la gráfica coinciden para las proteínas de las especies estudiadas.

Se logró obtener anticuerpos IgY policlonales específicos del grupo 1 de ácaros intradomiciliarios utilizando oligopéptidos sintéticos P04.

Conclusiones: El oligopéptido sintéticos P01 del grupo 1 de ácaros intradomiciliarios induce la producción de anticuerpos IgY anti-P04 que reconoce epítopes B y/o T en las proteínas nativas de los ácaros intradomiciliarios Dp y Bt.

EJEMPLO 4:

***OLIGOPÉPTIDO SINTÉTICO - PÉPTIDO 5- DISEÑADO A PARTIR DE LA SECUENCIA DE EL ALÉRGENO BLO T 1, QUE PRODUCE* ANTICUERPOS IGY POLICLONALES ANTI-ALÉRGENOS DEL GRUPO 1 DE ÁCAROS INTRADOMICILIARIOS**

PÉPTIDO EVALUADO PÉPTIDO 5:

SECUENCIA: IPANFDWRQKTHVNPIRNQG

Para demostrar la capacidad inmunogénica de este péptido se describe el uso de esta secuencia en la generación de anticuerpos específicos. Se utilizó un modelo experimental aviar, representado por gallinas Hi Line Brown, inmunizadas con el péptido 5, usando adyuvante completo de Freund durante la primera inmunización y adyuvante incompleto de Freund, para las tres inmunizaciones posteriores descritas en el protocolo de inmunización utilizado. Como control positivo, se inmunizaron gallinas con BSA y como control negativo, gallinas sin ninguna inmunización. Los anticuerpos se extrajeron de la yema de huevo con un solvente orgánico y se purificaron por cromatografía tiofílica. Se desarrollaron pruebas ELISA Indirecta para medir el título de anticuerpos, y se determinó su especificidad por ELISA Indirecta (Figura 14)

Experimento: Se desarrollaron ELISAS indirectas usando como antígenos los extractos de Dpt, y Bt. Se evaluó con los extractos crudos de anticuerpo IgY anti P05 (Bt).

Resultado: Las DO para las IgY anti P05 son considerablemente mayores para Bt y Df en comparación con Dpt. Se logró la obtención de anticuerpos IgY policlónales específicos del grupo 1 de ácaros intradomiciliarios utilizando oligopéptidos sintéticos P05.

Conclusiones: El oligopéptido sintético P05 del grupo 1 de ácaros intradomiciliarios induce la producción de anticuerpos IgY anti-P05 que reconoce epítopes B y/o T en las proteínas nativas de los ácaros intradomiciliarios Dp y Bt.

3.2. MÉTODO DE OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES IGY Y MÉTODO DE DETECCIÓN DE ALÉRGENOS DE ÁCAROS.

Una modalidad de la invención aquí descrita corresponde al método para la obtención de una composición de anticuerpos policlonales IgY útil como reactivo diagnóstico de bajo costo y alta especificidad, para la detección de alérgenos de ácaros intradomiciliarios, dicho método comprende las etapas de:

a) preparar una composición inmunogénica que comprende al menos un péptido que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID Nos. 1, 2, 3, 5 y 6;
b) hiperinmunizar un ave con dicha composición inmunogénica;
c) extraer los anticuerpos policlonales IgY de la yema de huevo puesto por el ave;
d) purificar los anticuerpos policlonales IgY;
e) opcionalmente marcar los anticuerpos policlonales IgY; y,
f) opcionalmente generar inmunoconjugados de los anticuerpos policlonales IgY. La invención también abarca la composición de anticuerpos policlonales IgY como tal obtenidos por dicho método.

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

Con el primer método de la invención se logran obtener anticuerpos policlonales IgY con una alta especificidad, que reconocen alérgenos de ácaros intradomiciliarios, y que son inducidos por péptidos sintéticos especiales, que permiten dirigirlos a regiones particulares de proteínas de ácaros. Los anticuerpos policlonales IgY obtenidos en la presente invención son los únicos anticuerpos IgY descritos a la fecha, que son específicos para alérgenos de ácaros intradomiciliarios, pues los anticuerpos anti-alérgenos de ácaros descritos hasta el momento corresponden a anticuerpos monoclonales. Los péptidos sintéticos empleados en el método de la invención para la obtención de anticuerpos policlonales IgY son diseñados a partir de los diferentes alérgenos del grupo1 de ácaros intradomiciliarios y, son aquellos de secuencias SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6 divulgados anteriormente.

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

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

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

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

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

3.2.1. MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES IGY.

El primer método, que conduce a la manufactura de una composición de anticuerpos policlonales IgY, útil como reactivo diagnóstico de bajo costo para ácaros intradomiciliarios consiste en las etapas de:

a) preparar una composición inmunogénica que comprende al menos un péptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID N°. 1, 2, 3, 4, 5 y 6;
b) hiperinmunizar gallinas de la variedad Hy Line Brown, de 16 - 20 semanas de edad;
c) extraer los anticuerpos policlonales IgY de la yema de huevo puesto por el ave;
d) purificar los anticuerpos policlonales IgY,
e) opcionalmente marcar los anticuerpos policlonales IgY; y,
f) opcionalmente generar inmunoconjugados de los anticuerpos policlonales IgY.

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

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

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

En el paso d) la purificación se realiza por cromatografia de columna, v.gr. cromatografía tiofílica. En este caso se utiliza un soporte de Sefarosa CL4B activado con divinilsulfona (DVS) acoplado a β- mercaptoetanol (β-MESH), el soporte activo se equilibra en tampón de fosfatos 50 mM pH 6,8-7,8, se adiciona con Na_2SO_4 0,5 M (tampón de equilibrio). Posteriormente una dilución ½ de la muestra en tampón de equilibrio se adiciona al soporte de sefarosa activado. La elusión de la proteína retenida (anticuerpos policlonales IgY) se obtiene mediante la adición del tampón de fosfatos 50 mM pH 6.8-7.8.

Una vez son obtenidos los anticuerpos éstos son evaluados por técnicas inmunoquimicas conocidas, como por ejemplo ELISA indirecta. Los extractos alergénicos de los ácaros *Dermatophagoide pteronyssinus, Dermatophagoides farinae y/o Blomia tropicalis* son diluidos en PBS 1X y se adiciona a una placa de poliestireno, se incuba a 37ºC durante 15-24 horas en cámara húmeda. La placa se bloquea con solución de bloqueo (v.gr., PBS, Tween 0.05%, Leche descremada al 5%), se incuba durante 1-3 horas a 37ºC en cámara húmeda. Seguidamente se lava con solución de lavado (v.gr., PBS, Tween 0.05%). Se adicionan series de diluciones dobles de los anticuerpos (IgY producidas mediante el primer método de la invención) en las placas de poliestireno previamente tratadas y se incuba durante 0,5-2 horas a 37ºC en cámara húmeda, seguido de lavados en las condiciones descritas anteriormente. Finalmente, se adicionan anticuerpos Anti-IgY, conjugados (v.gr., Anti-IgY conjugada con peroxidasa) diluido 1/1000, se revela con sustrato (v.gr., TMB 3,3´,5,5´tetrametilbenzidina), la reacción se detiene con HCl 1N y se lee a una longitud de onda de 450nm. La anterior evaluación también puede efectuarse empleando técnicas inmunoquímicas directas conocidas en el arte.

Adicionalmente, en varias modalidades de la invención los anticuerpos policlonales IgY son marcados de acuerdo con técnicas de marcaje conocidas en la técnica o pueden formar inmunoconjugados como por ejemplo, inmunoconjugados con partículas de oro coloidal o biotina.

3.2.2. MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE ALÉRGENOS DE ÁCAROS.

El segundo método de la invención, dirigido a la detección de los alérgenos en muestras de polvo comprende las etapas de:

1. Toma de muestras de polvo de ambientes en los cuales este presente o se sospeche están presente los ácaros intradomiciliarios;
2. Preparación de extracto de proteínas de las muestras de polvo;
3. Desarrollo de pruebas inmunoquímicas con la composición de anticuerpos policlonales IgY obtenidos usando el primer método, evaluando la presencia de los alérgenos en las muestras colectadas previamente.

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

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

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

Para la detección de forma indirecta, se incuba la placa de poliestireno con el extracto de proteínas del polvo, luego se incuba nuevamente con los anticuerpos IgY anti alérgenos del grupo 1 de ácaros intradomiciliarios y posteriormente con el anticuerpo anti-IgY conjugado (p.ej., conjugado con peroxidasa), la reacción se revela agregando el sustrato (p.ej., TMB) y se detecta la absorbancia a 450 nm. La detección se efectúa por la correlación del cambio de color o fluorescencia a la presencia de los alérgenos de ácaros tal como se muestra en la Figura 15

EJEMPLO 5:

MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE UNA COMPOSICIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES IgY ÚTIL COMO REACTIVO DIAGNÓSTICO DE BAJO COSTO PARA LA DETECCIÓN DE ALÉRGENOS DE ÁCAROS INTRADOMICILIARIOS.

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

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

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

Los anticuerpos fueron purificados utilizando el soporte de Sefarosa CL4B activado con divinilsulfona (DVS), al cual se acopló β- mercaptoetanol (β-MESH) Dos mililitros del soporte activo se equilibraron en tampón de fosfatos 50 mM pH 7,4 adicionado con Na_2SO_4 0,5 M (tampón de equilibrio). Posteriormente una dilución 1:2 de la muestra en tampón de equilibrio se adicionó al soporte de sefarosa. La elusión de la proteína retenida se obtuvo mediante la adición del tampón de fosfatos 50 mM pH 7.4.

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

EJEMPLO 6:
MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE ALÉRGENOS DE ÁCAROS INTRADOMICILIARIOS:

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

EJEMPLO 7:

PRODUCCIÓN DE UNA PRUEBA INMUNOCROMATOGRÁFICA (LATERAL FLOW IMMUNOASSAYS) CON INMUNOCONJUGADOS IGY-NANOPARTICULAS DE ORO COLOIDAL.

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

ii) La zona de aplicación o "cojín muestra" está formada por una fibra de celulosa cuya función es remover el material viscoso o particulado presente en la mezcla y ajustar las condiciones de reacción para la inmunodetección.

iii) La zona de marcación o "cojín del conjugado" es compuesta por fibra de vidrio y constituye la fase móvil del sistema inmunocromatográfico, sobre esta se ha liofilizado un "conjugado coloreado", que es el anticuerpo de detección IgY anti- oligopeptidos sintéticos de los alérgenos Der p1, Der f1 y Blot 1 (obtenidos por el primer método de la invención), conjugado a nano-partículas de oro coloidal (40 nm); el anticuerpo de detección IgY se une específicamente al alérgeno presente en la muestra, formando el complejo "alérgeno-anticuerpo conjugado coloreado".

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

ivi) La cuarta sección sobre la tira de prueba está formada por un "cojín absorbente" que dirige el flujo lateral de la muestra en solución de forma continua corriente arriba (ver Figura 16).

Para la realización de esta prueba se emplea preferentemente el dispositivo divulgado en la patente WO2010/086730.

EJEMPLO 8:
PRODUCCIÓN DE UNA PRUEBA INMUNOCROMATOGRÁFICA (LATERAL FLOW IMMUNOASSAYS) CON INMUNOCONJUGADOS IGY- BIOTINA.

Para el inmunoensayo cromatográfico con inmunoconjugados IgY- Biotina, los anticuerpos purificados disueltos en buffer salino fosfato se marcaron con biotina usando un reactivo de marcación comercial NHS-LC- Biotina (Priece, Rockford, III). También se preparó una proteína portadora de straptavidina (BSA-streptavidina). El diseño de la tira de prueba se muestra en la Figura 17.

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

Para la realización de esta prueba se emplea preferentemente el dispositivo divulgado en la patente WO2010/086730.

Referencias:

1. Marasco D, Perretta G, Sabatella M, Ruvo M. Past and future perspectives of synthetic peptide libraries. Curr Protein Pept Sci. 2008 Oct;9(5):447-67.
2. Kauffman HF, Tamm M, Timmerman JA, Borger P. House dust mite major allergens Der p1 and Der p5 activate human airway-derived epithelial cells by protease-dependent and protease-independent mechanisms. Clin Mol Allergy. 2006 Mar 28;4(1):5.
3. **Egea E**., Olivares M., Garavito G., Tirado F. Prevalencia de sensibilización a alergenos intra domiciliarios en pacientes con asma en la ciudad de Barranquilla. Rev Col Neumologia 2000; 12(Supl): S184.

4. Platts-Mills TAE, Rakes G and Heymann P. the relevance of allergen exposure to the development of asthma in childhood. J Allergy Clin Immunol 2000; 105: S503-8.
5. Fernandez-Caldas E, Puerta L, et al. Mite allergens. Clin Allergy Immunol. 2004; 18:251-70.
6. International Union of Immunological societies (IUIS) Allergen Nomenclature Sub-committee. Allergen Nomenclature.
7. Chapman MD, Platts-Mills TA. Purification and characterization of the major allergen from Dermatophagoides pteronyssinus-antigen P1. J Immunol. 1980 Aug; 125(2):587-92.
8. Heymann PW, Chapman MD, Platts-Mills TA. Antigen Der f I from the dust mite Dermatophagoides farinae: structural comparison with Der p I from Dermatophagoides pteronyssinus and epitope specificity of murine IgG and human IgE antibodies. J Immunol. 1986 Nov 1;137(9):2841-7.
9. Charles J. Hackett, PhD, and Howard B. Dickler, MD. Immunologic tolerance for immune system–mediated diseases. J Allergy Clin Immunol 1999;103:362-70.
10. Briner, T. J., Kuo, M. C., Keating, K. M., Rogers, B. L., & Greenstein, J. L. (1993). Peripheral T-cell tolerance induced in naive and primed mice by subcutaneous injection of peptides from the major cat allergen Fel d I. Proc Natl Acad Sci U S A, 90, 7608– 7612.
11. Hoyne, G. F., O'Hehir, R. E., Wraith, D. C., Thomas, W. R., & Lamb, J. R. (1993). Inhibition of T cell and antibody responses to house dust mite allergen by inhalation of the dominant T cell epitope in naive and sensitized mice. J Exp Med, 178, 1783– 1788.
12. Astori, M., von Garnier, C., Kettner, A., Dufour, N., Corradin, G., & Spertini, F. (2000). Inducing tolerance by intranasal administration of long peptides in naive and primed CBA/J mice. J Immunol, 165, 3497– 3505.
13. Oldfield WL, Kay AB, Larche M. Allergen-derived T cell peptide induced late asthmatic reactions precede the induction of antigen-specific hyporesponsiveness in atopic allergic asthmatic subjects. J Immunol 2001;167:1734-9.
14. Norman PS, Ohman JL, Long AA, Creticos PS, Gefter MA, Shaked Z, et al. Treatment of cat allergy with T-cell reactive peptides. Am J Respir Crit Care Med 1996;154:1623-8.
15. Simons FE, Imada M, Li Y, Watson WT, HayGlass KT. Fel d 1 peptides: effect on skin tests and cytokine synthesis in cat-allergic human subjects. Int Immunol 1996;8:1937-45.
16. Leslie GA, Clem LW. Philogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. J Exp Med. 1969; 130: 1337-52.
17. Warr GW, Margor KE, et al. IgY: clues to the origins of modern antibodies. Immunol Today 1995; 16:392-8.
18. Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, et al. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. J Immunol Meths 1981; 46:63-8.
19. Polson A, Von Wechmar MB, et al. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. Immunol Comm 1980; 9:475-93.
20. Burley MW, Cook WH. Isolation and composition of avian yolk granules and their constituents alpha and beta-lipovitellins. Can J Biochem Physiol 1961; 39:1295302.
21. Margor KE, et al. One gne encodes the heavy chains for three different forms of IgY in the duck. J Immunol 1994; 153: 5549-55.
22. Finlay W. J. J., de Vore N. C., Dobrovolskaia E. N., Gam A., Goodyear C. S. and Slate J. E.. Exploiting the avian immunoglobulin system to simplify the generation of recombinant antibodies to allergenic proteins. Clinical & Experimental Allergy 2005; 35: 1040.
23. Blais B. W., L. M. Phillippe. A Cloth-based Enzyme Immunoassay for Detection of Peanut Proteins in Foods. Food and Agriculture immunology 2000; 12(3): 243-248.
24. Burton W, Mahomed O, et al. Deteccion of Brazil nut proteins in foods by enzyme immunoassay. Food and agricultural Immunology 2002;14(2): 163-168.
25. Hermanson GT, Mallia A, Smith P. Immobilized affinity ligand techniques. San Diego: Academic Press; 1992. P.110-6.
26. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979;76:4350-4.
27. Cheong N, et al. Lack of human IgE cross-reactivity between mite allergens Blo t 1 and Der p 1. Allergy 2003; 58:912-920.
28. Chua KY, et al. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p I. Homology with cystine protease. J Exp Med 1988;167:175-182.
29. Schulz, O., H. F. Sewell, F. Shakib. 1999. The interaction between the dust mite antigen Der p 1 and cell-signalling molecules in amplifying allergic disease. *Clin. Exp. Allergy 29*:*439.-444*.
30. Heymann PW, Chapman MD, Platts-Mills TAE. Antigen Der f I from the house dust mite *Dermatophagoides farinae.* In structural comparison with Der p I from *Dermatophagoides pteronyssinus* and human IgE epitope specificity of murine IgG and human IgE antibodies. J Immunol 1986; 137:2841-2847.
31. Alberse RC. Structural biology of allergens. J Allergy Clin Immunol 2000;106:228–238.
32. Chapman MD, et al. Nomenclature and structural biology of allergens J Allergy Clin Immunol 2007;119: 414-20.
33. Marsh DG., Goodfriend L., King TP., et al. Allergen nomenclature. Bull WHO 1986; 64:767.

