

PRODUCTO VETERINARIO

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con un extracto veterinario purificado de alérgeno enriquecido. En particular, la invención se relaciona con un extracto veterinario purificado de alérgeno, enriquecido con Der f 15 y Der f 18. La invención se relaciona además con el uso del extracto de alérgeno como producto veterinario, y su uso en el tratamiento de alergias, en particular la alergia a los ácaros del polvo doméstico en mamíferos, más particularmente, en perros.

Antecedentes de la invención

La dermatitis atópica es una enfermedad pruriginosa de la piel de tipo alergia que afecta a aproximadamente 10 % de los perros y se relaciona con la producción de anticuerpos de IgE contra alérgenos ambientales. La causa principal de las alergias no estacionales en perros es la presencia de ácaros del polvo doméstico (APD), en particular la especie *Dermatophagoides farinae*. Se trata a los perros alérgicos con fármacos para controlar los síntomas, pero los tratamientos alternativos incluyen inmunoterapia específica (SIT, por su sigla en inglés) que implica la administración de dosis cada vez mayores de un extracto de alérgeno con el objetivo de inducir la tolerancia inmunitaria. La inmunoterapia con alérgenos modula la respuesta inmunitaria al alérgeno en lugar de mejorar los síntomas inducidos por una reacción alérgica, y puede disminuir la necesidad de medicamentos, disminuir la gravedad de los síntomas o eliminar la hipersensibilidad por completo.

Se ha informado sobre diferencias relevantes con respecto al perfil de alérgenos de APD humano y canino. Si bien la mayoría de los alérgenos para seres humanos (Der f 1 y Der f 2) son proteínas de un peso molecular relativamente escaso, los alérgenos más importantes de *D. farinae* en perros atópicos (Der f 15 y Der f 18) se incluyen en los grupos 15 a 18, que pertenecen a la fracción de ácaros de peso molecular elevado. A pesar de estas diferencias, la inmunoterapia específica para un alérgeno para perros se preparó siempre directamente con los extractos de alérgenos producidos y caracterizados para la inmunoterapia en seres humanos. Un problema de tratar perros con extractos de alérgenos producidos y caracterizados para la inmunoterapia en seres humanos es que los perros pueden sensibilizarse a alérgenos que anteriormente no eran causales, tal como Der f 1 y Der f 2.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar una inmunoterapia específica contra los ácaros del polvo doméstico para su uso veterinario, en particular para perros.

Compendio de la invención

Los inventores de la presente han producido un extracto de ácaro veterinario enriquecido con fracciones de peso molecular elevado. Esta fracción contiene los alérgenos reconocidos por las muestras de suero de los perros sensibilizados a ácaros.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un extracto de ácaro veterinario enriquecido con proteínas con un peso molecular más elevado que 50 kDa.

En una modalidad, el extracto de ácaro veterinario se enriquece con los alérgenos Der f 15 y Der f 18 con respecto al extracto humano.

En una modalidad, el extracto tiene nivel escaso de alérgenos Der f 1 y Der f 2 con respecto al extracto humano.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un proceso para la producción de un extracto de alérgeno de ácaro veterinario, que comprende:

- a) poner en contacto un material de partida que comprenda un alérgeno de ácaro veterinario (materia prima) con una sustancia de extracción de alérgeno para producir una mezcla de alérgenos disuelta en una fase líquida, y una fase sólida que comprenda un residuo no alergénico;
- b) someter la mezcla a una etapa de separación para aislar los alérgenos disueltos en la fase líquida para producir un extracto de alérgeno en bruto;
- c) someter el extracto de alérgeno en bruto a una etapa de eliminación de la fracción molecular media para eliminar aquellas moléculas con un tamaño menor que 50 kDa y aplicar una presión de 1,8 bar durante la etapa de eliminación;
- d) llevar a cabo la etapa c) a 3-5°C hasta que el extracto de alérgeno tenga una conductividad menor que 1050 $\mu\text{S}/\text{cm}$, según se cuantifique a temperatura ambiente, y/o hasta que se haya usado un volumen específico de agua destilada, para obtener un extracto de alérgeno natural.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona un extracto de ácaro

veterinario para su uso como sustancia terapéutica activa en el tratamiento de la alergia.

Breve descripción de las figuras

En la Figura 1 se muestra un SDS-PAGE de 10 µg de proteínas de extractos de *D. farinae*: pauta de peso molecular de poco intervalo (1); extracto humano (2); Extracto 1 (3); Extracto 2 (4); y Extracto 3 (5).

En la Figura 2 se muestra un SDS-PAGE en geles TGX de cualquier kD de 10 µg de proteínas de extractos de *D. farinae*: Marcador preteñido HiMark (LifeTechnologies) (1); extracto humano (2); Extracto 1 (3); Extracto 2 (4); Extracto 3 (5); y pauta de peso molecular de intervalo amplio (Bio-Rad) (6).

En la Figura 3 se muestra un SDS-PAGE de 5 µl de extractos de *D. farinae* luego de un proceso de limpieza: pauta de peso molecular de poco intervalo (1); Extracto 1 (2); Extracto 2 (3); y Extracto 3 (4).

En la Figura 4 se muestra 2D de 170 µg de proteínas de *D. farinae*: Extracto 1 (A); Extracto 2 (B); Extracto 3 (C); extracto humano (D); la pauta de peso molecular de poco intervalo se indica en cada gel.