34. Pómes A. Intrinsic properties of allergens and environmental exposure as determinants of allergenicity. Allergy 2002; 57: 673-679.

35. Woodfolk JA., Wheatley LM., Piyasena RV., et al. *Trichophyton* antigens associated with IgE antibodies and delayed type hypersensitivity: sequence homology to two families of serine proteinases. J Biol Chem 1998; 273: 29489..

36. Schellenberg RR., Adkinson NF. Measurement of absolute amounts of antigen-specific human IgE by a radioallergosorbent test (RAST) elution technique. J Immunol 1975; 115: 1577.

37. Bohle B., Schwihla H., Hu HZ., et al. long lived T_{h2} clones specific for seasonal and perennial allergens can be detected in blood an skin by their TCR-hypervariable regions. J Immunol 1998; 160: 2020.

38. Ring J, Kramer U, Schafer T et al. Why are allergies increasing? Curr Opin Immunol 2001; 13: 701-708.

39. Sánchez-De la Vega W, Sánchez-Medina M, Lucena G, Vanella L, Moreno G, Albornoz A, et al. Manual Latinoamericano de Alergia e Inmunologia 1987: primera edición. Colciencias ISBN 958-608-045-5. Pags: 39-60.

40. Weghofer M, Thomas WR, Pittner G, Horak F, Valenta R, Vrtala S. Comparison of purified Dermatophagoides pteronyssinus allergens and extract by two-dimensional immunoblotting and quantitative immunoglobulin E inhibitions. Clin Exp Allergy. 2005 Oct;35(10):1384-91.

41. Arlian LG,Bernstein D,Bernstein IL,Friedman S, Grant A, Lieberman P, Lopez M, Metzger J, Platts-Mills T, Schatz M, et al. Prevalence of dust mites in the homes of people with asthma living in eight different geographic areas of the United States. J Allergy Clin Immunol. 1992 Sep;90(3 Pt 1):292-300.

42. Fernandez-Caldas E, Lockey RF. Blomia tropicalis, a mite whose time has come. Allergy. 2004 Nov;59(11):1161-4.

43. International Union of Immunological societies (IUIS) Allergen Nomenclature Sub-committee. Allergen Nomenclature. www.allergen.org

44. Heymann PW, Chapman MD, Platts-Mills TAE. Antigen Der f I from the house dust mite *Dermatophagoides farinae.* In structural comparison with Der p I from *Dermatophagoides pteronyssinus* and human IgE epitope specificity of murine IgG and human IgE antibodies. J Immunol 1986; 137:2841-2847.

45. Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, et al. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. J Immunol Meths 1981; 46:63-8.

46. Thoma WR, et al. Cloning and expression of DNA coding for the major house dust mite allergen Der p 1 in *E. coli*. Int Arch Allergy Appl Immunol 1986; 85:127-129.

47. Chua KY, et al. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p I. Homology with cystine protease. J Exp Med 1988;167:175-182.

48. Dilworth RJ, et al. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen. Der f I. Clin Exp Allergy 1991; 21:25-32.

49. Schulz, O., H. F. Sewell, F. Shakib. 1999. The interaction between the dust mite antigen Der p 1 and cell-signalling molecules in amplifying allergic disease. *Clin. Exp. Allergy 29*:*439*.-*444*.

50. Lind P, Lowenstein H. Identification of allergens in *Dermatophagoides pteronssinus* mite body extract by crossed radioimmunoelectrophoresis with two different rabbit antibody pools. Scand J immunol 1983; 17:263-273.

51. Lind WR, et al. Purification and partial characterization of two major allergens from the house dust mite Dermatophagoides pteronyssinus. J Allergy Clin Immunol 1988;76:753-761.

52. Vand der ee JS, et al. Skin tests and histamine release with P1-depleted Dermatophagoides pteronyssinus body extracts and purified P1. J Allergy Clin Immunol 1988; 81:884-895.

53. Barrett AJ, Rawlings ND. Evolutionary lines of cysteine peptidases. Biol Chem. 2001 May;382(5):727-33.

54. Chua, K. Y., G. A. Stewart, W. R. Thomas, R. J. Simpson, R. J. Dilworth, T. M. Plozza, K. J. Turner. 1988. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1: homology with cysteine proteases. *J. Exp. Med. 167*:*175.-182*.

55. Smith WA, et al. Allergens of wild house dust mites: environmental Der p 1 and Der p 2 sequence polymorphisms. J Allergy Clin Immunol 2001; 107:285-992.

56. Jarnicki AG, et al. Stimulatory and inhibitory epitopes in the T cell responses of mice to Der p 1. Clin Exp Allergy 2002; 32:942-950.

57. Vernet, T., H. E. Khouri, P. Laflamme, D. C. Tessier, R. Musil, B. J. Gour-Salin, A. C. Storer, D. Y. Thomas. 1991. Processing of the papain precursor: purification of the zymogen and characterization of its mechanism of processing. *J. Biol. Chem. 266*:*21451.-21457*.

58. Ikemura, H., H. Takagi, M. Inouye. 1987. Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem. 262*:*7859.-7864*.

59. Menard, R., J. Carriere, P. Laflamme, C. Plouffe, H. E. Khouri, T. Vernet, D. C. Tessier, D. Y. Thomas, A. C. Storer. 1991. Contribution of the glutamine 19 side chain to transition-state stabilization in the oxyanion hole of papain. *Biochemistry 30*:*8924.-8928*.

60. Meno K, Thorsted PB, Ipsen H, Kristensen O, Larsen JN, Spangfort MD, Gajhede M, Lund K.The Crystal Structure of Recombinant proDer p 1, a Major House Dust Mite Proteolytic. *J Immunol.*2005; 175: 3835-3845.

61. De Halleux, S., Stura, E., VanderElst, L., Carlier, V., Jacquemin, M., Saint-Remy, J.-M. Three-dimensional structure and IgE-binding properties of mature fully active Der p 1, a clinically relevant major allergen *J.Allergy Clin.Immunol. 2006; 117: 571-576.*

62. Storer, A. C., R. Menard. 1994. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods Enzymol. 244:486.-500*.

63. Barrett, A. J., N. D. Rawlings, J. F. Woesser. 1998. Cysteine peptidases. *Handbook of Proteolytic Enzymes 543.-798*. Academic Press, London.

64. Smith WA, Hales BJ, Jarnicki AG, Thomas WR. Allergens of wild house dust mites: environmental Der p 1 and Der p 2 sequence polymorphisms. J Allergy Clin Immunol 2001;107:985-92.

65. Schultz et al. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5857-5864.

66. Letunic et al. SMART 5: domains in the context of genomes and networks (2006) *Nucleic Acids Res* **34**, D257-D260.

67. Chapman MD, Platts-Mills TA. Purification and characterization of the major allergen from Dermatophagoides pteronyssinus-antigen P1. J Immunol. 1980 Aug; 125(2):587-92.

68. Heymann PW, Chapman MD, Platts-Mills TA. Antigen Der f I from the dust mite Dermatophagoides farinae: structural comparison with Der p I from Dermatophagoides pteronyssinus and epitope specificity of murine IgG and human IgE antibodies. J Immunol. 1986 Nov 1;137(9):2841-7.

69. Furmonaviciene R, Shakib F. The molecular basis of allergenicity: comparative analysis of the three dimensional structures of diverse allergens reveals a common structural motif. Mol Pathol. 2001 Jun;54(3):155-9.

70. Furmonaviciene R, Sewell HF, Shakib F. Comparative molecular modelling identifies a common putative IgE epitope on cysteine protease allergens of diverse sources. Clin Exp Allergy. 2000 Sep;30(9):1307-13.

71. Schellenberg RR., Adkinson NF. Measurement of absolute amounts of antigen-specific human IgE by a radioallergosorbent test (RAST) elution technique. J Immunol 1975; 115: 1577.

72. Bohle B., Schwihla H., Hu HZ., et al. long lived T_{h2} clones specific for seasonal and perennial allergens can be detected in blood an skin by their TCR-hypervariable regions. J Immunol 1998; 160: 2020.

73. Goodman RE. Practical and predictive bioinformatics methods for the identification of potentially cross-reactive protein matches. Mol Nutr Food Res. 2006 Jul;50(7):655-60.

74. Thomas WR, Smith WA, Hales BJ. The allergenic specificities of the house dust mite. Chang Gung Med J. 2004 Aug;27(8):563-9.

75. Simpson A, Green R, Custovic A, Woodcock A, Arruda LK, Chapman MD. Skin test reactivity to natural and recombinant Blomia and Dermatophagoides spp. allergens among mite allergic patients in the UK. Allergy. 2003 Jan;58(1):53-6.

76. Pauli G, Bessot JC. The fight against mites. Allergy Today 1998;2(7):7-9.

77. Fernández E, Puerta L, Mercado D, Lockey RF, Caraballo L. Mite fauna Der p1, Der f1 and Blomia tropicalis allergen in a tropical environment. Clin Exp Allergy 1993;23(4):2992-7.

78. Carswell F. House dust allergy. ACI Int 1996;8(5-6):169-71.

79. Marchler-Bauer A, Bryant SH. *"CD-Search: protein domain annotations on the fly."*, Nucleic Acids Res. 2004; 32: 27-331.

80. Thomas WR, Hales BJ, Smith WA. Recombinant allergens for analysing T-cell responses.Methods. 2004 Mar;32(3):255-64.

81. Aalberse RC. Structural features of allergenic molecules. Chem Immunol Allergy. 2006;91:134-46.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

93. Santos AB, Chapman MD, Aalberse RC et al. Cockroach allergens and asthma in Brazil: identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergens. J Allergy Clin Immunol 1999; 104: t-37

94. Guidos F, V. Almeida A. Polinosis y aeroalérgenos. Alergia asma e inmunologia pediátrica. 2005; 14 (2): pp 52-55.

95. N. deVore, W. Finlay, E. Cloning and Analysis of Mono-Specific scFv Fragments From Chicken to Allergenic Proteins of Periplaneta Americana (American Cockroach). J Allergy and Clinical immunology 2005; 113 (2):S297.

96. Finlay, W. J. J.; deVore, N. C. Exploiting the avian immunoglobulin system to simplify the generation of recombinant antibodies to allergenic proteins. Clinical & Experimental Allergy. 2005, 35(8):1040-1048.

97. J. Bousquet, B. Björkstén, C. A. F. M. Bruijnzeel-Koomen, A. Huggett, C. Ortolani, J. O. Warner, M. Smith. Scientific criteria and the selection of allergenic foods for product labeling. Allergy 53 (1998) 3–21.

98. M. Besler, Determination of allergens in foods Trends Anal. Chem. 20 (2001) 662.

99. Helm RM, Burks AW. Food allergens. Clin Allergy Immunol. 2008;21:219-35.

100. Zarkadas, M., Scott, F. W., Salminen, J., & Ham Pong, A. (1999).Common allergenic foods and their labelling in Canada—a review.Canadian Journal of Allergy and Clinical Immunology, 4, 118–141.

101. Burton W. Blais , Melissa Gaudreault, Lucille M. Phillippe. Multiplex enzyme immunoassay system for the simultaneous detection of multiple allergens in foods. Food Control 14 (2003) 43–47.

102. HOURIHANE, J. O'B., KILBURN, S. A., NORDLEE, J. A., HEFLE, S. L., TAYLOR, S. L. & WARNER, J. O. (1997) An evaluation of the sensitivity of subjects with peanut allergy to very low doses of peanut protein: a randomized, double-blind, placebo-controlled food challenge study, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 100, 596– 600.

103. B. W. BLAIS AND L. M. PHILLIPPE. A Cloth-based Enzyme Immunoassay for Detection of Peanut Proteins in Foods. *Food and Agricultural Immunology* (2000) *12*, 243–248.

104. E. Drs a, S. Baumgartner a, M. Bremer. Detection of hidden hazelnut protein food by IgY-based indirect competitive enzyme-immunoassay. Analytica Chimica Acta 520 (2004) 223–228.

105. Burton W. Blais, Melissa Gaudreault, Lucille M. Phillippe. Multiplex enzyme immunoassay system for the simultaneous detection of multiple allergens in foods. Food Control 14 (2003) 43–47

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DEL NORTE
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

<120> OLIGOPÉPTIDOS SINTÉTICOS DISEÑADOS A PARTIR DE CISTEINPROTEASAS DE ÁCAROS Y MÉTODOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS IGY POLICLONALES PARA LA DETECCIÓN DE ÁCAROS INTRADOMICILIARIOS

<130> P7743EPPC

<150> CO 09027540
<151> 2009-03-17

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Fragmento de olgopéptido diseñado a partir de la región de homología entre las proteínas Derp 1, Derf 1 y Blot 1

<400> 1

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

Arg Gln Met Arg
20

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Fragmento de olgopéptido diseñado a partir de la región de homología entre las proteínas Derp 1, Derf 1 y Blot 1

<400> 2

Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly
1 5 10 15

Val

<210> 3
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Fragmento de olgopéptido diseñado a partir de la región de homología entre las proteínas Derp 1, Derf 1 y Blot 1

<400> 3

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

Gly Tyr Gly Tyr
20

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Fragmento de olgopéptido diseñado a partir de la región de homología entre las proteínas Derp 1, Derf 1 y Blot 1

<400> 4

Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln Arg Asp Asn Gly Tyr
1 5 10 15

Gln Pro Asn Tyr
20

<210> 5
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Fragmento de olgopéptido diseñado a partir de la región de homología entre las proteínas Derp 1, Derf 1 y Blot 1

<400> 5

Ile Pro Ala Asn Phe Asp Trp Arg Gln Lys Thr His Val Asn Pro Ile
1 5 10 15

Arg Asn Gln Gly
20

<210> 6
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Fragmento de olgopéptido diseñado a partir de la región de homología

entre las proteínas Derp 1, Derf 1 y Blot 1

<400> 6

Ala His Phe Arg Asn Leu Arg Lys Gly Ile Leu Arg Gly Ala Gly Tyr
1 5 10 15

Asn Asp Ala Gln
20

<210> 7
<211> 222
<212> PRT
<213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 7

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

Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
20 25 30

Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
35 40 45

Ala Tyr Arg Gln Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
50 55 60

Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
65 70 75 80

Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
85 90 95

Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
100 105 110

Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg
115 120 125

Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
130 135 140

Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
145 150 155 160

Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly

165 170 175

Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
180 185 190

Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
195 200 205

Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
210 215 220

<210> 8
<211> 320
<212> PRT
<213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 8

Met Lys Ile Val Leu Ala Ile Ala Ser Leu Leu Ala Leu Ser Ala Val
1 5 10 15

Tyr Ala Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala
20 25 30

Phe Asn Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys
35 40 45

Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile
50 55 60

Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu
65 70 75 80

Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn
85 90 95

Ala Glu Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile
100 105 110

Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly
115 120 125

Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala
130 135 140

Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu
145 150 155 160

```
Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg
                165                 170                 175

Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr
            180                 185                 190

Arg Tyr Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg
        195                 200                 205

Phe Gly Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys
    210                 215                 220

Ile Arg Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile
225                 230                 235                 240

Gly Ile Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile
                245                 250                 255

Ile Gln Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile
            260                 265                 270

Val Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn
        275                 280                 285

Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala
    290                 295                 300

Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
305                 310                 315                 320
```

<210> 9
<211> 222
<212> PRT
<213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 9

```
Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
1               5                   10                  15

Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
            20                  25                  30

Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
        35                  40                  45
```

```
Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
    50                  55                  60

Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
65                  70                  75                  80

Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
                85                  90                  95

Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
            100                 105                 110

Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg
        115                 120                 125

Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
    130                 135                 140

Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
145                 150                 155                 160

Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
                165                 170                 175

Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
            180                 185                 190

Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
        195                 200                 205

Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
    210                 215                 220
```

<210> 10
<211> 222
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de conservación derivada de SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:7

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(52)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>

<221> misc_feature
<222> (124)..(124)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<400> 10

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

Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
20 25 30

Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
35 40 45

Ala Tyr Arg Xaa Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
50 55 60

Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
65 70 75 80

Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
85 90 95

Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
100 105 110

Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Xaa Asn Lys Ile Arg
115 120 125

Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
130 135 140

Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
145 150 155 160

Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
165 170 175

Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
180 185 190

Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
195 200 205

Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
210 215 220

<210> 11
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Fragmento de olgopéptido diseñado a partir de la región de homología entre las proteinas Derp 1, Derf 1 y Blot 1

<400> 11

Pro Ala Asn Phe Asp Trp Arg Gln Lys Thr His Val Asn Pro Ile Arg
1 5 10 15

Asn Gln Gly

<210> 12
<211> 221
<212> PRT
<213> Blomia tropicalis

<400> 12

Ile Pro Ala Asn Phe Asp Trp Arg Gln Lys Thr His Val Asn Pro Ile
1 5 10 15

Arg Asn Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ala Ala Ser Ser
20 25 30

Val Ala Glu Thr Leu Tyr Ala Ile His Arg His Gln Asn Ile Ile Leu
35 40 45

Ser Glu Gln Glu Leu Leu Asp Cys Thr Tyr His Leu Tyr Asp Pro Thr
50 55 60

Tyr Lys Cys His Gly Cys Gln Ser Gly Met Ser Pro Glu Ala Phe Lys
65 70 75 80

Tyr Met Lys Gln Lys Gly Leu Leu Glu Glu Ser His Tyr Pro Tyr Lys
85 90 95

Met Lys Leu Asn Gln Cys Gln Ala Asn Ala Arg Gly Thr Arg Tyr His
100 105 110

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

Gln Ala Ala Ile Met Asn His Gly Pro Val Val Ile Tyr Ile His Gly
130 135 140

Thr Glu Ala His Phe Arg Asn Leu Arg Lys Gly Ile Leu Arg Gly Ala
145 150 155 160

Gly Tyr Asn Asp Ala Gln Ile Asp His Ala Val Val Leu Val Gly Trp
165 170 175

Gly Thr Gln Asn Gly Ile Asp Tyr Trp Ile Val Arg Thr Ser Trp Gly
180 185 190

Thr Gln Trp Gly Asp Ala Gly Tyr Gly Phe Val Glu Arg His His Asn
195 200 205

Ser Leu Gly Ile Asn Asn Tyr Pro Ile Tyr Ala Ser Leu
210 215 220

<210> 13
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Residuos 2-216 del precursor de cistein proteasa (Blomia tropicalis)