En la Figura 5 se muestran perfiles cromatográficos del extracto de *D. farinae*: extracto humano (A); Extracto 1 (B); Extracto 2 (C); y Extracto 3 (D).

En la Figura 6 se muestran los péptidos secuenciados para Der f 15 (A, C, E) (SEQ ID NO. 1) y Der f 18 (B, D, F) (SEQ ID NO. 2) de los extractos veterinarios Extracto 1 (A, B), Extracto 2 (C, D) y Extracto 3 (E, F).

En la Figura 7 se muestra una inmunotransferencia de 10 µg de proteínas de extractos de *D. farinae*: pauta de peso molecular de poco intervalo (1); extracto humano (2); Extracto 1 (3); Extracto 2 (4); y Extracto 3 (5).

En la Figura 8 se muestra una densidad óptica de la IgE específica de una mezcla de sueros de perro incubada con extractos humano (lote PRI 6756LN) y veterinarios (080616LN, 090616LN, 290616LN para cada uno de los extractos 1, 2 y 3 respectivamente) de *D.*

farinae.

En la Figura 9 se muestra una densidad óptica de la IgE específica de muestras de suero individuales en función del extracto veterinario 4 de *D. farinae* y el extracto humano de *D. farinae*.

En la Figura 10 se muestra un análisis de potencia por ELISA para el extracto veterinario 4 de *D. farinae* (muestra duplicada).

En la Figura 11 se muestra un análisis de potencia por ELISA para el extracto humano de *D. farinae* y el extracto veterinario 4 de *D. farinae*.

En la Figura 12 se muestra una imagen de una inmunotransferencia, analizada con ImageQuant. Extractos de *D. farinae*: extracto veterinario 4 (2) extracto humano (3) y extracto veterinario 2 (4). 1: Pauta de peso molecular de poco intervalo (kDa). Se marcan las bandas correspondientes a Der f 15 y Der f 18.

En la Figura 13 se muestra una imagen de una inmunotransferencia, analizada con ImageQuant. Extractos de *D. farinae*: extracto veterinario 5 (2) extracto veterinario 4 (3) y extracto humano (4). 1: Pauta de peso molecular de poco intervalo (kDa). Se marcan las bandas correspondientes a Der f 15 y Der f 18.

En la Figura 14 se muestran las bandas identificadas en las imágenes de la inmunotransferencia de la Figura 12 (imagen de la izquierda) y de la Figura 13 (imagen de la derecha).

En la Figura 15 se muestra una inmunotransferencia de 10 µg de proteínas del extracto humano de *D. farinae* y del extracto veterinario de *D. farinae* 4. STD: pauta de peso molecular de poco intervalo. A) sueros positivos 1, 2; B) sueros positivos 3, 4 y testigo negativo C1; C) sueros positivos 5-7 y testigo negativo C2.

En la Figura 16 se muestran IL-10 e IFN-γ producidos por leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) de grupos atópicos y testigos luego de 24 (IL-10) o 48 (IFN-γ) horas de incubación con testigo negativo, extracto humano o el extracto veterinario 2 (se

indican las diferencias significativas (valor de p) en cada gráfica, que muestran la mediana del valor y el intervalo entre cuartiles).

Descripción detallada

El proceso descrito en la presente produce un extracto de alérgeno de ácaro veterinario que presenta un aumento de unión a IgE de las muestras de suero de mamíferos que padecen dermatitis atópica causada por *D. farinae*.

Los extractos de alérgeno de la invención derivan de cualquier material de partida que comprenda alérgenos de ácaro, de los cuales se sabe que generar una reacción inmunitaria en la que interviene la IgE en un animal. En particular, el material de partida es un alérgeno de ácaro del cual se sabe que genera una reacción inmunitaria en la que interviene la IgE en un perro.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un extracto de ácaro veterinario enriquecido con proteínas con un peso molecular mayor que 50 kDa.

En una modalidad, el extracto de ácaro veterinario deriva de *D. farinae*.

En una modalidad, el extracto de ácaro veterinario se enriquece con los alérgenos Der f 15 y Der f 18 con respecto al extracto humano. Los alérgenos Der f 15 y Der f 18 son los principales alérgenos de *D. farinae* en perros atópicos, y también pueden ser alérgenos importantes en otras especies de ácaros, por ejemplo *Dermatophagoides pteronyssinus*.

En una modalidad, el extracto tiene un nivel menor de los alérgenos Der f 1 y Der f 2 con respecto al extracto humano. El nivel de alérgenos presente en el extracto se puede determinar a partir de SDS por análisis densitométrico. Para Der f 1 y Der f 2, estos alérgenos se pueden cuantificar además con equipos comerciales tales como los disponibles en Indoor Biotechnologies Inc (Charlottesville, Virginia, Estados Unidos).

El término «enriquecido» significa un extracto veterinario de alérgeno de ácaro con una concentración mayor de proteínas con un peso molecular mayor que 50 kDa, en comparación con el extracto humano, en particular, con mayor nivel de los alérgenos Der f 15 y Der f 18, tal como se determine según SDS por análisis densitométrico.

La expresión «extracto humano» significa un extracto que se obtiene de las etapas a) a d) que se describen en la presente, pero en el cual la etapa c) elimina las moléculas que tienen un tamaño menor que 3 kDa con el uso de una membrana de diálisis con un peso molecular límite de 3 kDa y se aplica una presión solamente de aproximadamente 1 bar.