<400> 13

Pro Ala Asn Phe Asp Trp Arg Gln Lys Thr His Val Asn Pro Ile Arg
1 5 10 15

Asn Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ala Ala Ser Ser Val
20 25 30

Ala Glu Thr Leu Tyr Ala Ile His Arg His Gln Asn Ile Ile Leu Ser
35 40 45

Glu Gln Glu Leu Leu Asp Cys Thr Tyr His Leu Tyr Asp Pro Thr Tyr
50 55 60

Lys Cys His Gly Cys Gln Ser Gly Met Ser Pro Glu Ala Phe Lys Tyr
65 70 75 80

Met Lys Gln Lys Gly Leu Leu Glu Glu Ser His Tyr Pro Tyr Lys Met
85 90 95

Lys Leu Asn Gln Cys Gln Ala Asn Ala Arg Gly Thr Arg Tyr His Val
100 105 110

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

Ala Ala Ile Met Asn His Gly Pro Val Val Ile Tyr Ile His Gly Thr
130 135 140

Glu Ala His Phe Arg Asn Leu Arg Lys Gly Ile Leu Arg Gly Ala Gly
145 150 155 160

Tyr Asn Asp Ala Gln Ile Asp His Ala Val Val Leu Val Gly Trp Gly
165 170 175

Thr Gln Asn Gly Ile Asp Tyr Trp Ile Val Arg Thr Ser Trp Gly Thr
180 185 190

Gln Trp Gly Asp Ala Gly Tyr Gly Phe Val Glu Arg His His Asn Ser
195 200 205

Leu Gly Ile Asn Asn Tyr Pro
210 215

<210> 14
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de conservación derivada de SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO:15

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza
<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(11)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza
<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)

<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(33)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(36)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(40)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(42)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (44)..(46)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)..(48)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (53)..(53)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (56)..(66)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (70)..(74)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (76)..(79)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (81)..(84)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (86)..(88)

<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (91)..(91)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (93)..(93)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (95)..(100)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (102)..(108)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (110)..(112)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (114)..(114)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (116)..(128)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (130)..(133)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (135)..(136)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (138)..(138)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (140)..(140)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (142)..(145)

<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (147)..(147)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (150)..(151)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (153)..(154)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (156)..(156)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (158)..(159)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (162)..(167)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (171)..(172)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (175)..(179)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (181)..(181)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (188)..(188)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (191)..(191)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (193)..(193)

<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (197)..(197)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (201)..(210)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (212)..(213)
<223> Xaa puede ser un aminoácido que ocurre en la naturaleza

<400> 14

Pro Ala Xaa Xaa Asp Xaa Arg Gln Xaa Xaa Xaa Val Xaa Pro Ile Arg
1 5 10 15

Xaa Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Leu Xaa
35 40 45

Glu Gln Glu Leu Xaa Asp Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa His Gly Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr
65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Glu Ser Xaa Tyr Xaa Tyr Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Ser Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
115 120 125

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Val Xaa Ile Xaa Ile Xaa Xaa Xaa
130 135 140

Xaa Ala Xaa Phe Arg Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Ile Xaa Arg Xaa Xaa Gly
145 150 155 160

Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Ala Val Xaa Xaa Val Gly Xaa Xaa

165 170 175

Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Asp Tyr Trp Ile Val Arg Xaa Ser Trp Xaa Thr
180 185 190

Xaa Trp Gly Asp Xaa Gly Tyr Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
195 200 205

Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Tyr Pro
210 215

<210> 15
<211> 207
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Residuos 11-217 de cistein proteasa (Dermatophagoides pteronyssinus)

<400> 15

Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg
1 5 10 15

Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala
20 25 30

Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Gln Gln Ser Leu Asp Leu Ala
35 40 45

Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp
50 55 60

Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln
65 70 75 80

Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro
85 90 95

Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro
100 105 110

Asn Ala Asn Lys Ile Arg Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile
115 120 125

Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp
130 135 140

```
Gly Arg Thr Ile Ile Gln Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His
145                 150                 155                 160

Ala Val Asn Ile Val Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp
                165                 170                 175

Ile Val Arg Asn Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly
            180                 185                 190

Tyr Phe Ala Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro
        195                 200                 205
```

<210> 16
<211> 321
<212> PRT
<213> Dermatophagoides farinae

<400> 16

```
Met Lys Phe Val Leu Ala Ile Ala Ser Leu Leu Val Leu Ser Thr Val
1               5                   10                  15

Tyr Ala Arg Pro Ala Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Phe Lys Lys Ala
            20                  25                  30

Phe Asn Lys Asn Tyr Ala Thr Val Glu Glu Glu Glu Val Ala Arg Lys
        35                  40                  45

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

Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu Gln Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn
                85                  90                  95

Ala Glu Thr Ser Ala Cys Arg Ile Asn Ser Val Asn Val Pro Ser Glu
            100                 105                 110

Leu Asp Leu Arg Ser Leu Arg Thr Ala Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly
        115                 120                 125

Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser
    130                 135                 140
```

```
Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Thr Ser Leu Asp Leu Ser Glu Gln Glu
145                 150                 155                 160

Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro
                165                 170                 175

Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln Gln Asn Gly Val Val Glu Glu Arg Ser
            180                 185                 190

Tyr Pro Tyr Val Ala Arg Glu Gln Gln Cys Arg Arg Pro Asn Ser Gln
        195                 200                 205

His Tyr Gly Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asp Val Lys
    210                 215                 220

Gln Ile Arg Glu Ala Leu Thr Gln Thr His Thr Ala Ile Ala Val Ile
225                 230                 235                 240

Ile Gly Ile Lys Asp Leu Arg Ala Phe Gln His Tyr Asp Gly Arg Thr
                245                 250                 255

Ile Ile Gln His Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn
            260                 265                 270

Ile Val Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg
        275                 280                 285

Asn Ser Trp Asp Thr Thr Trp Gly Asp Ser Gly Tyr Gly Tyr Phe Gln
    290                 295                 300

Ala Gly Asn Asn Leu Met Met Ile Glu Gln Tyr Pro Tyr Val Val Ile
305                 310                 315                 320

Met
```

<210> 17
<211> 220
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Residuos 101-320 de preproenzima de alérgeno DER P 1 (proDerp1)

<400> 17

```
Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln
```

```
1               5                   10                  15

Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys
            20                  25                  30

Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr
        35                  40                  45

Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala
    50                  55                  60

Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr
65                  70                  75                  80

Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala
                85                  90                  95

Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser
            100                 105                 110

Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg Glu Ala
        115                 120                 125

Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys Asp
    130                 135                 140

Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln Arg Asp
145                 150                 155                 160

Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly Tyr Ser
                165                 170                 175

Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp Asp Thr
            180                 185                 190

Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile Asp Leu
        195                 200                 205

Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
    210                 215                 220
```

<210> 18
<211> 221
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Residuos 101-321 de alérgeno Derf 1 (proDerp1)

<400> 18

Ala Cys Arg Ile Asn Ser Val Asn Val Pro Ser Glu Leu Asp Leu Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Thr Ala Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser
20 25 30

Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala
35 40 45

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

Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gln Gln Cys Arg Arg Pro Asn Ser Gln His Tyr Gly Ile
100 105 110

Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asp Val Lys Gln Ile Arg Glu
115 120 125

Ala Leu Thr Gln Thr His Thr Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys
130 135 140

Asp Leu Arg Ala Phe Gln His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln His
145 150 155 160

Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly Tyr
165 170 175

Gly Ser Thr Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp Asp
180 185 190

Thr Thr Trp Gly Asp Ser Gly Tyr Gly Tyr Phe Gln Ala Gly Asn Asn
195 200 205

Leu Met Met Ile Glu Gln Tyr Pro Tyr Val Val Ile Met
210 215 220

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una composición de anticuerpos policlonales IgY contra alérgenos de ácaros útil como reactivo de diagnóstico, caracterizado porque comprende las etapas de:
a) preparar una composición inmunogénica que comprende al menos un péptido que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID Nos. 1, 2, 3, 5 y 6;
b) hiperinmunizar un ave con dicha composición inmunogénica;
c) extraer los anticuerpos policlonales IgY de la yema de huevo puesto por el ave; y
d) purificar los anticuerpos policlonales IgY;
e) opcionalmente marcar los anticuerpos policlonales IgY; y,
f) opcionalmente generar inmunoconjugados de los anticuerpos policlonales IgY.

2. El método de Reivindicación 1, en donde la etapa b) incluye más de una inmunización.

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

4. El método de laS Reivindicaciones1 y 2, en donde, en la etapa b), la hiperinmunización se efectúa en gallinas de la línea comercial Hy Line Brown.

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

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

7. Una composición de anticuerpos policlonales IgY obtenidos por el método de la Reivindicación 1.

8. Un método para la detección de alérgenos de ácaros en muestras de polvo provenientes de espacios intramuros usando anticuerpos policlonales IgY específicos para las proteínas alergénicas de ácaros intradomiciliarios producidos de los oligopéptidos de la Reivindicación 1, que comprende los siguientes pasos:
i) tomar muestras de polvo de ambientes en los cuales esté presente o se sospeche están presentes los ácaros intradomiciliarios;
ii) preparar extractos de proteínas de las muestras de polvo;
iii) desarrollar pruebas inmunoquímicas por contacto del extracto de proteínas con la composición de anticuerpos policlonales IgY de la Reivindicación 7, con el fin de evaluar la presencia de alérgenos en las muestras colectadas previamente.

9. El método de la Reivindicación 8, en donde en el paso (ii), las muestras se preparan empleando un buffer de extracción PBS - Tween, agitación, centrifugación y filtración con un filtro de 0.22 µm, preservando el sobrenadante y descartando los sólidos retenidos en el filtro.

10. El método de la Reivindicación 8, en donde el paso (iii) comprende poner en contacto el extracto proteico con la composición de anticuerpos policlonales IgY, y la detección de los alérgenos se efectúa mediante anticuerpos anti-IgY conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) diluidos 1/1000, y la prueba se revela con sustrato TMB 3,3´,5,5´tetrametilenzidina.

11. El método de la Reivindicación 8, en donde la detección de alérgenos de ácaros se efectúa mediante una prueba inmunocromatográfica (lateral Flow Immunoassays) con inmunoconjugados seleccionados entre inmunoconjugado IgY-nanoparticulas de oro coloidal, e inmunoconjugado IgY-biotina.

12. Un kit analítico para la detección de ácaros que comprende la composición de anticuerpos de la Reivindicación 7.

A **B**

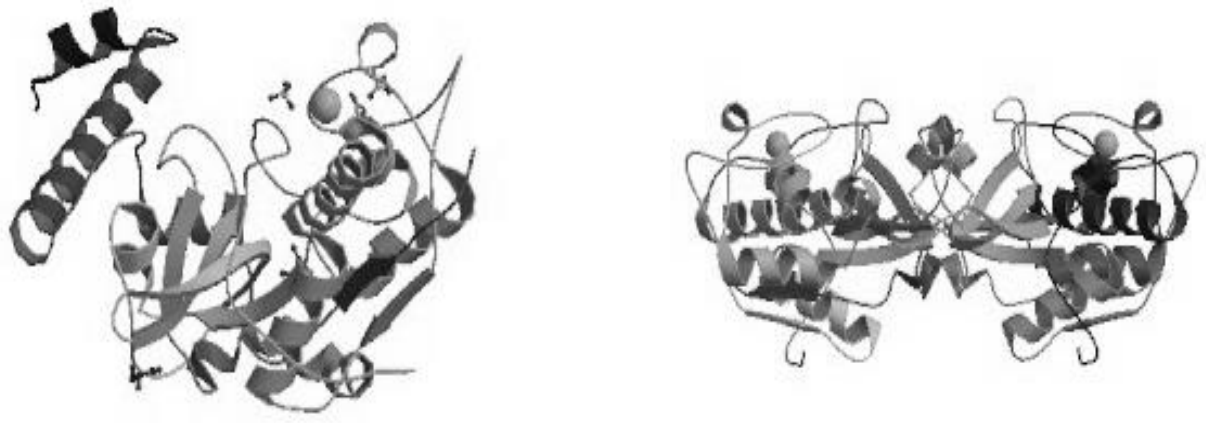
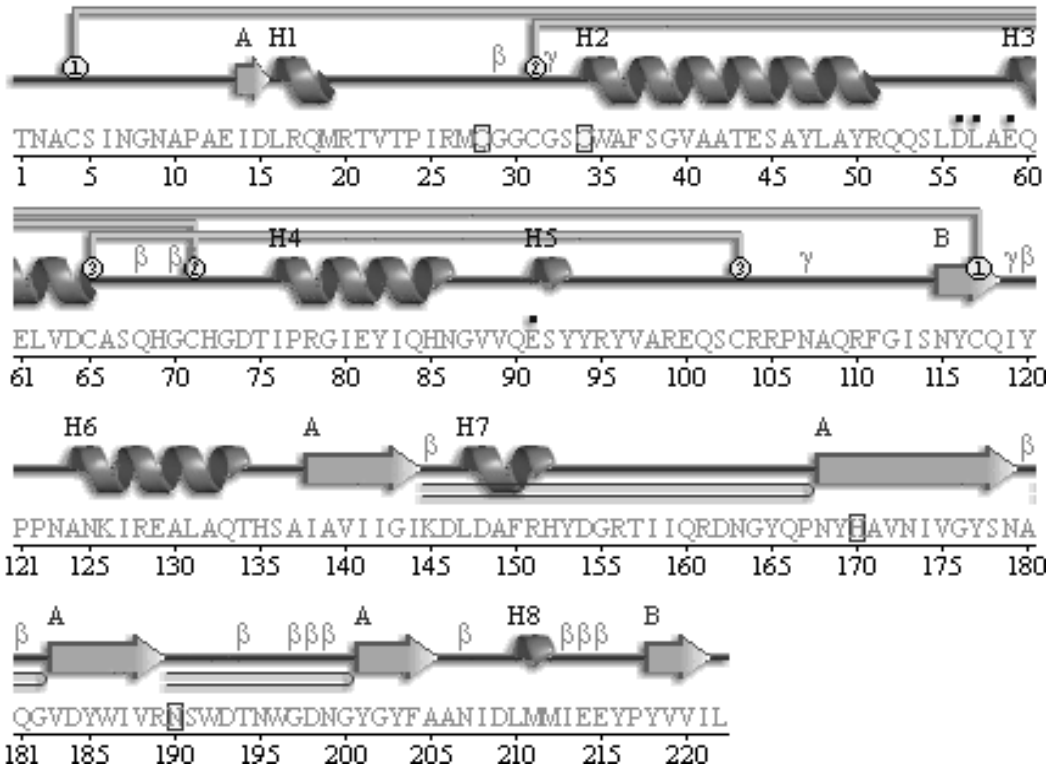


Fig. 1.



Claves:

Motivos: β giro beta γ giro gamma vuelta beta

Disulfuros: Enlace Disulfuro

Anotación: Residuo Catalítico

Residuos en contacto: con metales

Fig. 2

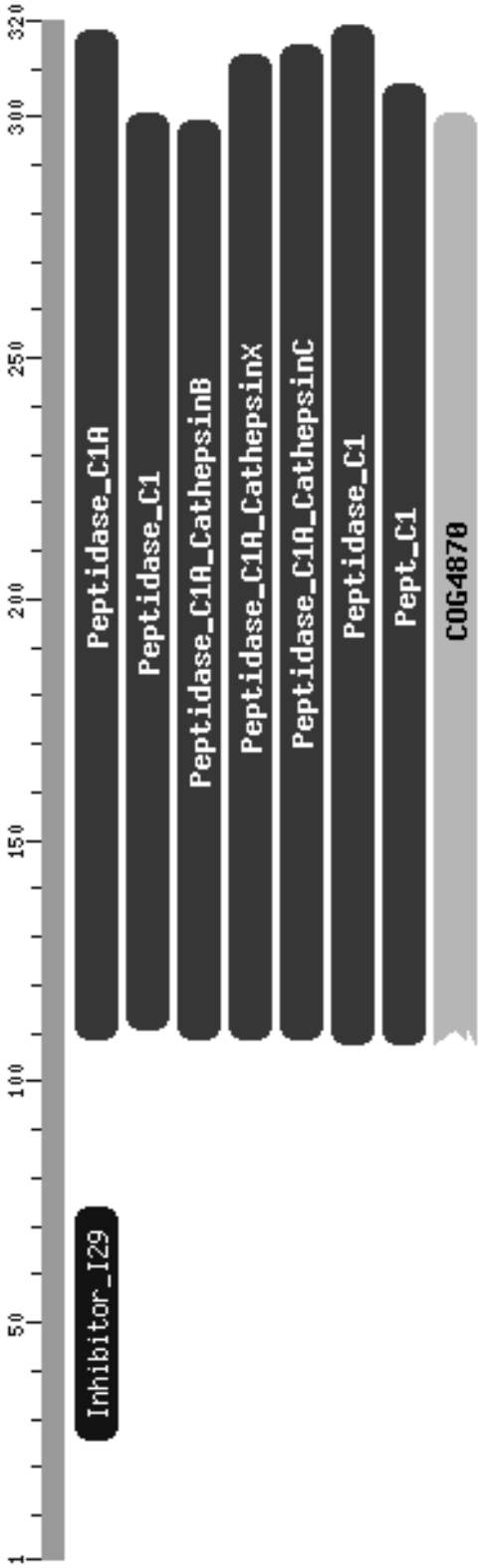

1
50
100
150
200
250
300
320
Inhibitor_I29
Peptidase_C1A
Peptidase_C1
Peptidase_C1A_CathepsinB
Peptidase_C1A_CathepsinX
Peptidase_C1A_CathepsinC
Peptidase_C1
Pept_C1
COG4870

Fig. 3

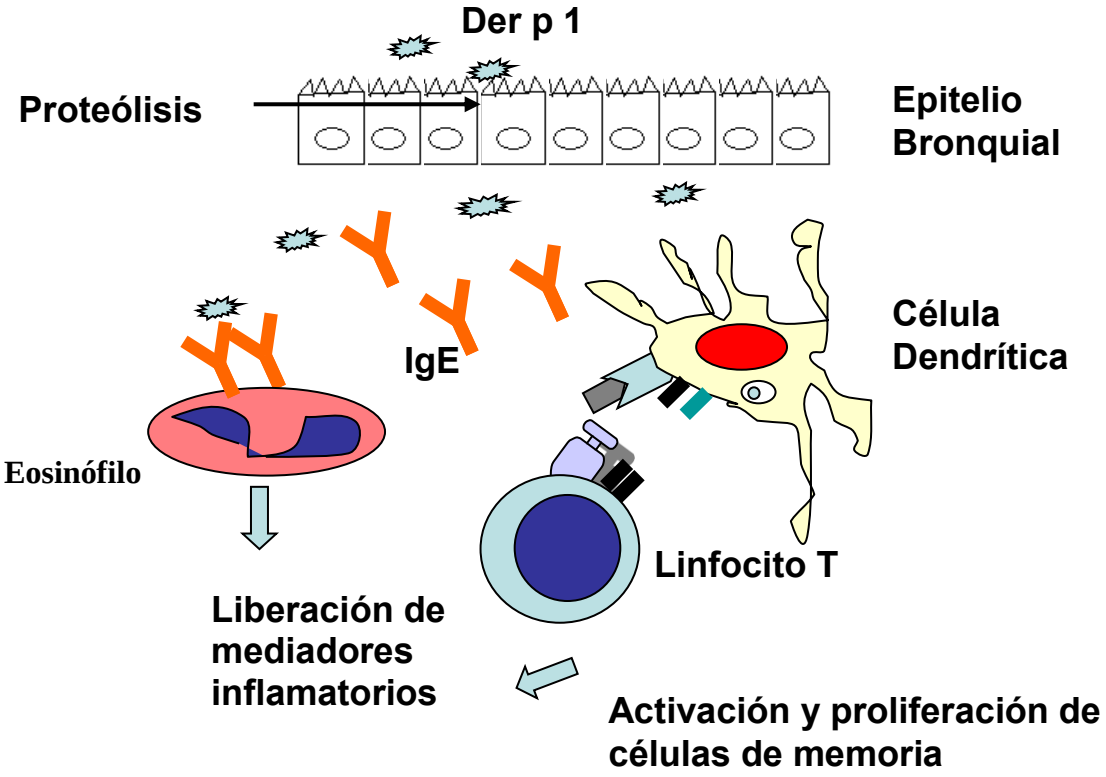

Der p 1
Proteólisis
Epitelio Bronquial
IgE
Célula Dendrítica
Eosinófilo
Linfocito T
Liberación de mediadores inflamatorios
Activación y proliferación de células de memoria

Fig. 4

Home
Help
Example1
Example2
Example3
Example4
Epitope Sequence and 3D Structural Homology Mapping (User Data)
Note: The epitope sequence location at its source sequence is found different from the user input (Location 0: 99-118).
Epitope Sequence Information:
User Input
IEDB ID n/a
Sequence
Location
Name
TNACSINGNAPAEIDLRQMR
0-19
Type
Linear
Epitope Sequence Mapping Analysis to Source Sequence (USER)
gi|511953|gb|AAB60215.1| Der p 1 allergen preproenzyme [Dermatophagoides pteronyssinus]
MKIVLAIASLLALSAVYARPSSIKTFEEYKKAFNKSYATFEDEEAARKNFLESVKYVQSNGGAINHLSDLSLDEFKNRFLMSAEAFEHLKTQFDLNAETN
ACSINGNAPAEIDLRQMRTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNQSLDLAEQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEYIQHNGVVQESYYRYVAREQS
CRRPNAQRFGISNYCQIYPPNVNKIREALAQTHSAIAVIIGIKDLDAFRHYDGRTIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRNSWDTNWGDNGYG
YFAANIDLMMIEEYPYVVIL
The epitope location annotated by IEDB in Orange;
Other matches (identity > 80%, overlap >= 80% and no more than 1 gap) in Light Grey
Other perfect sequence matches in Yellow;
Keys for Sequence Format:
Query (Source) Sequence
Formatted according to the epitope matches (see above for color keys);
PDB Sequence
Formatted according to relative solvent accessibility of side chain atoms: blue for buried residues (0%, 7.0%); red for exposed residues (above 40.0%) and no color for the half-exposed and half-buried residues (7.0% and 40.0%).
Re-format It
Relative Accessibility of: Side Chains; All Atoms; Cutoff 1: 7.0 Cutoff 2: 40.0

Fig. 5 A

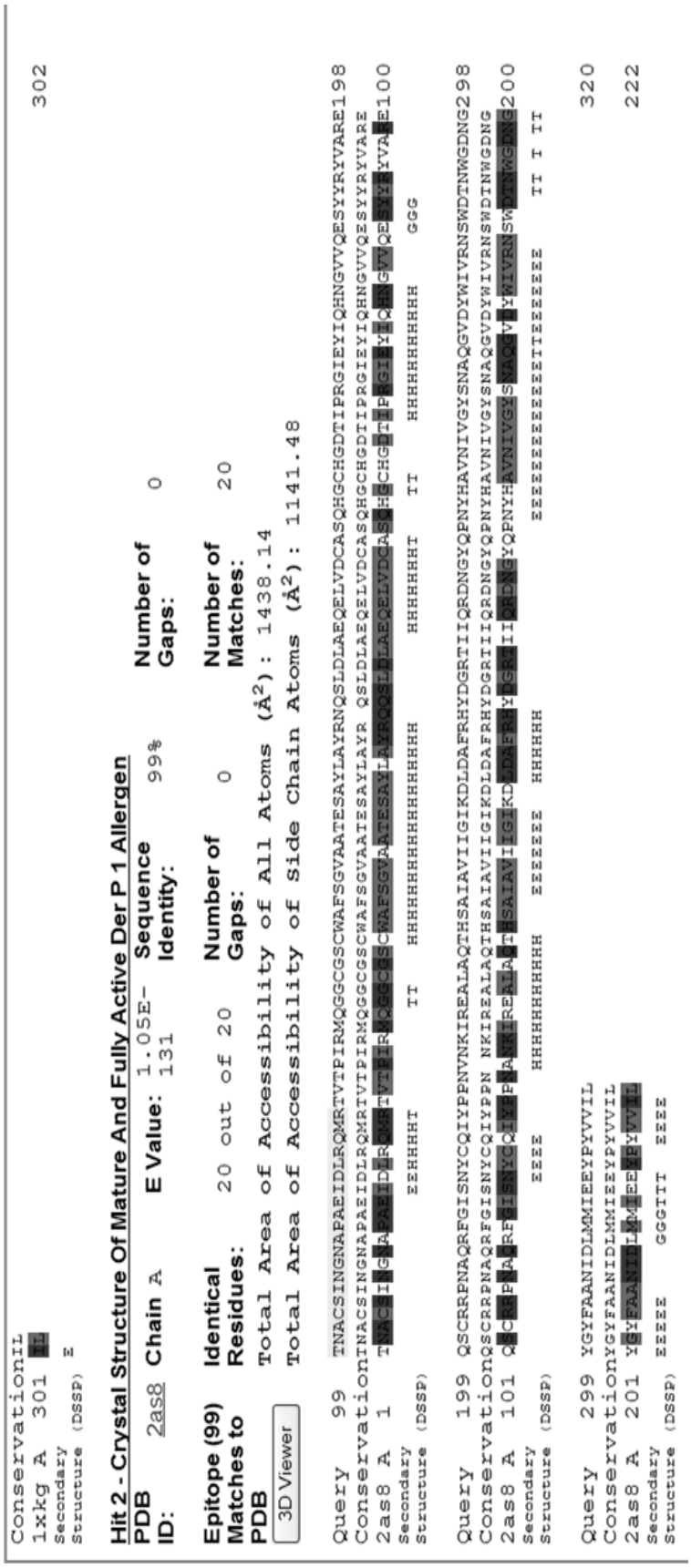

Hit 2 - Crystal Structure Of Mature And Fully Active Der P 1 Allergen
PDB ID: 2as8 Chain A
E Value: 1.05E-131
Sequence Identity: 99%
Number of Gaps: 0
Epitope (99) Matches to PDB
Identical Residues: 20 out of 20
Number of Gaps: 0
Number of Matches: 20
Total Area of Accessibility of All Atoms (Å2) : 1438.14
Total Area of Accessibility of Side Chain Atoms (Å2) : 1141.48
3D Viewer
Conservation
1xkg A 301
Secondary Structure (DSSP)
Query 99
Conservation
2as8 A 1
Secondary Structure (DSSP)
Query 199
Conservation
2as8 A 101
Secondary Structure (DSSP)
Query 299
Conservation
2as8 A 201
Secondary Structure (DSSP)

Fig. 5 B

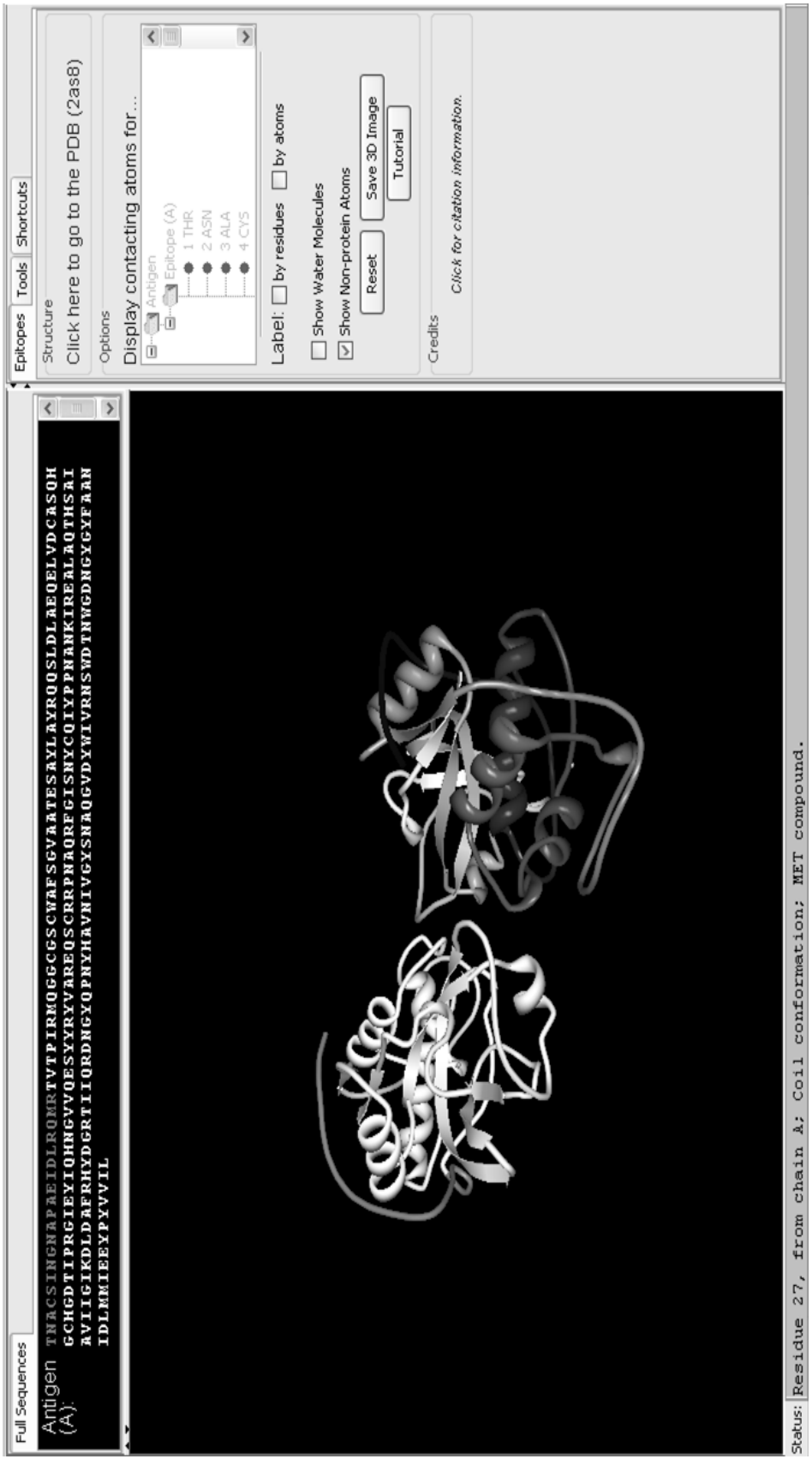

Full Sequences
Antigen (A):
TNACSINGNAPAEIDLRQMRTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRQQSLDLAEQELVDCASQH
GCHGDTIPRGIEYIQHNGVVQESYYRYVAREQSCRRPNAQRFGISNYCQIYPPNANKIREALAQTHSAI
AVIIGIKDLDAFRHYDGRTIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRNSWDTNWGDNGYGYFAAN
IDLMMIEEYPYVVIL
Epitopes
Tools
Shortcuts
Structure
Click here to go to the PDB (2as8)
Options
Display contacting atoms for...
Antigen
Epitope (A)
1 THR
2 ASN
3 ALA
4 CYS
Label:
by residues
by atoms
Show Water Molecules
Show Non-protein Atoms
Reset
Save 3D Image
Tutorial
Credits
Click for citation information.
Status:
Residue 27, from chain A; Coil conformation; MET compound.

Fig. 5 C

Home | Help | Example1 | Example2 | Example3 | Example4

Epitope Sequence and 3D Structural Homology Mapping (User Data)

Note: The epitope sequence location at its source sequence is found different from the user input (Location 0: 122-138).

Epitope Sequence Information:

User Input	IEDB ID	n/a	Name	Type	Linear
	Sequence		PIRMQGGCGSCWAFSGV		
	Location		0-16		
Epitope Sequence Mapping Analysis to Source Sequence (USER)	gi|511953|gb|AAB60215.1| Der p 1 allergen preproenzyme [Dermatophagoides pteronyssinus]				
	MKIVLAIASLLALSAVYARPSSIKTFEEYKKAFNKSYATFEDEEAARKNFLESVKYVQSNGGAINHLSDLSLDEFKNRFLMSAEAFEHLKTQFDLNAETN ACSINGNAPAEIDLRQMRTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNQSLDLAEQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEYIQHNGVVQESYYRYVAREQS CRRPNAQRFGISNYCQIYPPNVNKIREALAQTHSAIAVIIGIKDLDAFRHYDGRTIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRNSWDTNWGDNGYG YFAANIDLMMIEEYPYVVIL				
	The epitope location annotated by IEDB in Orange; Other matches (identity > 80%, overlap >= 80% and no more than 1 gap) in Light Grey		Other perfect sequence matches in Yellow;		

Fig. 6 A

Hit 2 - Crystal Structure Of Mature And Fully Active Der P 1 Allergen
PDB ID: 2as8
Chain A
E Value: 1.05E-131
Sequence Identity: 99%
Number of Gaps: 0
Epitope (122) Matches to PDB
3D Viewer
Identical Residues: 17 out of 17
Number of Gaps: 0
Number of Matches: 17
Total Area of Accessibility of All Atoms (Å2): 443.51
Total Area of Accessibility of Side Chain Atoms (Å2): 341.16
Query 99
Conservation
2as8 A 1
Secondary Structure (DSSP)
Query 199
Conservation
2as8 A 101
Secondary Structure (DSSP)
Query 299
Conservation
2as8 A 201
Secondary Structure (DSSP)