En una modalidad, en un análisis de IgE por ELISA con inhibición al 50 %, el extracto de alérgeno de ácaro veterinario del primer aspecto de la invención es al menos 1,5 veces, preferentemente al menos 2,0 veces, más preferentemente 2,0-2,5 veces más eficaz que el extracto humano.

En otra modalidad, en un análisis densitométrico y de inmunotransferencia, en el extracto de alérgeno de ácaro veterinario, la concentración de Der f 15 es al menos 1,5 veces, preferentemente al menos 2,0 veces, más preferentemente 2,0-3,0 veces mayor que el extracto humano, y/o en donde la concentración de Der f 18 es al menos 1,5 veces, preferentemente al menos 2,0 veces, más preferentemente 2,0-3,5 veces mayor que el extracto humano.

En otra modalidad, el extracto de alérgeno de ácaro veterinario comprende Der f 15 y Der f 18 recombinantes, preferentemente los Der f 15 y Der f 18 recombinantes tienen al menos 70 %, más preferentemente al menos 80 %, incluso más preferentemente al menos 90 % de homología con los Der f 15 y Der f 18 no recombinantes, respectivamente, y el extracto de alérgeno de ácaro veterinario aumenta la expresión de IFN- γ e IL-10 en leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica.

Las proteínas recombinantes, de acuerdo con la invención, se pueden expresar con un sistema de expresión de proteínas, tal como un sistema de expresión bacteriano, de levaduras, de insectos, vegetal, de aves o de mamíferos. Los sistemas adecuados resultarán conocidos para el experto en la técnica. La expresión y purificación proteica se lleva a cabo de formas conocidas para el experto en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en Structural Genomics Consortium et al., «Protein Production and Purification», Nature methods, 5, 2, 135 (2008). En algunas modalidades, las proteínas se pueden glucosilar.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un proceso para la producción de un extracto de alérgeno de ácaro veterinario, que comprende:

- a) poner en contacto un material de partida que comprenda un alérgeno de ácaro con una sustancia de extracción de alérgeno para producir una mezcla de alérgenos disuelta en una fase líquida, y una fase sólida que comprenda un residuo no alergénico;
- b) someter la mezcla a una etapa de separación para aislar los alérgenos disueltos en la fase líquida para producir un extracto de alérgeno en bruto;
- c) someter el extracto de alérgeno en bruto a una etapa de eliminación de la fracción molecular media para eliminar aquellas moléculas con un tamaño menor que 50 kDa y aplicar una presión de 1,8 bar durante la etapa de eliminación;
- d) llevar a cabo la etapa c) a 3-5 °C hasta que el extracto de alérgeno tenga una conductividad menor que 1050 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y/o hasta que se haya usado un volumen específico de agua destilada para obtener un extracto de alérgeno enriquecido.

El material de partida puede seleccionarse de la familia Pyroglyphidae, la cual incluye las especies *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Euroglyphus maynei*, y/o la familia Acaridae.

En una modalidad, el material de partida es *Dermatophagoides farinae*.

En una modalidad preferida de la invención, el material de partida es un cultivo de ácaros con >80 % de organismos de *D. farinae*. El resto del porcentaje del material de partida puede comprender las heces de los ácaros y/o medio de cultivo. El porcentaje de organismos de ácaros se puede determinar mediante la observación del cultivo de ácaros en microscopio y el conteo de la cantidad de organismos de ácaros con respecto a otras partículas en un cultivo de ácaros.

Los alérgenos se obtienen del material de partida mediante extracción con una sustancia de extracción de alérgeno para producir un extracto de alérgeno en bruto que comprenda los alérgenos disueltos en una fase líquida y una fase sólida que comprenda un residuo no alergénico «no deseado». La sustancia de extracción de alérgeno puede ser una solución acuosa y preferentemente comprende una sustancia amortiguadora. La sustancia de extracción de alérgeno puede comprender PBS y/o NaCl, por ejemplo, una solución de PBS

0,01 M/NaCl 0,15 M, o bicarbonato de amonio $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ y/o NaCl, por ejemplo, una solución de $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 0,125 M/NaCl 0,15 M. Se puede extraer el material de partida en la sustancia de extracción de alérgeno en cualquier relación en la que el peso de la sustancia de extracción de alérgeno supere el peso del material de partida, por ejemplo, 1:2, 1:3, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:80. Preferentemente, el material de partida se extrae en la sustancia de extracción de alérgeno en una relación de 1:10 de material de partida:sustancia de extracción de alérgeno (p/p). La relación del material de partida respecto a la sustancia de extracción de alérgeno en la etapa de extracción (etapa a) puede variar pero debe ser de un modo tal que los alérgenos en el residuo del material de partida se puedan disolver en la sustancia de extracción de alérgeno. La extracción del material de partida con la sustancia de extracción de alérgeno se lleva a cabo preferentemente durante un tiempo suficiente para que los alérgenos en el material de partida se disuelvan en la sustancia de extracción de alérgeno, lo cual puede ser de entre 30 minutos a 12 horas, preferentemente entre 1 a 6 horas, más preferentemente entre 2 a 5 horas y más preferentemente durante alrededor de 4 horas. La etapa de extracción de alérgeno se puede llevar a cabo entre 20 y 25 °C, pero preferentemente se lleva a cabo en frío entre 2 y 6 °C, y más preferentemente entre 3 y 5 °C. Durante la etapa de extracción del alérgeno, preferentemente se agita o bate el material de partida con la sustancia de extracción de alérgeno.

Luego de la etapa de extracción del alérgeno, los alérgenos disueltos en la fase líquida se separan del residuo del material de partida para producir un extracto de alérgeno en bruto. La etapa de separación es preferentemente centrifugación, aunque son aplicables muchas técnicas para separar sólidos de líquidos, las cuales resultan conocidas para el experto en la técnica. Preferentemente, los alérgenos disueltos en la fase líquida se centrifugan entre 2 y 6 °C, y preferentemente entre 3 y 5 °C, durante suficiente tiempo para sedimentar el residuo del material de partida como un sedimento, por ejemplo, entre 1 minuto y 1 hora, o más de 1 hora. El extracto de alérgeno en bruto (es decir, el sobrenadante que contiene los alérgenos disueltos) se puede almacenar entre 2 y 6 °C. El sedimento del residuo del material de partida se puede extraer además con la sustancia de extracción de alérgeno con el uso de las mismas condiciones que la primera etapa de extracción del alérgeno (etapa a) y preferentemente durante un período de extracción más prolongado de entre 4 y 8 horas, 8 y 12 horas o más de 12 horas. Luego de la segunda etapa de extracción del alérgeno, los alérgenos disueltos en una fase líquida se pueden separar del residuo del material de partida para producir un extracto de alérgeno en bruto. Los extractos de

alérgeno en bruto de la primera y la segunda etapa de extracción del alérgeno se agrupan preferentemente para su posterior tratamiento.

Se puede filtrar el extracto de alérgeno en bruto, por ejemplo, con filtros con un tamaño de poro de 0,8-1,2 μm . El extracto de alérgeno en bruto se somete entonces a una etapa de eliminación de la fracción molecular media para eliminar las moléculas que tienen un tamaño molecular medio, tal como alérgenos de poco peso molecular, sales y otros compuestos no alergénicos. En la etapa c) se pueden eliminar las moléculas que tengan un tamaño molecular menor que 50 kDa.

Durante la etapa de eliminación de la fracción molecular media, se fija una presión de entre 1,2 y 1,8 bar. La etapa de aplicar una presión de alrededor de 1,2 a 1,8 bar durante el proceso de eliminación de la fracción molecular media es importante para la presente invención. La aplicación de mayor presión, en comparación con los métodos de extracción de la técnica previa a 1 bar, mejora la eficacia del proceso. Preferentemente, la presión se fija a 1,8 bar.

La etapa de eliminación de la fracción molecular media se continúa preferentemente entre 3 y 5 °C hasta que la conductividad del extracto de alérgeno sea menor que 1050 $\mu\text{S/cm}$, o menor que 900 $\mu\text{S/cm}$, o menor que 800 $\mu\text{S/cm}$, o menor que 700 $\mu\text{S/cm}$, o menor que 600 $\mu\text{S/cm}$, o preferentemente, menor que 500 $\mu\text{S/cm}$ (cuantificado a temperatura ambiente). Además, o de forma alternativa, la etapa de eliminación de la fracción molecular media se continúa hasta que se haya usado un volumen específico de agua destilada. Se puede calcular un volumen adecuado de agua destilada necesaria para la diafiltración con la siguiente fórmula: $\text{ml de extracto filtrado} \times 10 = \text{volumen de agua destilada}$. El resultado es un extracto de alérgeno natural purificado, enriquecido con proteínas de mayor peso molecular.

La etapa de eliminación de peso molecular medio puede comprender una etapa de ultrafiltración, una etapa de diafiltración, una etapa de diálisis o filtración. Preferentemente, la etapa de eliminación de peso molecular medio (etapa c) comprende una etapa de diafiltración.

El extracto de alérgeno natural resultante se puede filtrar, por ejemplo, con un tamaño de

poro de 0,22 μm , y se puede congelar o liofilizar para su almacenamiento.

La presente invención comprende además un tratamiento para la alergia veterinaria a ácaros y un extracto para diagnóstico para la alergia veterinaria a ácaros, los cuales comprenden ambos como principio activo extractos de alérgeno producidos mediante procesos de la presente invención. La alergia veterinaria a ácaros puede asociarse a la exposición a alérgenos de ácaros tales como *D. farinae* que generan una respuesta alérgica en la que interviene la IgE, tal como se trata en la presente.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un extracto veterinario de alérgeno de ácaro que se obtiene o se puede obtener de acuerdo con los procesos que se describen en la presente.

El extracto veterinario de alérgeno de ácaro puede usarse en el tratamiento de alergias a ácaros en animales. En una modalidad preferida, el extracto de alérgeno se puede usar en el tratamiento de la alergia a ácaros en perros. En otra modalidad preferida, el extracto de alérgeno se puede usar para el tratamiento de la alergia a ácaros en gatos, en donde el gato comprende anticuerpos de IgE en suero, que en un análisis de inmunotransferencia reaccionan con los alérgenos de *Dermatophagoides farinae* con pesos moleculares mayores que 40 kDa e incluso Der f 15 y Der f 18 o Der f 15 y Der f 18 recombinantes, preferentemente los Der f 15 y Der f 18 recombinantes tienen al menos 70 %, más preferentemente al menos 80 %, incluso más preferentemente al menos 90 % de homología respectivamente con los Der f 15 y Der f 18 no recombinantes.