Fig. 6 B

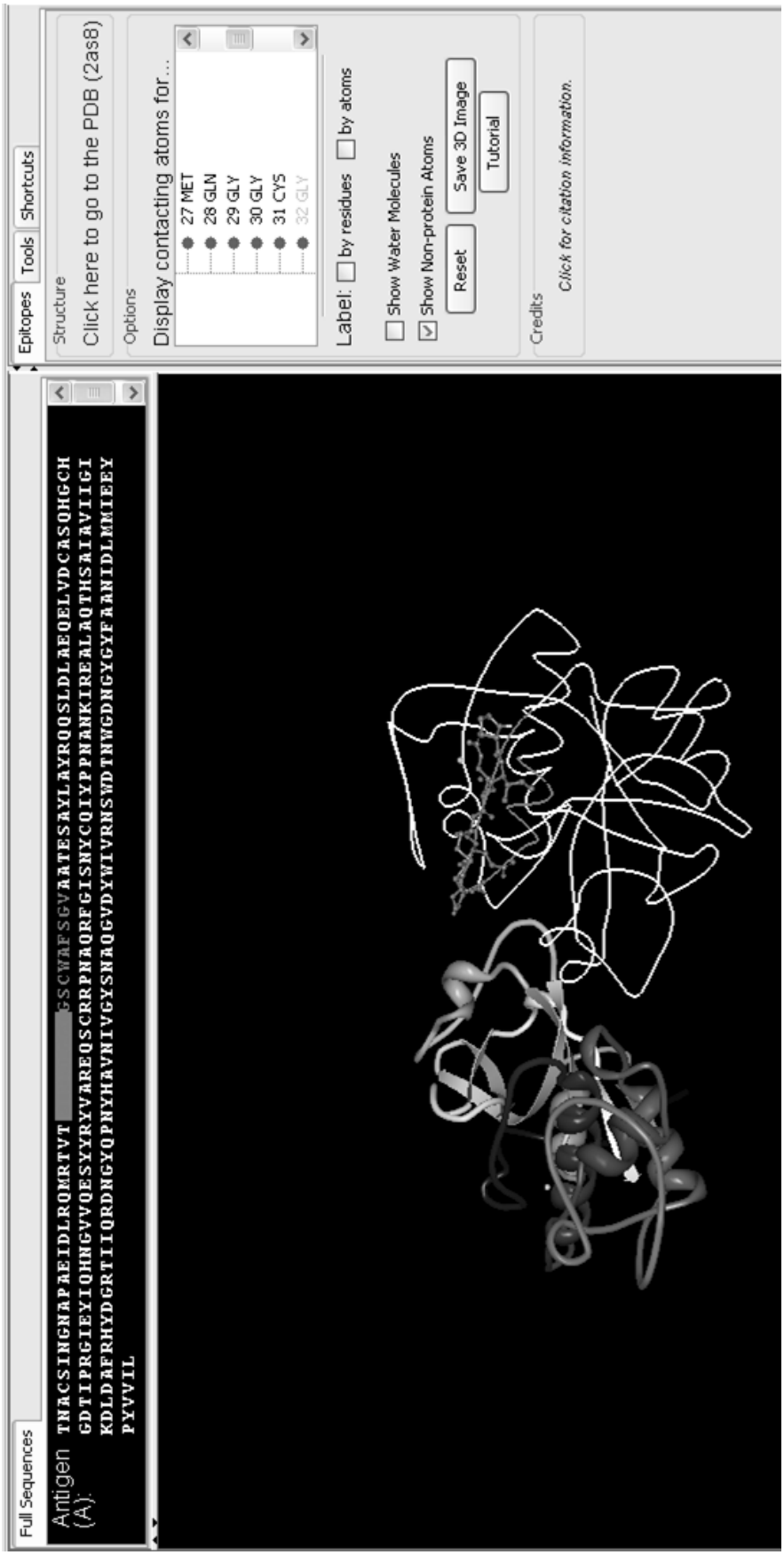

Full Sequences
Antigen (A):
TNACSINGNAPAEIDLRQMRTVT GSCWAFSGVAATESAYLAYRQQSLDLAEQELVDCASQHGCH
GDTIPRGIEYIQHNGVVQESYYRYVAREQSCRRPNAQRFGISNYCQIYPPNANKIREALAQTHSAIAVIIGI
KDLDAFRHYDGRTIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRNSWDTNWGDNGYGYFAANIDLMMIEEY
PYVVIL
Epitopes
Tools
Shortcuts
Structure
Click here to go to the PDB (2as8)
Options
Display contacting atoms for...
27 MET
28 GLN
29 GLY
30 GLY
31 CYS
32 GLY
Label:
by residues
by atoms
Show Water Molecules
Show Non-protein Atoms
Reset
Save 3D Image
Tutorial
Credits
Click for citation information.

Fig. 6 C

Home
Help
Example1
Example2
Example3
Example4
Epitope Sequence and 3D Structural Homology Mapping (User Data)
Note: The epitope sequence location at its source sequence is found different from the user input (Location 0: 282-301).
Epitope Sequence Information:
User Input
IEDB ID
n/a
Name
Type
Linear
Sequence
DYWIVRNSWDTNWGDNGYGY
Location
0-19
Epitope Sequence Mapping Analysis to Source Sequence (USER)
gi|511953|gb|AAB60215.1| Der p 1 allergen preproenzyme [Dermatophagoides pteronyssinus]
MKIVLAIASLLALSAVYARPSSIKTFEEYKKAFNKSYATFEDEEAARKNFLESVKYVQSNGGAINHLSDLSLDEFKNRFLMSAEAFEHLKTQFDLNAETN
ACSINGNAPAEIDLRQMRTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNQSLDLAEQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEYIQHNGVVQESYYRYVAREQS
CRRPNAQRFGISNYCQIYPPNVNKIREALAQTHSAIAVIIGIKDLDAFRHYDGRTIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRNSWDTNWGDNGYG
YFAANIDLMMIEEYPYVVIL
The epitope location annotated by IEDB in Orange;
Other perfect sequence matches in Yellow;
Other matches (identity > 80%, overlap >= 80% and no more than 1 gap) in Light Grey

Fig. 7 A

Hit 2 - Crystal Structure Of Mature And Fully Active Der P 1 Allergen
PDB ID: 2as8
Chain A
E Value: 1.05E-131
Sequence Identity: 99%
Number of Gaps: 0
Epitope (282) Matches to PDB
3D Viewer
Identical Residues: 20 out of 20
Number of Gaps: 0
Number of Matches: 20
Total Area of Accessibility of All Atoms (Å2): 658.97
Total Area of Accessibility of Side Chain Atoms (Å2): 603.1
Query 99 TNACSINGNAPAEIDLRQMRTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNQSLDLAEQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEYIQHNGVVQESYYRYVARE198
Conservation TNACSINGNAPAEIDLRQMRTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYR QSLDLAEQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEYIQHNGVVQESYYRYVARE
2as8 A 1 TNACSINGNAPAEIDLRQMRTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRQQSLDLAEQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEYIQHNGVVQESYYRYVARE100
Secondary Structure (DSSP) EEHHHHT TT HHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHT TT HHHHHHHHHHH GGG
Query 199 QSCRRPNAQRFGISNYCQIYPPNVNKIREALAQTHSAIAVIIGIKDLDAFRHYDGRTIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRNSWDTNWGDNG298
Conservation QSCRRPNAQRFGISNYCQIYPPN NKIREALAQTHSAIAVIIGIKDLDAFRHYDGRTIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRNSWDTNWGDNG
2as8 A 101 QSCRRPNAQRFGISNYCQIYPPNANKIREALAQTHSAIAVIIGIKDLDAFRHYDGRTIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRNSWDTNWGDNG200
Secondary Structure (DSSP) EEEE HHHHHHHHHHH EEEEEEE HHHHHH EEEEEEEEEEEEEETTEEEEEEE TT T TT
Query 299 YGYFAANIDLMMIEEYPYVVIL 320
Conservation YGYFAANIDLMMIEEYPYVVIL
2as8 A 201 YGYFAANIDLMMIEEYPYVVIL 222
Secondary Structure (DSSP) EEEEE GGGTTT EEEE

Fig. 7 B

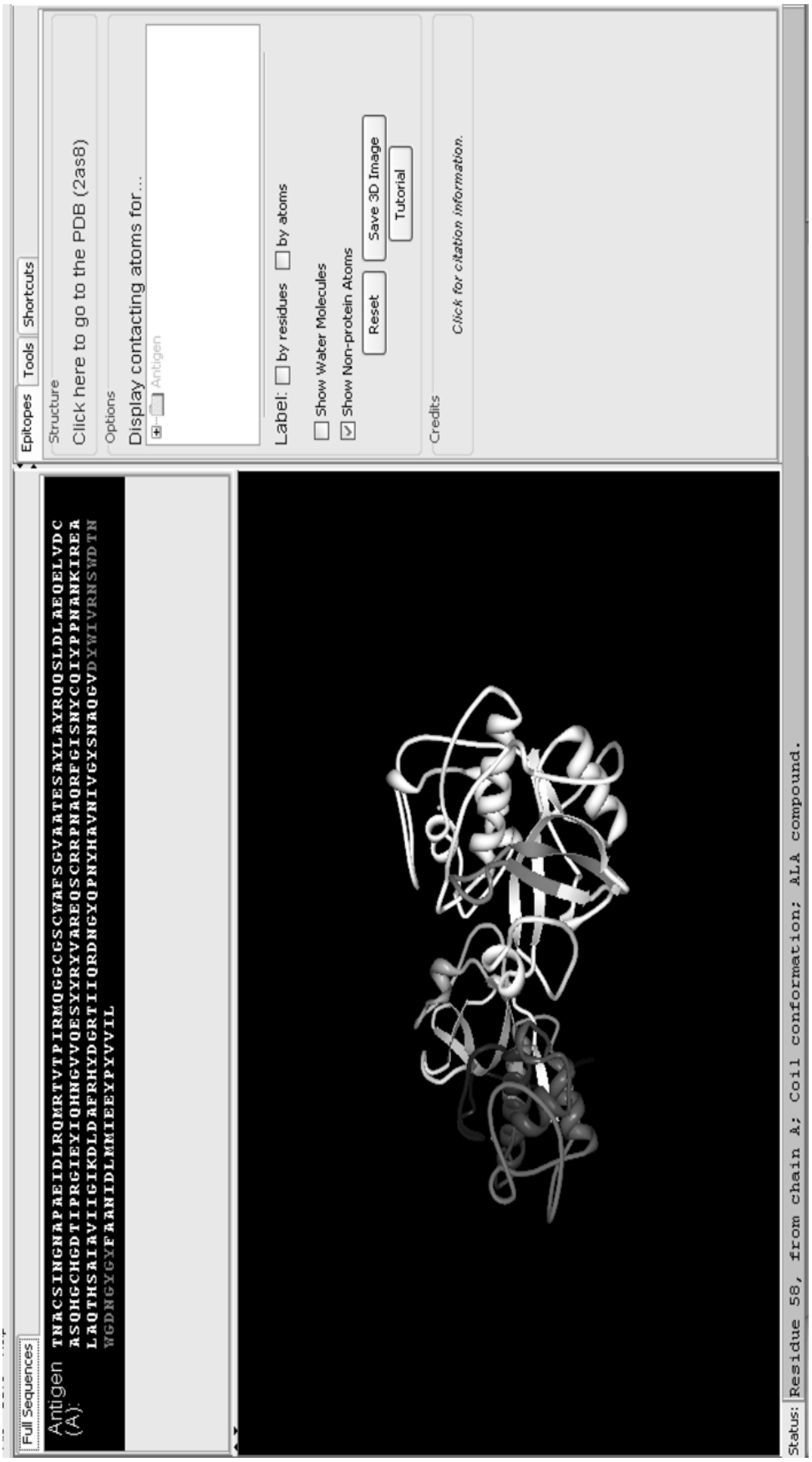

Full Sequences
Antigen (A):
TNACSINGNAPAEIDLRQMRTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRQQSLDLAEQELVDC
ASQHGCHGDTIPRGIEYIQHNGVVQESYYRYVARE0SCRRPNAQRFGISNYCQIYPPNANKIREA
LAQTHSAIAVIIGIKDLDAFRHYDGRTIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRNSWDTN
WGDNGYGYFAANIDLMMIEEYPYVVIL
Epitopes
Tools
Shortcuts
Structure
Click here to go to the PDB (2as8)
Options
Display contacting atoms for...
Antigen
Label: by residues by atoms
Show Water Molecules
Show Non-protein Atoms
Reset
Save 3D Image
Tutorial
Credits
Click for citation information.
Status:
Residue 58, from chain A; Coil conformation; ALA compound.

Fig. 7 C

IEDB Analysis Resource
Home
Help
Example1
Example2
Example3
Example4
Epitope Sequence and 3D Structural Homology Mapping (User Data)
Note: The epitope sequence location at its source sequence is found different from the user input (Location 0: 248-267).
Epitope Sequence Information:
User Input
IEDB ID
n/a
Name
Type
Linear
Sequence
FRHYDGRTIIQRDNGYQPNY
Location
0-19
Epitope Sequence Mapping Analysis to Source Sequence (USER)
gi|511953|gb|AAB60215.1| Der p 1 allergen preproenzyme [Dermatophagoides pteronyssinus]
MKIVLAIASLLALSAVYARPSSIKTFEEYKKAFNKSYATFEDEEAARKNFLESVKYVQSNGGAINHLSDLSLDEFKNRFLMSAEAFEHLKTQFDLNAETN
ACSINGNAPAEIDLRQMRTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNQSLDLAEQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEYIQHNGVVQESYYRYVAREQS
CRRPNAQRFGISNYCQIYPPNVNKIREALAQTHSAIAVIIGIKDLDAFRHYDGRTIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRNSWDTNWGDNGYG
YFAANIDLMMIEEYPYVVIL
The epitope location annotated by IEDB in Orange;
Other perfect sequence matches in Yellow;
Other matches (identity > 80%, overlap >= 80% and no more than 1 gap) in Light Grey

Fig. 8A

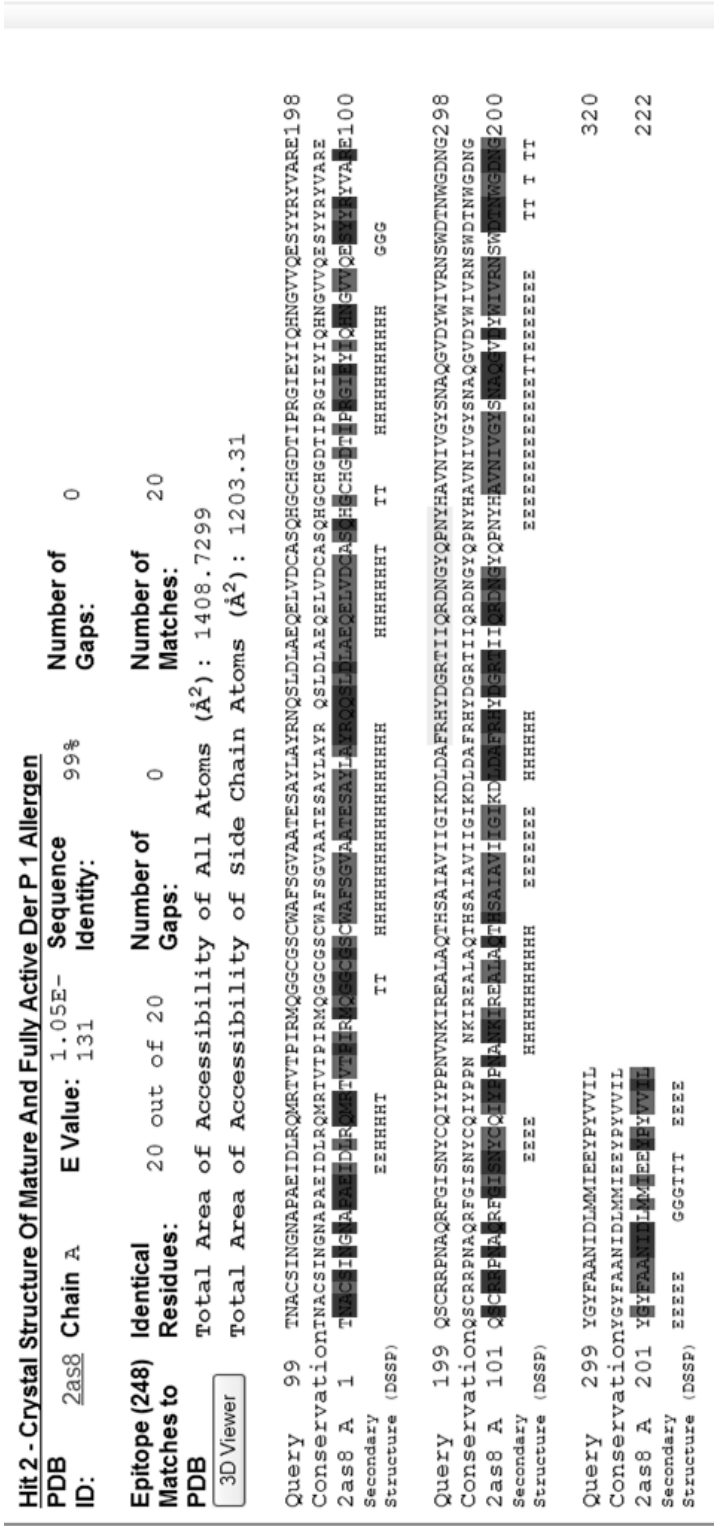

Hit 2 - Crystal Structure Of Mature And Fully Active Der P 1 Allergen
PDB ID: 2as8 Chain A E Value: 1.05E-131 Sequence Identity: 99% Number of Gaps: 0
Epitope (248) Matches to PDB 3D Viewer
Identical Residues: 20 out of 20 Number of Gaps: 0 Number of Matches: 20
Total Area of Accessibility of All Atoms (Å2): 1408.7299
Total Area of Accessibility of Side Chain Atoms (Å2): 1203.31
Query 99 TNACSINGNAPAEIDLRQMRTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNQSLDLAEQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEYIQHNGVVQESYYRYVARE 198
Conservation
2as8 A 1 T
Secondary Structure (DSSP) EEHHHHT TT HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHT TT HHHHHHHHHHH GGG
Query 199 QSCRRPNAQRFGISNYCQIYPPNVNKIREALAQTHSAIAVIIGIKDLDAFRHYDGRTIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRNSWDTNWGDNG 298
Conservation
2as8 A 101
Secondary Structure (DSSP) EEEE HHHHHHHHHH EEEEEEE HHHHHH EEEEEEEEEEEEEETTEEEEEEE TT T TT
Query 299 YGYFAANIDLMMIEEYPYVVIL 320
Conservation
2as8 A 201 222
Secondary Structure (DSSP) EEEEE GGGTTT EEEE

Fig. 8B

Full Sequences
Antigen (A):
Epitopes
Tools
Shortcuts
Structure
Click here to go to the PDB (2as8)
Options
Display contacting atoms for...
Antigen
Label: by residues by atoms
Show Water Molecules
Show Non-protein Atoms
Reset
Save 3D Image
Tutorial
Credits
Click for citation information.