El extracto de alérgeno de la presente invención se puede caracterizar por las siguientes propiedades fisicoquímicas y biológicas:

- i. Mayor contenido de proteínas, que se determina mediante el método de Bradford, con respecto al extracto humano de *D. farinae*;
- ii. Disminución del contenido de proteínas con un peso molecular menor que 30 kDa, identificado como bandas en SDS-PAGE al disminuir las condiciones, con respecto al extracto humano, excepto por una banda de alrededor de 20 kDa, que aún está presente en el extracto veterinario;

- iii. Disminución del contenido de Der f 1 (alrededor de 30 kDa) y Der f 2 (alrededor de 15 kDa) con respecto al extracto humano, tal como se determine mediante cuantificación con los equipos de ELISA de Indoor;
- iv. Disminución de las bandas de reconocimiento de IgE con un peso molecular menor que 30 kDa, que se identifica mediante inmunotransferencia en condiciones que disminuyen, excepto por una banda de alrededor de 20 kDa, en comparación con el extracto humano;
- v. Modificación del perfil de distribución del peso molecular (PM) con respecto al extracto humano, determinado mediante cromatografía por exclusión de tamaño;
- vi. Aumento de la unión a IgE con respecto al extracto humano, determinado mediante experimentos con ELISA para IgE, con una mezcla específica de sueros de individuos sensibilizados;
- vii. La presencia de los alérgenos principales para perros Der f 15 y Der f 18, que se identifican mediante espectrometría de masas;
- viii. El aumento del contenido de Der f 15 con respecto al extracto humano, que se determina mediante cuantificación relativa de proteínas con proteómica selectiva;
- ix. El aumento en el contenido de Der f 15 y Der f 18 con respecto al extracto humano, que se determina mediante análisis densitométrico e inmunotransferencia con una mezcla específica de sueros de individuos sensibilizados;
- x. El aumento de la potencia biológica con respecto al extracto humano, que se determina mediante un análisis ELISA de inhibición al 50 % con una mezcla específica de sueros de individuos sensibilizados;
- xi. La inducción de la producción de citocinas IL-10 e IFN- γ en los leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica de perros sensibilizados a *D. farinae*.

Los extractos de alérgeno de la presente invención pueden usarse como principio activo de un medicamento para el tratamiento de un animal alérgico, con el objetivo de inducir la tolerancia a determinados alérgenos de ácaros.

Se proporciona el uso de un extracto de alérgeno de acuerdo con la presente invención en el diagnóstico de trastornos inmunitarios, preferentemente para detectar una alergia. Se proporciona el uso de un extracto de alérgeno de acuerdo con la presente invención para el tratamiento de la alergia a ácaros o en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la alergia a ácaros. El uso puede ser para inmunoterapia. El uso puede ser con el objetivo de normalizar, diagnosticar, sintetizar y vacunar. El uso puede darse en un tratamiento terapéutico en animales, preferentemente en inmunoterapia. El uso puede darse en el control de los animales durante la inmunoterapia.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un extracto de alérgeno, de acuerdo con la presente invención. También se proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de la alergia a ácaros que comprende como principio activo una cantidad con eficacia farmacéutica de un extracto veterinario de alérgeno de ácaro, de acuerdo con la presente invención, y al menos un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. Se proporciona una composición de diagnóstico para la alergia a ácaros que comprende como principio activo una cantidad eficaz para el diagnóstico de un extracto de alérgeno, de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una vacuna que comprende un extracto veterinario de alérgeno de ácaro de acuerdo con la presente invención. La composición farmacéutica y la vacuna pueden comprender además uno o más adyuvantes, diluyentes, conservantes o mezclas de estos. La composición farmacéutica o vacuna puede comprender un excipiente fisiológicamente aceptable. Tal como se utiliza en la presente, la frase «farmacéuticamente aceptable» significa preferentemente aprobado por un organismo regulador de un gobierno, o incluido en la Farmacopea europea y de los Estados Unidos u otra farmacopea conocida para el uso en animales.

Dichos excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos estériles, tales como

agua y aceites, que incluyen los derivados del petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. También se pueden emplear soluciones salinas y soluciones de dextrosa y glicerol acuosas como excipientes líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos aceptables incluyen manitol, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada deshidratada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares.

Se proporciona una vacuna que se puede obtener de acuerdo con el proceso del primer aspecto de la presente invención. La vacuna puede ser para uso subcutáneo, sublingual o epicutáneo.

Se proporciona el uso de una vacuna de acuerdo con la presente invención en el tratamiento de la alergia a ácaros o en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la alergia a ácaros.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para impedir la sensibilización a un alérgeno, que comprende las etapas de: exponer a un animal a una cantidad eficaz de un extracto de alérgeno, la composición farmacéutica o la vacuna de la presente invención.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para tratar una alergia a ácaros en un animal sensibilizado, que comprende la administración a un mamífero de una cantidad eficaz de un extracto de alérgeno, la composición farmacéutica o la vacuna de la presente invención. El extracto del alérgeno, la composición farmacéutica o la vacuna se administran por vía subcutánea o sublingual, y se pueden administrar en dosis constantes o crecientes. El término «mamífero» excluye a los seres humanos.

Preferentemente, el mamífero es un perro. Preferentemente, el mamífero es un gato, en donde el gato comprende anticuerpos de IgE en suero, que en un análisis de inmunotransferencia reaccionan con alérgenos de *Dermatophagoides farinae* con pesos moleculares mayores que 40 kDa e incluso Der f 15 y Der f 18 o Der f 15 y Der f 18

recombinantes, preferentemente los Der f 15 y Der f 18 recombinantes tienen al menos 70 %, más preferentemente al menos 80 %, incluso más preferentemente al menos 90 % de homología respectivamente con los Der f 15 y Der f 18 no recombinantes.

La presente invención se ilustra con los siguientes ejemplos, que detallan los procesos para la preparación de los extractos que comprenden alérgenos.

Ejemplos

El material de partida, al que también se hace referencia como materia prima, que se utiliza para la producción del extracto fue un cultivo de ácaros con >80 % de los organismos de *D. farinae* cultivados por Laboratorios LETI y se encuentra disponible en el mercado. Se prepararon los tres extractos veterinarios de acuerdo con el siguiente método:

A. Extracción I

- Se pesó la materia prima a extraer y se anotó el peso;
- Se calculó el volumen de sustancia necesaria para extracción (PBS 0,01M - NaCl 0,15M) con la siguiente fórmula:
$$\text{Materia prima (g)} \times 20 = \text{ml de sustancia de extracción};$$
- Se colocó el material en bruto en un recipiente con la mitad del volumen de la sustancia de extracción que se calculó en la etapa anterior y se extrajo a 3-5 °C con agitación magnética durante 4 horas:
$$\text{ml de sustancia de extracción (vol. total)} \div 2 = \text{ml de sustancia de extracción (Volumen I)};$$
- Se centrifugó la mezcla a 10.000 rpm a 5 °C durante al menos 30 minutos;
- Luego se recuperó el sobrenadante y se anotó el volumen. Se mantuvo el sobrenadante a 3-5 °C en un recipiente cerrado y etiquetado. Se tuvo cuidado de evitar que el resto del sedimento se mezclara con el sobrenadante, para asegurar máxima claridad.

B. Extracción II

- Se agregó el sedimento de la extracción I con el resto del volumen de sustancia de extracción (Volumen II). Se extrajo la mezcla con agitación a 3-5 °C durante al menos 8 horas;
- Luego se centrifugó la mezcla a 10.000 rpm a 5 °C durante al menos 30 minutos;

- Se recuperó el sobrenadante y se anotó el volumen y se descartó el sedimento;
- Se combinaron los sobrenadantes de las extracciones I y II y se anotó el volumen combinado;
- Se filtraron los sobrenadantes combinados con filtros de 0,8-1,2 μm . Se anotó el volumen obtenido luego de la filtración.

C. Diafiltración

- La diafiltración de la solución de extracto se llevó a cabo en una membrana de casete de ultrafiltración de 50 kDa. En esta etapa, se eliminaron las moléculas que tienen un tamaño molecular menor que 50 kDa;
- El volumen de agua destilada necesario para la diafiltración se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:
ml de extracto filtrado $\times 10$ = volumen de agua destilada;
- Una vez que comenzó la diafiltración, se fijó la presión a 1,8 bar y se mantuvo la solución de extracto en hielo y con agitación constante;
- La conductividad del extracto diafiltrado se verificó entonces para ver si fue menor que 1050 $\mu\text{S/cm}$. Si la conductividad fue mayor, se continuó la diafiltración con un volumen adicional de agua;
- Se filtró el extracto diafiltrado con filtros de 0,22 μm ;
- Luego se dividió en porciones el extracto filtrado en frascos de cristal de topacio y luego se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se mantuvieron los frascos a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ o menos durante un período máximo de 15 días;
- Luego se liofilizó el extracto.

El producto final consiste en un extracto veterinario liofilizado que se almacena a 4°C en condiciones de liofilización.

Caracterización inmunoquímica

Contenido de proteínas

El contenido de proteínas se determinó mediante el método de Bradford, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, por su sigla en inglés)

Se identificaron perfiles proteicos con SDS-PAGE en condiciones decrecientes (muestras incubadas con β -mercaptoetanol y calentadas durante 10 minutos a 95 °C) en geles de acrilamida y bisacrilamida 2,67 % C y 15 % T. Se desarrollaron las muestras y la pauta del peso molecular bajo (BioRad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos) en el mismo gel. Se tiñeron los geles con azul de Coomassie R-250 (BioRad) al 0,1 %. También se analizaron los perfiles proteicos con geles TGX de cualquier kD (BioRad). Se desarrollaron las muestras, marcadores preteñidos HiMark (LifeTechnologies, California, Estados Unidos) y la pauta del peso molecular de intervalo amplio (Bio-Rad) en el mismo gel.

2D

Para la electroforesis 2-D, se purificaron y concentraron los extractos con una solución de sulfato de amonio en 2 etapas separadas hasta que se alcanzaron los porcentajes de saturación de 40 % y 80 %. Luego, se centrifugaron las muestras y se recolectaron los sedimentos y se reconstituyeron en agua ultrapura. Se lavaron los extractos concentrados con el equipo de limpieza ReadyPrep 2-D (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se separaron las proteínas de acuerdo con su punto isoeléctrico en tiras ReadyStrip IPG (BioRad) con un intervalo de pH de 3 a 10, con Protean IEF Cell (BioRad). Luego de la primera dimensión, se equilibraron las tiras con amortiguadores del equipo ReadyPrep 2-D (BioRad) y se separaron las proteínas en la segunda dimensión, de acuerdo con su peso molecular. Se tiñeron los geles con solución fluorescente Oriole (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Contenido de hidratos de carbono

La determinación del contenido de hidratos de carbono se basa en el procedimiento descrito en «Current Protocols in Food Analytical Chemistry E.1.1.1.-E.1.1.8, Eric Fourier (2001)». Brevemente, se prepararon una curva de calibración de diferentes concentraciones de glucosa (0-1 mg/ml) y al menos cuatro diluciones comenzando en 4 mg/ml de los extractos de ácaro. Se agregó un volumen de 0,5 ml de fenol al 4 % y 2,5 ml de H₂SO₄ a todas las muestras, se mezcló bien y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se midió la absorbancia a 495 nm. Se obtuvo la curva de calibración con los resultados de las muestras de glucosa y se interpolaron las concentraciones de las muestras para obtener los resultados.