Fig. 8C

IEDB Analysis Resource
Home
Help
Example1
Example2
Example3
Example4
Epitope Sequence and 3D Structural Homology Mapping (User Data)
Note: The epitope sequence location at its source sequence is found different from the user input (Location 0: 2-20).
Epitope Sequence Information:
User Input
IEDB ID
n/a
Name
Type
Linear
Sequence
PANFDWRQKTHVNPIRNQG
Location
0-18
Epitope Sequence Mapping Analysis to Source Sequence (USER)
gi|14276828|gb|AAK58415.1| cysteine protease precursor [Blomia tropicalis]
IPANFDWRQKTHVNPIRNQGGCGSCWAFAASSVAETLYAIHRHQNIILSEQELLDCTYHLYDPTYKCHGCQSGMSPEAFKYMKQKGLLEESHIPYKMKLN
QCQANARGTRYHVSSYNSLRYRAGDQEIQAAIMNHGPVVIYIHGTEAHFRNLRKGILRGAGYNDAQIDHAVVLVGWGTQNGIDYWIVRTSWGTQWGDAGY
GFVERHNSLGINNYPIYASL
The epitope location annotated by IEDB in Orange;
Other matches (identity > 80%, overlap >= 80% and no more than 1 gap) in Light Grey
Other perfect sequence matches in Yellow;

Fig. 9A

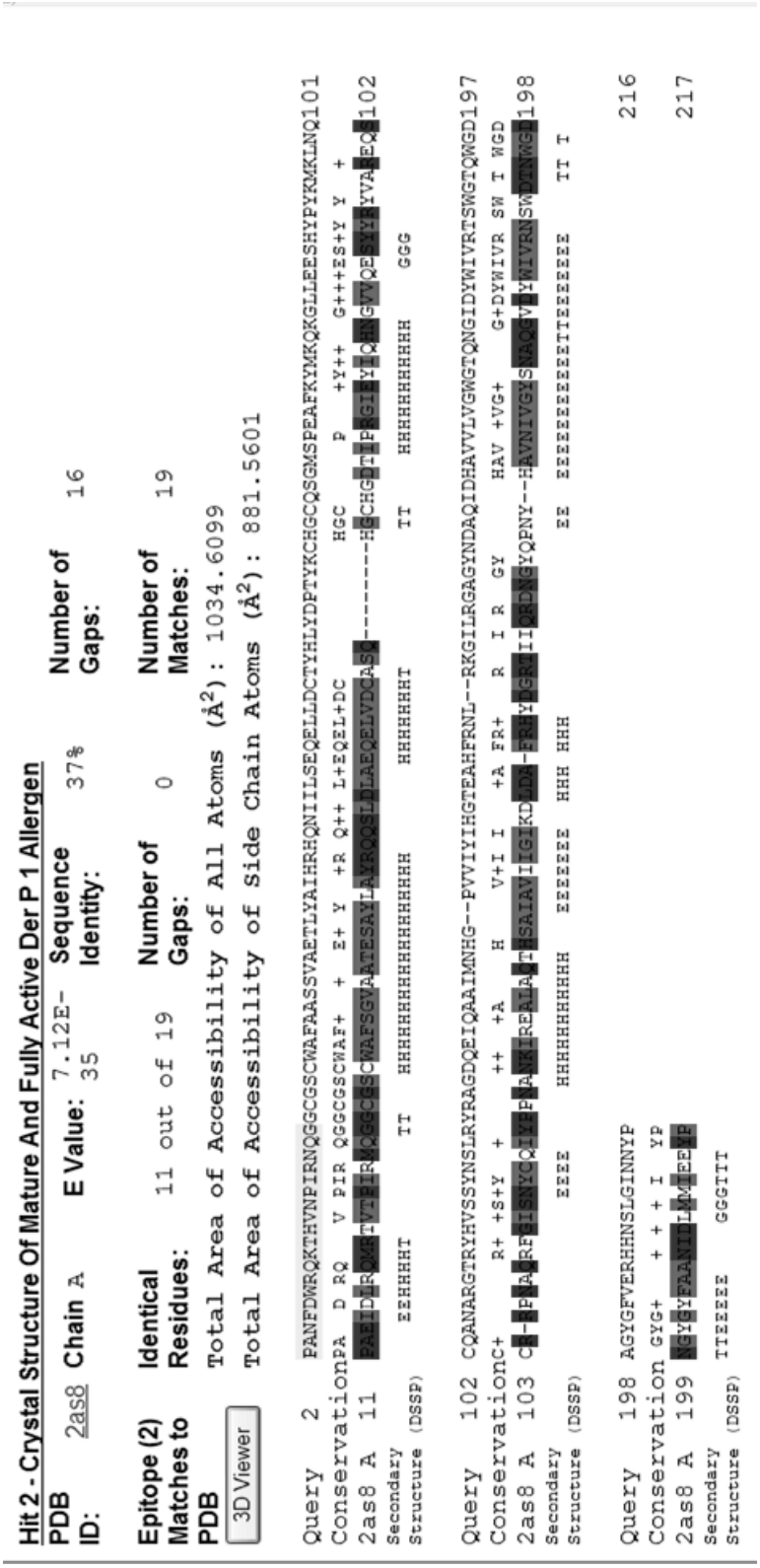

Hit 2 - Crystal Structure Of Mature And Fully Active Der P 1 Allergen
PDB ID: 2as8
Chain A
E Value: 7.12E-35
Sequence Identity: 37%
Number of Gaps: 16
Epitope (2) Matches to PDB
3D Viewer
Identical Residues: 11 out of 19
Number of Gaps: 0
Number of Matches: 19
Total Area of Accessibility of All Atoms (Å2): 1034.6099
Total Area of Accessibility of Side Chain Atoms (Å2): 881.5601
Query 2
Conservation
2as8 A 11
Secondary Structure (DSSP)
Query 102
Conservation
2as8 A 103
Secondary Structure (DSSP)
Query 198
Conservation
2as8 A 199
Secondary Structure (DSSP)

Fig. 9B

Home Help Example1 Example2 Example3 Example4

Epitope Sequence and 3D Structural Homology Mapping (User Data)

Note: The epitope sequence location at its source sequence is found different from the user input (Location 0: 147-166).

Epitope Sequence Information:

User Input	IEDB ID	n/a	Name	Type	Linear
	Sequence		AHFRNLRKGILRGAGYNDAQ		
	Location		0-19		
Epitope Sequence Mapping Analysis to Source Sequence (USER)	gi|14276828|gb|AAK58415.1| cysteine protease precursor [Blomia tropicalis]				
	IPANFDWRQKTHVNPIRNQGGCGSCWAFAASSVAETLYAIHRHQNIILSEQELLDCTYHLYDPTYKCHGCQSGMSPEAFKYMKQKGLLEESHYPYKMKLN QCQANARGTRYHVSSYNSLRYRAGDQEIQAAIMNHGPVVIYIHGTEAHFRNLRKGILRGAGYNDAQIDHAVVLVGWGTQNGIDYWIVRTSWGTQWGDAGY GFVERHHNSLGINNYPIYASL				
	The epitope location annotated by IEDB in Orange; Other matches (identity > 80%, overlap >= 80% and no more than 1 gap) in Light Grey		Other perfect sequence matches in Yellow;		

Fig. 10 A

Hit 2 - Crystal Structure Of Mature And Fully Active Der P 1 Allergen
PDB ID: 2as8
Chain A
E Value: 7.12E-35
Sequence Identity: 37%
Number of Gaps: 16
Epitope (147) Matches to PDB
Identical Residues: 8 out of 22
Number of Gaps: 3
Number of Matches: 19
Total Area of Accessibility of All Atoms (Å2): 1399.17
Total Area of Accessibility of Side Chain Atoms (Å2): 1203.25
3D Viewer
Query 2 PANFDWRQKTHVNPIRNQGGCGSCWAFAASSVAETLYAIHRHQNILSEQELLDCTYHLYDPTYKCHGCQSGMSPEAFKYMKQKGLLEESHYPYKMKLNQ101
Conservation
2as8 A 11 102
Secondary Structure (DSSP)
Query 102 CQANARGTRYHVSSYNSLRYRAGDQEIQAAIMNHG--PVVIYIHGTEAHFRNL--RKGILRGAGYNDAQIDHAVVLVGWGTQNGIDYWIVRTSWGTQWGD197
Conservation
2as8 A 103 198
Secondary Structure (DSSP)
Query 198 AGYGFVERHHNSLGINNYP 216
Conservation
2as8 A 199 217
Secondary Structure (DSSP)