Contenido de endotoxinas

Se determinó el contenido de endotoxinas (EU/ml) con una técnica colorimétrica basada en el análisis de lisado de amebocitos *Limulus* con un sistema Endoscan V (Charles River Laboratories). Con este fin, se disolvieron muestras a 1 mg/ml en agua sin endotoxinas y se prepararon diluciones de 1/100 y 1/500.

Actividad enzimática

Se evaluó la actividad enzimática de 19 enzimas diferentes (descritas más adelante) en los extractos de *D. farinae* con el sistema APY-Zym (Biomérieux) siguiendo las instrucciones del fabricante. Adicionalmente, se analizó la actividad de la quitinasa con un equipo para análisis de quitinasa (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Inmunotransferencia

Se transfirieron proteínas separadas en forma electroforética (con SDS-PAGE) a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno) (Turbo TM Transfer Pack Trans-Blot®, BioRad), bloqueado durante 1 hora con leche descremada al 5 % en solución amortiguadora con fosfato (PBS) 0,01 mol/L - Tween al 0,1 % y se incubó durante la noche con sueros de perros con resultados positivos al alérgeno diluido en PBS 0,01M-Tween al 0,1 %. La unión específica de IgE al extracto se detectó con anticuerpos conjugados con peroxidasa, IgE-PO antiperro (Abd Serotec), producido con soluciones de luminol (equipo Western Immun-Star™ Western C™, Bio-Rad) y se detectó mediante quimioluminiscencia (ChemiDoc XRS, Bio-Rad).

Cuantificación de alérgenos principales

Se cuantificaron los alérgenos principales con un método intercalado de ELISA con el uso de equipos de detección para análisis inmunoabsorbentes ligados a enzimas (Indoor Biotechnologies, VA, Estados Unidos). En resumen, se recubrieron placas Nunc Maxisorp (Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) con un anticuerpo monoclonal específico diluido en amortiguador de carbonato/bicarbonato (pH = 9,6) y se incubó durante la noche a 4 °C. Luego, se bloquearon las placas con BSA (seroalbúmina bovina) al 1 % en PBS 0,01 M - Tween al 0,05 %. Luego, se agregaron muestras y calibres en medias diluciones en serie con BSA al 1 % en PBS 0,01 M - Tween 0,05 %. Se agregó un anticuerpo monoclonal específico secundario (biotinilado) y finalmente se usó estreptavidina. Se cuantificó la reacción con solución de crecimiento (cromógeno) a una densidad óptica (DO) de 450 nm luego de detenerse con ácido sulfúrico. Se obtuvo la curva de calibración con

un ajuste logístico de 4 parámetros mediante el método de mínimos cuadrados, donde se interpolaron las concentraciones de muestras para obtener los resultados.

Análisis ELISA

Se cuantificó la IgE específica para *D. farinae* en la mezcla de sueros mediante ELISA directo. En resumen, se recubrieron microplacas (Immulon IV; Thermo Scientific) con la misma cantidad de proteína de los extractos de *D. farinae* y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Se bloquearon las placas durante 1 h con leche descremada al 5 % en PBS 0,01 mol/L - Tween al 0,1 %. Se diluyó en serie la mezcla de sueros y se incubó durante 2 h. Luego del lavado, se agregó el anticuerpo secundario (diluido a 1:10000) que consistió en IgE anti-perro de cabra:PRP (peroxidasa de rábano picante). Finalmente, se lavaron las microplacas, se produjo la reacción y se midió la DO a 450 nm en un lector de placas para ELISA automático.

Cromatografía de exclusión por tamaño

Se disolvieron los extractos en amortiguador con fosfato 40 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM y se filtró mediante filtros de 0,45 µm. Se cargó un mg de proteína de los extractos en una columna Superdex 75 16/60 (GE Healthcare) y se analizó en un sistema ÄKTAexplorer (GE Healthcare). Se registró la absorbancia a 280 nm durante 120 minutos y se analizaron los cromatogramas con el software Unicorn.

Identificación de alérgenos

Se cortaron bandas de un gel para SDS-PAGE (teñido con Coomassie), se redujo con DTT 10 mM, se trató con yodoacetamida y se digirió con tripsina. Se analizaron los péptidos obtenidos con cromatografía líquida acoplada a un espectrofotómetro de masas 5600 TRIPLE TOFF. Se analizaron los datos en bruto con el servidor MASCOT contra la base de datos de NCBI Acari.

Cuantificación relativa de proteínas

Digestión de proteínas: Se volvieron a suspender los extractos en NH_4HCO_3 50 mM (pH 8,5). Se extrajeron las proteínas con disgregación y solubilización de sondas ultrasónicas, se precipitaron y se volvió a suspender el residuo en urea 8 M/ NH_4HCO_3 50 mM (pH 8,5). Se redujeron las proteínas (DTT 20 mM) y se alquilaron (yodoacetamida 35 mM). Luego, se digirió la muestra con tripsina porcina, se lavó, se secó y se almacenó a -20°C hasta el

nanoUPLC y análisis de espectrometría de masas posterior.