Fig. 10 B

ELISA del péptido 2

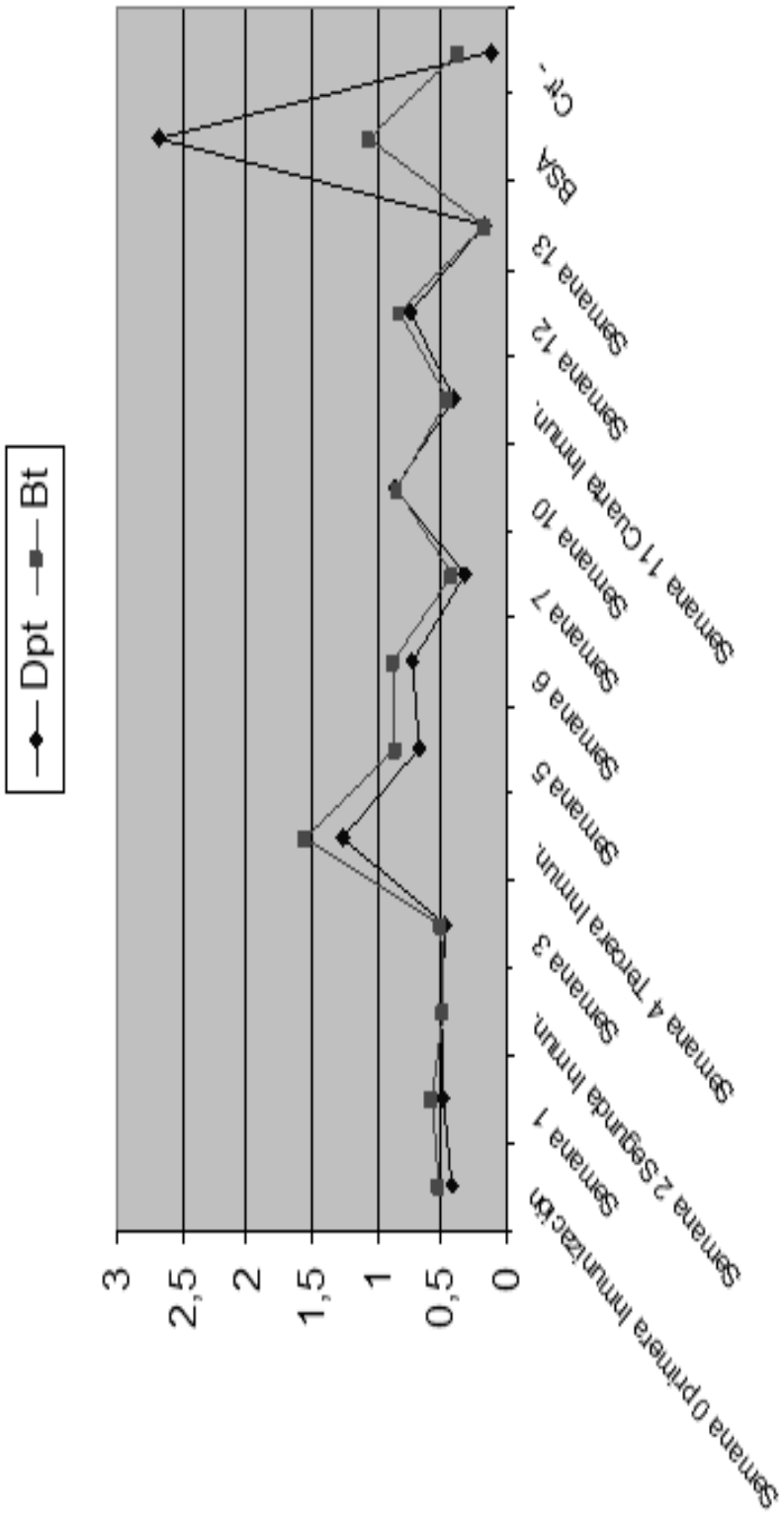


Fig. 11

ELISA del péptido 6

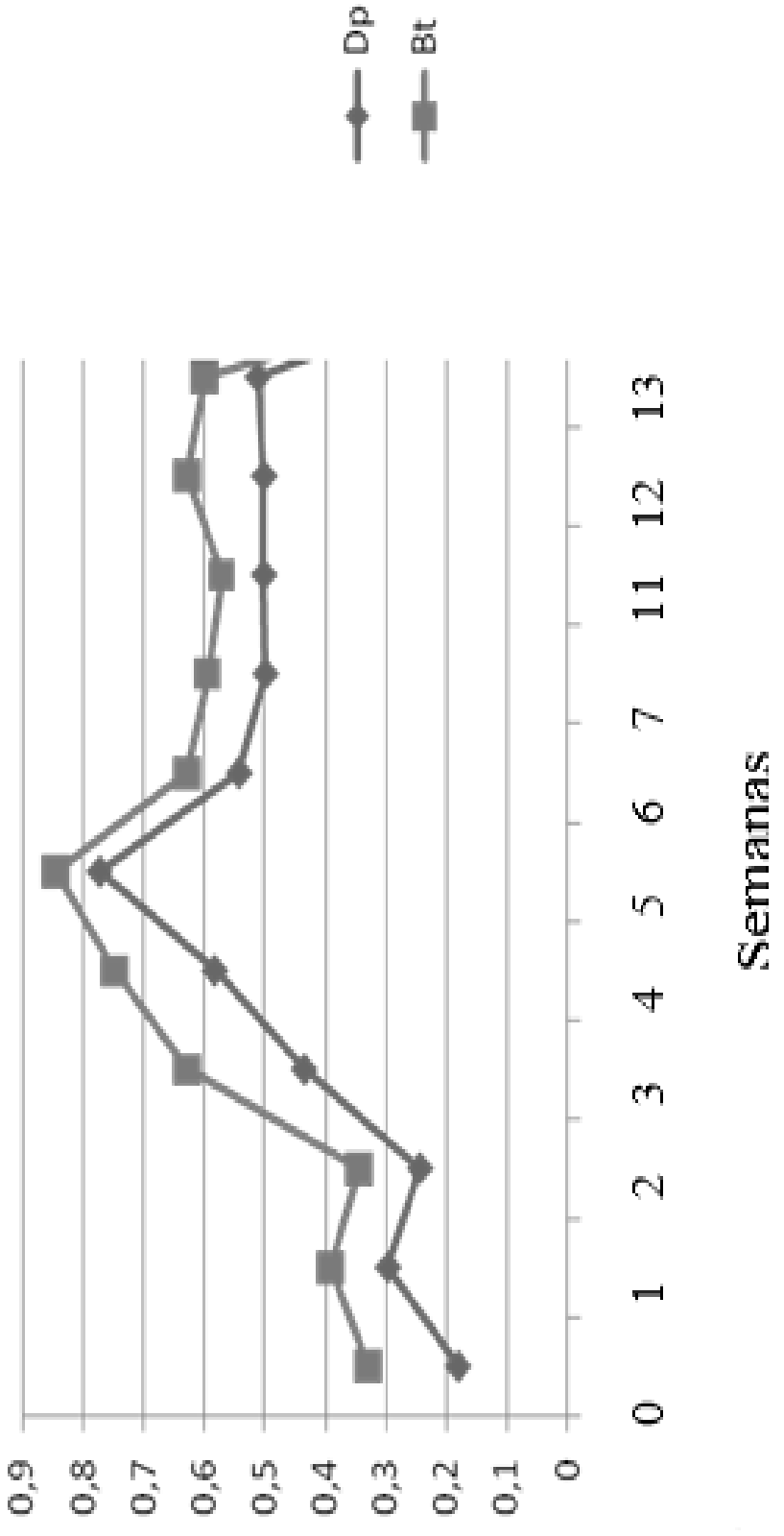


Fig. 12

ELISA del péptido 1

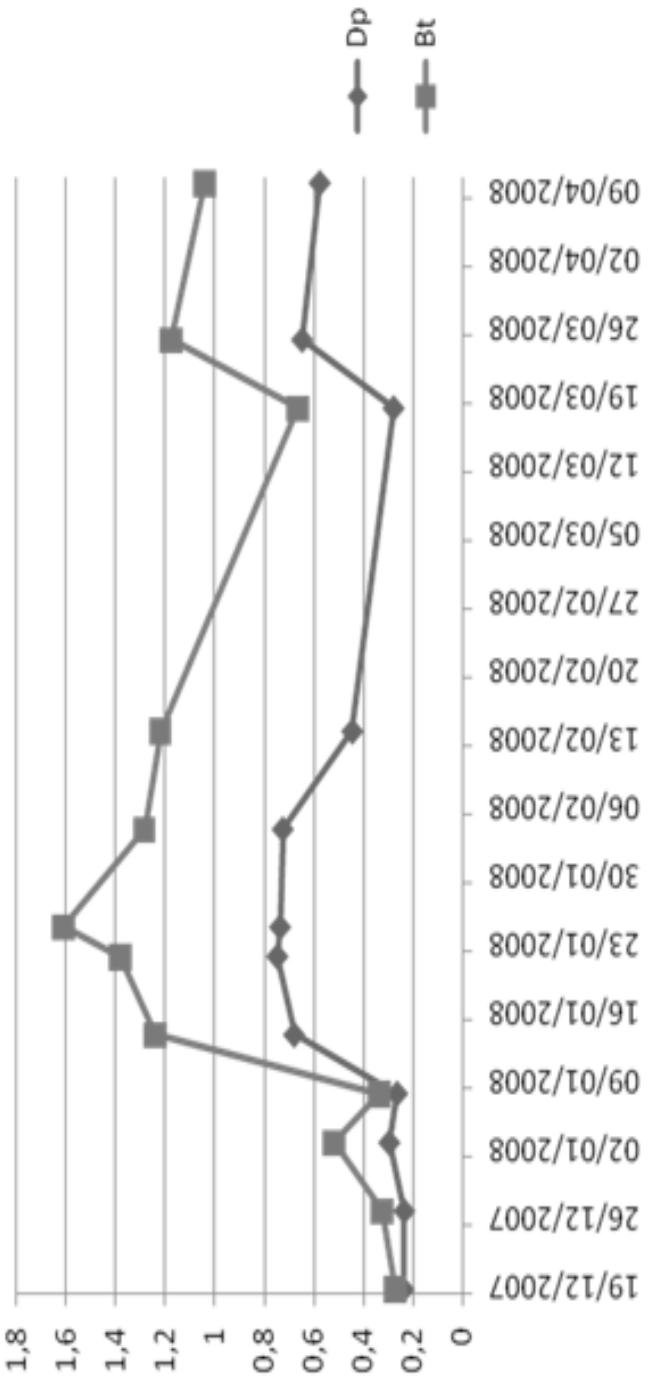


Fig. 13

ELISA del péptido 5

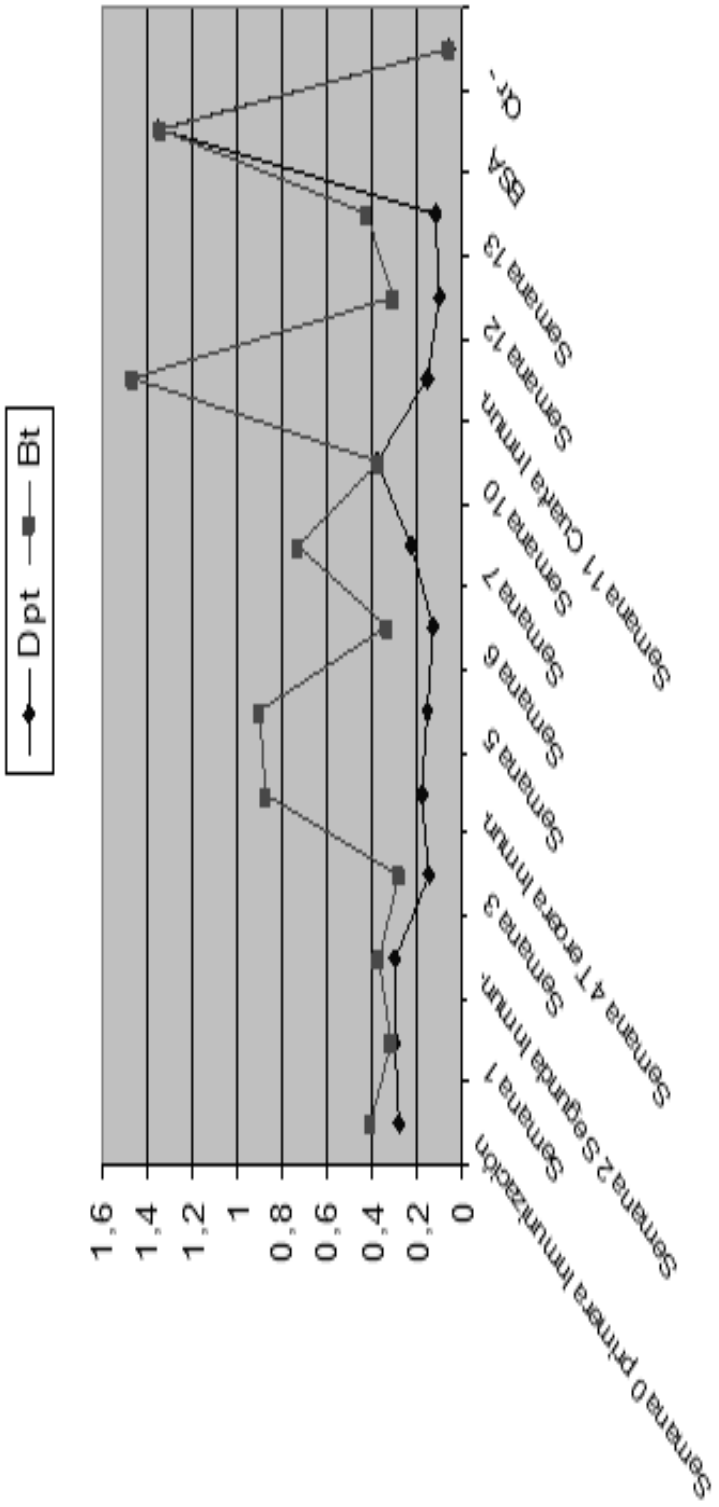


Fig. 14

Detección indirecta de los alérgenos con anticuerpos IgY

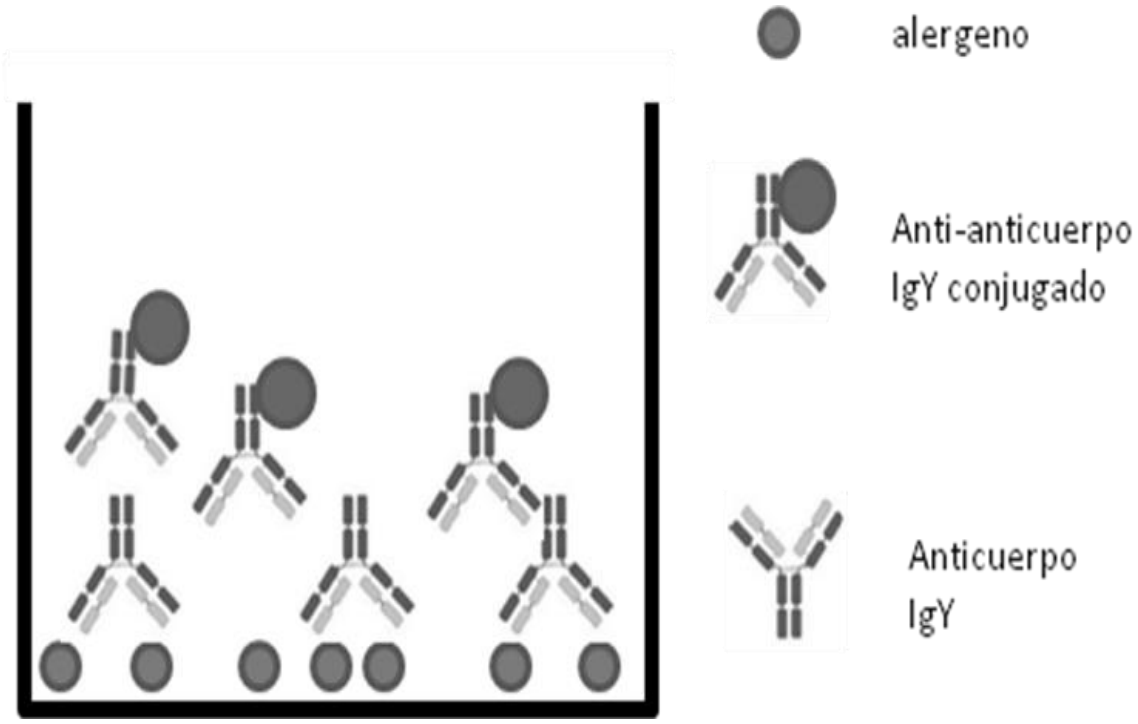
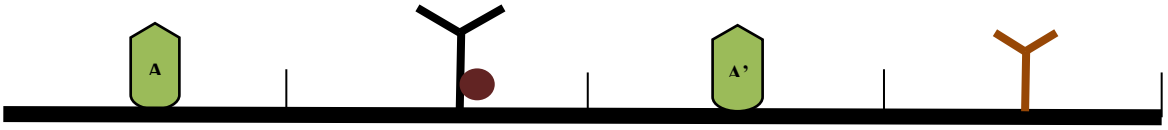


Fig. 15

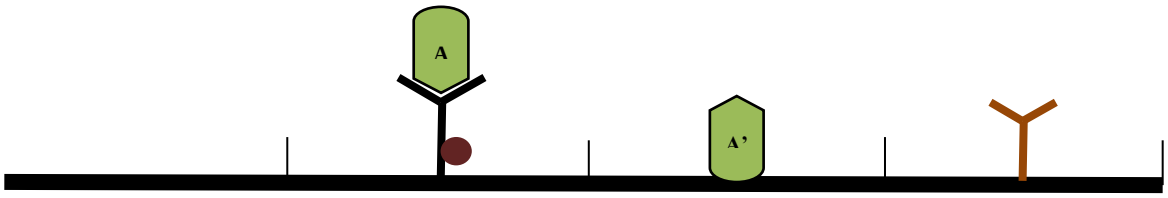
Diseño de la tira de prueba con inmunoconjugados IgY- nano partículas de oro coloidal

PASO 1.



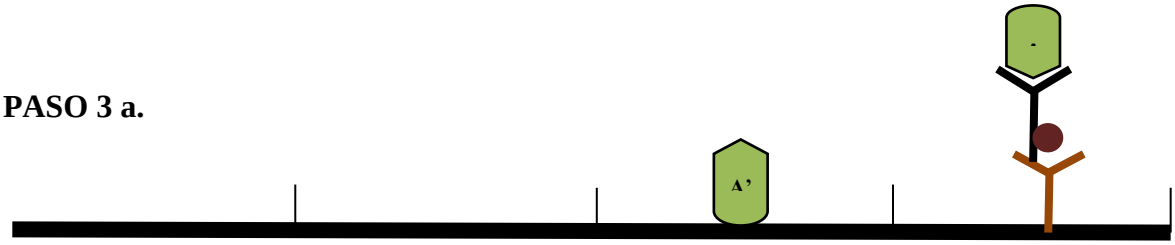
Zona Aplicación Zona Marcación Zona de Detección T Zona Detección C

PASO 2.



Zona Aplicación Zona Marcación Zona de Detección T Zona Detección C

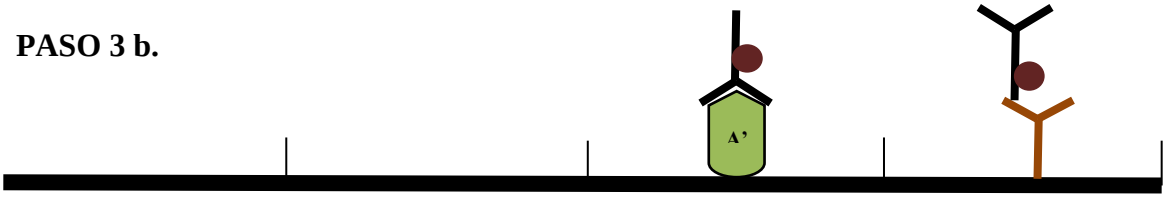
PASO 3 a.



Zona Aplicación Zona Marcación Zona de Detección T Zona Detección C

PRUEBA POSITIVA (UNA SEÑAL)

PASO 3 b.



Zona Aplicación Zona Marcación Zona de Detección T Zona Detección C

PRUEBA NEGATIVA (DOS SEÑALES)

Fig. 16

Diseño de la tira de prueba con inmunoconjugados IgY- Biotina

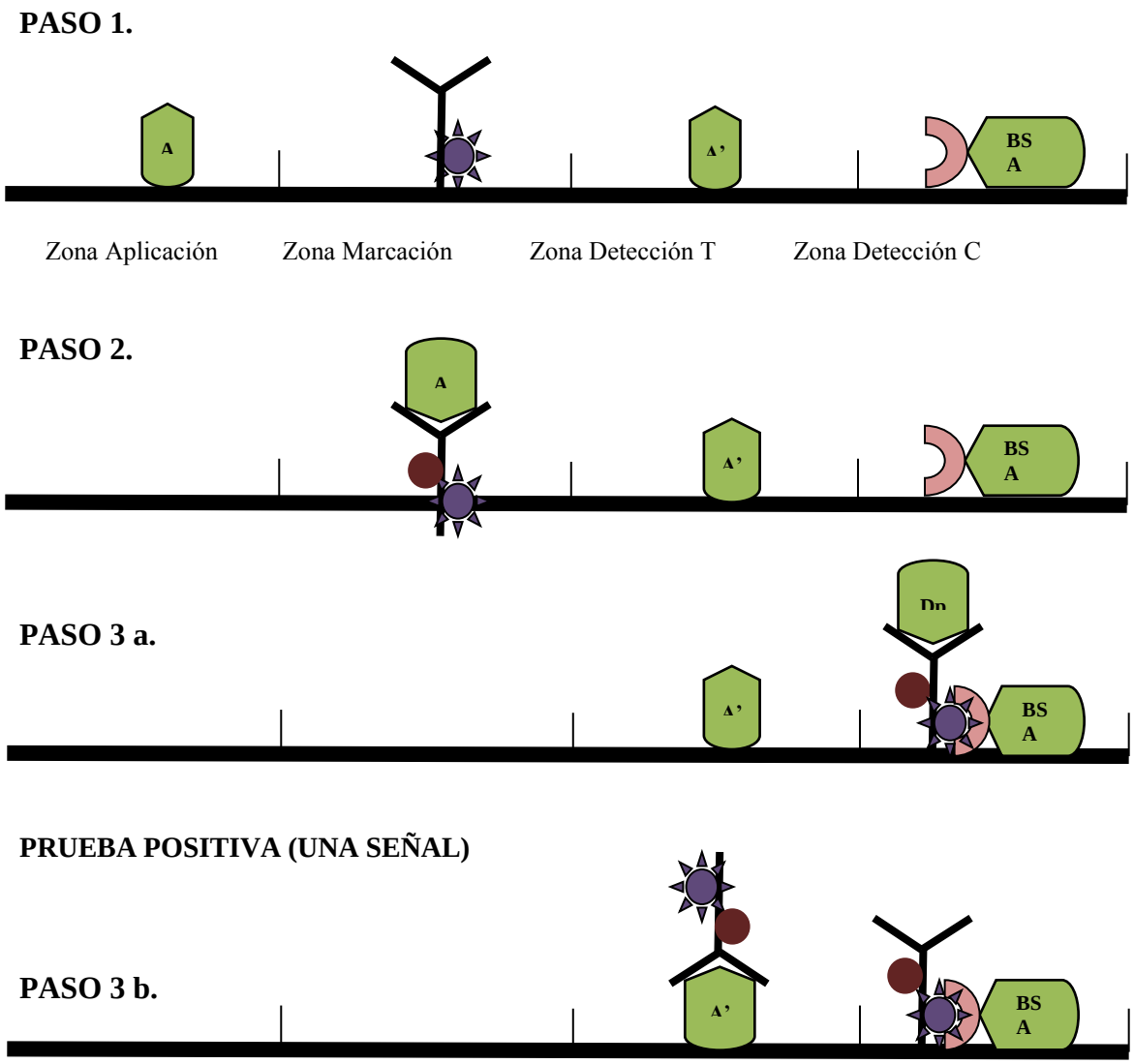


Fig. 17

Análisis de homología de las secuencias

Fig. 18. Alineamiento múltiple de las secuencias de proDerp1, proDerf1, y Blot 1

SeqA	Name	Len(aa)	SeqB	Name	Len(aa)	Score
1	giproDerp1	320	2	giproDerf1	321	83
1	giproDerp1	320	3	giBlot1	221	33
2	giproDerf1	321	3	giBlot1	221	34

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment


giproDerp1      MKIVLAIASLLALSAVYARPSSIKTFEEYKKAFNKSYATFEDEEAARKNFLESVKYVQSN 60
giproDerf1      MKFVLAIASLLVLSTVYARPASIKTFEEFKKAFNKNYATVEEEEVARKNFLESLKYVEAN 60
giBlot1         ------------------------------------------------------------


giproDerp1      GGAINHLSDLSLDEFKNRFLMSAEAFEHLKTQFDLNAETNACSIN-GNAPAEIDLRQMRT 119
giproDerf1      KGAINHLSDLSLDEFKNRYLMSAEAFEQLKTQFDLNAETSACRINSVNVPSELDLRSLRT 120
giBlot1         ---------------------------------------------IPANFDWRQKTH 12
                                                              *:::* *.

giproDerp1      VTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNQSLDLAEQELVDCAS--------QHGCHG 171
giproDerf1      VTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNTSLDLSEQELVDCAS--------QHGCHG 172
giBlot1         VNPIRNQGGCGSCWAFAASSVAETLYAIHRHQNIILSEQELLDCTYHLYDPTYKCHGCQS 72
                *.*** **********:. :.:*: *  :*: .: *:****:**:          ***:.

giproDerp1      DTIPRGIEYIQHNGVVQESYYRYVAREQSCRR-PNAQRFGISNYCQIYPPNVNKIREALA 230
giproDerf1      DTIPRGIEYIQQNGVVEERSYPYVAREQQCRR-PNSQHYGISNYCQIYPPDVKQIREALT 231
giBlot1         GMSPEAFKYMKQKGLLEESHYPYKMKLNQCQANARGTRYHVSSYNSLRYRAGDQEIQAAI 132
                .  *..::*::::*:::*  * *  : :.*:  ... :: :*.* .:     .:  :*

giproDerp1      QTHSAIAVIIGIKDLDAFRHYDGRTIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRNSW 290
giproDerf1      QTHTAIAVIIGIKDLRAFQHYDGRTIIQHDNGYQPNYHAVNIVGYGSTQGVDYWIVRNSW 291
giBlot1         MNHGPVVIYIHGTEA-HFRNLRKGILRGAGYNDAQIDHAVVLVGWGTQNGIDYWIVRTSW 191
                 .* .:.: *  .:   *::     :   . .     *** :**:.. :*:******.**

giproDerp1      DTNWGDNGYGYFAANIDLMMIEEYPYVVIL 320
giproDerf1      DTTWGDSGYGYFQAGNNLMMIEQYPYVVIM 321
giBlot1         GTQWGDAGYGFVERHHNSLGINNYPIYASL 221
                .* *** ***:.    : : *::**  . :
```

Fig 19. Alineamiento múltiple de las secuencias proDerp1, proDerf1 y Blot1 y la SEQ N° 1.

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment


giproDerp1      MKIVLAIASLLALSAVYARPSSIKTFEEYKKAFNKSYATFEDEEAARKNFLESVKYVQSN 60
giSeq4          ------------------------------------------------------------
giproDerf1      MKFVLAIASLLVLSTVYARPASIKTFEEFKKAFNKNYATVEEEEVARKNFLESLKYVEAN 60
giBlot1         ------------------------------------------------------------


giproDerp1      GGAINHLSDLSLDEFKNRFLMSAEAFEHLKTQFDLNAETNACSIN-GNAPAEIDLRQMRT 119
giSeq4          ----------------------------------TNACSIN-GNAPAEIDLRQMR- 20
giproDerf1      KGAINHLSDLSLDEFKNRYLMSAEAFEQLKTQFDLNAETSACRINSVNVPSELDLRSLRT 120
giBlot1         ---------------------------------------------IPANFDWRQKTH 12
                                                              *:::* *.

giproDerp1      VTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNQSLDLAEQELVDCAS--------QHGCHG 171
giSeq4          ------------------------------------------------------------
giproDerf1      VTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNTSLDLSEQELVDCAS--------QHGCHG 172
giBlot1         VNPIRNQGGCGSCWAFAASSVAETLYAIHRHQNIILSEQELLDCTYHLYDPTYKCHGCQS 72


giproDerp1      DTIPRGIEYIQHNGVVQESYYRYVAREQSCRR-PNAQRFGISNYCQIYPPNVNKIREALA 230
giSeq4          ------------------------------------------------------------
giproDerf1      DTIPRGIEYIQQNGVVEERSYPYVAREQQCRR-PNSQHYGISNYCQIYPPDVKQIREALT 231
giBlot1         GMSPEAFKYMKQKGLLEESHYPYKMKLNQCQANARGTRYHVSSYNSLRYRAGDQEIQAAI 132


giproDerp1      QTHSAIAVIIGIKDLDAFRHYDGRTIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRNSW 290
giSeq4          ------------------------------------------------------------
giproDerf1      QTHTAIAVIIGIKDLRAFQHYDGRTIIQHDNGYQPNYHAVNIVGYGSIQGVDYWIVRNSW 291
giBlot1         MNHGPVVIYIHGTEAHFRNLRKG-ILRGAGYNDAQIDHAVVLVGWGIQNGIDYWIVRTSW 191


giproDerp1      DTNWGDNGYGYFAANIDLMMIEEYPYVVIL 320
giSeq4          ------------------------------
giproDerf1      DTTWGDSGYGYFQAGNNLMMIEQYPYVVIM 321
giBlot1         GTQWGDAGYGFVERHHNSLGINNYPIYASL 221
```

Fig 20. Alineamiento múltiple de las secuencias proDerp1, proDerf1 y Blot1 y la SEQ N°2.

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment


giproDerp1      MKIVLAIASLLALSAVYARPSSIKTFEEYKKAFNKSYATFEDEEAARKNFLESVKYVQSN 60
giproDerf1      MKFVLAIASLLVLSTVYARPASIKTFEEFKKAFNKNYATVEEEEVARKNFLESLKYVEAN 60
giSeq1          ------------------------------------------------------------
giBlot1         ------------------------------------------------------------


giproDerp1      GGAINHLSDLSLDEFKNRFLMSAEAFEHLKTQFDLNAETNACSIN-GNAPAEIDLRQMRT 119
giproDerf1      KGAINHLSDLSLDEFKNRYLMSAEAFEQLKTQFDLNAETSACRINSVNVPSELDLRSLRT 120
giSeq1          ------------------------------------------------------------
giBlot1         ---------------------------------------------IPANFDWRQKTH 12


giproDerp1      VTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNQSLDLAEQELVDCASQ--------HGCHG 171
giproDerf1      VTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNTSLDLSEQELVDCASQ--------HGCHG 172
giSeq1          --PIRMQGGCGSCWAFSGV---------------------------------------- 17
giBlot1         VNPIRNQGGCGSCWAFAASSVAETLYAIHRHQNIILSEQELLDCTYHLYDPTYKCHGCQS 72
                  *** **********:.


giproDerp1      DTIPRGIEYIQHNGVVQESYYRYVAREQSCRR-PNAQRFGISNYCQI-YPPNVNKIREAL 229
giproDerf1      DTIPRGIEYIQQNGVVEERSYPYVAREQQCRR-PNSQHYGISNYCQI-YPPDVKQIREAL 230
giSeq1          ------------------------------------------------------------
giBlot1         GMSPEAFKYMKQKGLLEESHYPYKMKLNQCQANARGTRYHVSSYNSLRYRAGDQEIQAAI 132


giproDerp1      AQTHSAIAVIIGIKDLDAFRHYDGRTIIQRDNGYQPN--YHAVNIVGYSNAQGVDYWIVR 287
giproDerf1      TQTHTAIAVIIGIKDLRAFQHYDGRTIIQHDNGYQPN--YHAVNIVGYGSTQGVDYWIVR 288
giSeq1          ------------------------------------------------------------
giBlot1         MN-HG--PVVIYIHGTEAHFR-NLRKGILRGAGYNDAQIDHAVVLVGWGTQNGIDYWIVR 188


giproDerp1      NSWDTNWGDNGYGYFAANIDLMMIEEYPYVVIL 320
giproDerf1      NSWDTTWGDSGYGYFQAGNNLMMIEQYPYVVIM 321
giSeq1          --------------------------------
giBlot1         TSWGTQWGDAGYGFVERHHNSLGINNYPIYASL 221
```

Fig 21. Alineamiento múltiple de las secuencias proDerp1, proDerf1 y Blot1 y la SEQ N° 3

```
gi|511953|gb|AAB60215.1|          ACSIN-GNAPAEIDLRQMRTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYR 149
gi|730035|sp|P16311.2|PEPT1_DE    ACRINSVNVPSELDLRSLRTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYR 150
gi|peptido1                       --------------------------------------------------
gi|14276828|gb|AAK58415.1|        --------IPANFDWRQKTHVNPIRNQGGCGSCWAFAASSVAETLYAIHR 42

gi|511953|gb|AAB60215.1|          NQSLDLAEQELVDCASQ--------HGCHGDTIPRGIEYIQHNGVVQESY 191
gi|730035|sp|P16311.2|PEPT1_DE    NTSLDLSEQELVDCASQ--------HGCHGDTIPRGIEYIQQNGVVEERS 192
gi|peptido1                       --------------------------------------------------
gi|14276828|gb|AAK58415.1|        HQNIILSEQELLDCTYHLYDPTYKCHGCQSGMSPEAFKYMKQKGLLEESH 92

gi|511953|gb|AAB60215.1|          YRYVAREQSCRR-PNAQRFGISNYCQI-YPPNVNKIREALAQTHSAIAVI 239
gi|730035|sp|P16311.2|PEPT1_DE    YPYVAREQRCRR-PNSQHYGISNYCQI-YPPDVKQIREALTQTHTAIAVI 240
gi|peptido1                       --------------------------------------------------
gi|14276828|gb|AAK58415.1|        YPYKMKLNQCQANARGIRYHVSSYNSLRYRAGDQEIQAAIMN-HG--PVV 139

gi|511953|gb|AAB60215.1|          IGIKDLDAFRHYDGRTIIQRDNGYQPN--YHAVNIVGYSNAQGVDYWIVR 287
gi|730035|sp|P16311.2|PEPT1_DE    IGIKDLRAFQHYDGRTIIQHDNGYQPN--YHAVNIVGYGSTQGDDYWIVR 288
gi|peptido1                       ------------------------------------------DYWIVR 6
gi|14276828|gb|AAK58415.1|        IYIHGTEAHFR-NLRKGILRGAGYNDAQIDHAVVLVGWGTQNGIDYWIVR 188
                                                                             ******

gi|511953|gb|AAB60215.1|          NSWDTNWGDNGYGYFAANIDLMMIEEYPYVVIL 320
gi|730035|sp|P16311.2|PEPT1_DE    NSWDTTWGDSGYGYFQAGNNLMMIEQYPYVVIM 321
gi|peptido1                       NSWDTNWGDNGYGY------------------- 20
gi|14276828|gb|AAK58415.1|        TSWGIQWGDAGYGFVERHHNSLGINNYPIYASL 221
                                  .**.* *** ***:
```

PLEASE NOTE: Showing colors on large alignments is slow.

Show Colors | View Alignment File

Fig 22. Alineamiento múltiple de las secuencias proDerp1, proDerf1 y Blot1 y la SEQ N° 4.

```
CLUSTAL 2.0.10 multiple sequence alignment


gi|511953|gb|AAB60215.1|        MKIVLAIASLLALSAVYARPSSIKTFEEYKKAFNKSYATFEDEEAARKNF 50
gi|Seq4                         --------------------------------------------------
gi|27530349|dbj|BAC53948.1|     MKFVLAIASLLVLSTVYARPASIKTFEEFKKAFNKNYATVEEEEVARKNF 50
gi|14276828|gb|AAK58415.1|      --------------------------------------------------


gi|511953|gb|AAB60215.1|        LESVKYVQSNGGAINHLSDLSLDEFKNRFLMSAEAFEHLKTQFDLNAETN 100
gi|Seq4                         --------------------------------------------------
gi|27530349|dbj|BAC53948.1|     LESLKYVEANKGAINHLSDLSLDEFKNRYLMSAEAFEQLKTQFDLNAETS 100
gi|14276828|gb|AAK58415.1|      --------------------------------------------------


gi|511953|gb|AAB60215.1|        ACSIN-GNAPAEIDLRQMRTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYR 149
gi|Seq4                         --------------------------------------------------
gi|27530349|dbj|BAC53948.1|     ACRINSVNVPSELDLRSLRTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYR 150
gi|14276828|gb|AAK58415.1|      --------IPANFDWRQKTHVNPIRNQGGCGSCWAFAASSVAETLYAIHR 42


gi|511953|gb|AAB60215.1|        NQSLDLAEQELVDCAS--------QHGCHGDTIPRGIEYIQHNGVVQESY 191
gi|Seq4                         --------------------------------------------------
gi|27530349|dbj|BAC53948.1|     NTSLDLSEQELVDCAS--------QHGCHGDTIPRGIEYIQQNGVVEERS 192
gi|14276828|gb|AAK58415.1|      HQNIILSEQELLDCTYHLYDPTYKCHGCQSGMSPEAFKYMKQKGLLEESH 92


gi|511953|gb|AAB60215.1|        YRYVAREQSCRR-PNAQRFGISNYCQIYPPNVNKIREALAQTHSAIAVII 240
gi|Seq4                         --------------------------------------------------
gi|27530349|dbj|BAC53948.1|     YPYVAREQQCRR-PNSQHYGISNYCQIYPPDVKQIREALTQTHTAIAVII 241
gi|14276828|gb|AAK58415.1|      YPYKMKLNQCQANARGTRYHVSSYNSLRYRAGDQEIQAAIMNHGPVVIYI 142


gi|511953|gb|AAB60215.1|        GIKDLDAFRHYDGRTIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRNSW 290
gi|Seq4                         -------FRHYDGRTIIQRDNGYQPNY---------------------- 20
gi|27530349|dbj|BAC53948.1|     GIKDLRAFQHYDGRTIIQHDNGYQPNYHAVNIVGYGSTQGVDYWIVRNSW 291
gi|14276828|gb|AAK58415.1|      HG-TEAHFRNLRKGILRGAGYNDAQIDHAVVLVGWGTQNGIDYWIVRTSW 191
                                       *::     :   . .

gi|511953|gb|AAB60215.1|        DTNWGDNGYGYFAANIDLMMIEEYPYVVIL 320
gi|Seq4                         ----------------------------
gi|27530349|dbj|BAC53948.1|     DTTWGDSGYGYFQAGNNLMMIEQYPYVVIM 321
gi|14276828|gb|AAK58415.1|      GTQWGDAGYGFVERHHNSLGINNYPIYASL 221
```

Fig 23. Alineamiento múltiple entre el proDer p1, pro Der f1, Blot 1 y Seq Nº 5.

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment


giBlot1         ------------------------------------------------------------
giSeq11         ------------------------------------------------------------
giproDerp1      MKIVLAIASLLALSAVYARPSSIKTFEEYKKAFNKSYATFEDEEAARKNFLESVKYVQSN 60
giproDerf1      MKFVLAIASLLVLSTVYARPASIKTFEEFKKAFNKNYATVEEEEVARKNFLESLKYVEAN 60


giBlot1         ---------------------------------------------IPANFDWRQKTH 12
giSeq11         ---------------------------------------------IPANFDWRQKTH 12
giproDerp1      GGAINHLSDLSLDEFKNRFLMSAEAFEHLKTQFDLNAETNACSIN-GNAPAEIDLRQMRT 119
giproDerf1      KGAINHLSDLSLDEFKNRYLMSAEAFEQLKTQFDLNAETSACRINSVNVPSELDLRSLRT 120
                                                            *:::* *.

giBlot1         VNPIRNQGGCGSCWAFAASSVAETLYAIHRHQNIILSEQELLDCTYHLYDPTYKCHGCQS 72
giSeq11         VNPIRNQG------------------------------------------------------ 20
giproDerp1      VTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNQSLDLAEQELVDCASQ--------HGCHG 171
giproDerf1      VTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNTSLDLSEQELVDCASQ--------HGCHG 172
                *.*** **

giBlot1         GMSPEAFKYMKQKGLLEESHYPYKMKLNQCQANARGTRYHVSSYNSLRYRAGDQEIQAAI 132
giSeq11         ------------------------------------------------------------
giproDerp1      DTIPRGIEYIQHNGVVQESYYRYVAREQSCRR-PNAQRFGISNYCQIYPPNVNKIREALA 230
giproDerf1      DTIPRGIEYIQQNGVVEERSYPYVAREQQCRR-PNSQHYGISNYCQIYPPDVKQIREALI 231


giBlot1         MNHGPVVIYIHGTEAHFRNLRKG---ILRGAGYNDAQIDHAVVLVGWGIQNGIDYWIVRT 189
giSeq11         ------------------------------------------------------------
giproDerp1      QTHSAIAVIIGIKDLDAFRHYDGRTIIQRDNGYQPN--YHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRN 288
giproDerf1      QTHTAIAVIIGIKDLRAFQHYDGRTIIQHDNGYQPN--YHAVNIVGYGSTQGVDYWIVRN 289


giBlot1         SWGTQWGDAGYGFVERHHNSLGINNYPIYASL 221
giSeq11         --------------------------------
giproDerp1      SWDTNWGDNGYGYFAANIDLMMIEEYPYVVIL 320
giproDerf1      SWDTTWGDSGYGYFQAGNNLMMIEQYPYVVIM 321
```

Fig 24. Alineamiento múltiple entre el proDer p1, pro Der f1, Blot 1 y Seq Nº 6.

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment


gi|Blot1          ------------------------------------------------------------
gi|Seq9           ------------------------------------------------------------
gi|proDerp1       MKIVLAIASLLALSAVYARPSSIKTFEEYKKAFNKSYATFEDEEAARKNFLESVKYVQSN 60
gi|proDerf1       MKFVLAIASLLVLSTVYARPASIKTFEEFKKAFNKNYATVEEEEVARKNFLESLKYVEAN 60

gi|Blot1          ------------------------------------------IPANFDWRQKIH 12
gi|Seq9           ------------------------------------------------------------
gi|proDerp1       GGAINHLSDLSLDEFKNRFLMSAEAFEHLKTQFDLNAETNACSIN-GNAPAEIDLRQMRT 119
gi|proDerf1       KGAINHLSDLSLDEFKNRYLMSAEAFEQLKTQFDLNAETSACRINSVNVPSELDLRSLRT 120

gi|Blot1          VNPIRNQGGCGSCWAFAASSVAETLYAIHRHQNIILSEQELLDCTYHLYDPTYKCHGCQS 72
gi|Seq9           ------------------------------------------------------------
gi|proDerp1       VTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNQSLDLAEQELVDCAS--------QHGCHG 171
gi|proDerf1       VTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNTSLDLSEQELVDCAS--------QHGCHG 172

gi|Blot1          GMSPEAFKYMKQKGLLEESHYPYKMKLNQCQANARGTRYHVSSYNSLRYRAGDQEIQAAI 132
gi|Seq9           ------------------------------------------------------------
gi|proDerp1       DTIPRGIEYIQHNGVVQESYYRYVAREQSCRRPNAQRFGISNYCQIYPPNVNKIREALAQ 231
gi|proDerf1       DTIPRGIEYIQQNGVVEERSYPYVAREQQCRRPNSQHYGISNYCQIYPPDVKQIREALTQ 232

gi|Blot1          MNHGPVVIYIHGTEAHFRNLRKGILRGAGYNDAQIDHAVVLVGWGTQNGIDYWIVRISWG 192
gi|Seq9           -------------AHFRNLRKGILRGAGYNDAQ------------------------- 20
gi|proDerp1       THSAIAVIIGIKDLDAFRHYDGRTIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRNSWD 291
gi|proDerf1       THTAIAVIIGIKDLRAFQHYDGRTIIQHDNGYQPNYHAVNIVGYGSTQGVDYWIVRNSWD 292
                                 *::     :   . .

gi|Blot1          TQWGDAGYGFVERHHNSLGINNYPIYASL 221
gi|Seq9           ----------------------------- 
gi|proDerp1       TNWGDNGYGYFAANIDLMMIEEYPYVVIL 320
gi|proDerf1       TTWGDSGYGYFQAGNNLMMIEQYPYVVIM 321
```