Análisis LC-MSMS: Se analizaron las mezclas de péptidos en un cromatógrafo líquido nanoAcquity (Waters) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Se captaron los péptidos en una columna de captación Symmetry C18TM (Waters), y se separaron con una columna capilar de fase inversa C18 (Waters).

Análisis dependiente de los datos (ADD): Se sometió a los péptidos eluidos a una ionización por electropulverización en una aguja emisora (PicoTipTM, New Objective). Se analizaron las masas de los péptidos (m/z 300-1700) de un modo dependiente de los datos, donde fue necesaria una espectrometría de masas completa en el Orbitrap. Se recopilaron los datos en bruto generados con Thermo Xcalibur (v.2.2) y se buscó contra la base de datos de *Dermatophagoides farinae*.

Análisis selectivo: Se evaluaron los datos adquiridos y las búsquedas en Skyline (v.3.1). Se seleccionaron los péptidos identificados como de gran confianza de los cuales se demostró que eran estables en el transcurso de las pruebas. Se adquirieron las muestras por triplicado con un método de control de reacción paralelo y espectrometría de masas en tándem selectivo con fines de cuantificación. Se agregó Fibrinopéptido B habitual (Glufib) (Waters) a cada muestra con el objetivo de normalizar.

Se compararon muestras de consulta (extracto veterinario) contra las muestras Testigo (extracto humano) con el uso de significación estadística entre las dos condiciones con una prueba de la t de Student, con 95 % de confianza en el nivel peptídico.

Análisis de potencia ELISA

En resumen, se recubrieron microplacas (Immulon IV; Thermo Scientific) con el extracto veterinario de *D. farinae* (2 μ g/pocillo) y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Se bloquearon las placas durante 1 h con leche descremada al 5 % en PBS 0,01 mol/L - Tween al 0,1 %. Para el análisis de inhibición, se preincubaron sueros con diluciones en serie del extracto inhibidor en una placa Nunc (Thermo Scientific) durante 2 horas antes de la adición de Immulon IV. Se incubó la mezcla de sueros durante 2 h. Luego de lavar, se agregó el anticuerpo secundario (diluido 1:10000) que consistió en IgE antiperro de cabra:PRP. Finalmente, se lavaron las microplacas, se produjo la reacción y se midió la

densidad óptica (DO) a 450 nm en un lector de placas para ELISA automático. Se representó el porcentaje de inhibición del suero con respecto al μg en escala logarítmica del extracto para calcular los μg que produce la inhibición al 50 %.

Inmunotransferencia en gatos

Se separaron los extractos veterinario y humano de *D. farinae* en forma electroforética (con SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno) (Turbo TM Transfer Pack Trans-Blot®, BioRad), bloqueado durante 1 hora mediante el secado de la membrana a temperatura ambiente y se incubó durante la noche con sueros de gatos diluidos 1/6 en PBS 0,01M. Se detectó unión específica de IgE al extracto con incubación de la membrana 2 horas con anticuerpos antifelino-IgE biotinilados (Greer), luego se incubó con estreptavidina por 1 hora, se hizo crecer con soluciones de luminol (equipo Western Immun-Star™ Western CTM, Bio-Rad) y se detectó mediante quimioluminiscencia (ChemiDoc XRS, Bio-Rad).

SDS-PAGE

Se analizaron diez μg de proteínas de las muestras liofilizadas mediante SDS-PAGE en condiciones decrecientes con geles de acrilamida al 15 % (Figura 1) y geles comerciales TGX (Bio-Rad) (Figura 2). Los alérgenos principales identificados en las muestras se indican en las figuras.

Se observó el mismo perfil proteico (Figura 1) en los extractos veterinarios 1, 2 y 3, con una reducción significativa en la banda de Der f 2 (alrededor de 15 kDa) y la banda de Der f 1 (alrededor de 30 kDa) y un aumento en la intensidad en las proteínas mayor que 40 kDa con respecto al extracto humano. La banda a alrededor de 20 kDa identificada como ferritina en estudios anteriores también fue más intensa en los tres extractos veterinarios con respecto al extracto humano.

Con respecto a los geles TGX (Figura 2), se observó el mismo perfil proteico en los extractos 1, 2 y 3. Además, también se observaron las mismas diferencias en los alérgenos pertinentes entre los extractos humanos y veterinarios.

2D

A modo de estudio adicional al análisis del perfil proteico de los extractos veterinarios, se

llevó a cabo una electroforesis 2D. Se lavó la misma cantidad de proteínas de cada extracto y se analizó con SDS-PAGE (Figura 3).

Luego, se enviaron 170 µg de cada muestra a la primera dimensión, el isoelectroenfoque. Luego, se sometieron a todos los extractos a la segunda dimensión mediante SDS-PAGE y tinción con Oriole. Se obtuvo un perfil proteico casi idéntico para los tres extractos veterinarios, tal como puede observarse en la Figura 4. Se observó una proporción mayor de proteínas de entre 20-100 kDa y a un pH ácido en los extractos veterinarios en comparación con el extracto humano (el perfil proteico 2D del extracto humano se obtuvo de un estudio previo).

Cromatografía por exclusión por tamaño

Finalmente, a modo de análisis adicional a la modificación en la distribución del peso molecular de los extractos veterinarios con respecto al extracto humano, se analizaron todas las muestras mediante cromatografía por exclusión de tamaño. Se inyectó la misma cantidad de proteína de cada extracto (1 mg) en una columna Superdex 75 16/60 y se analizó en un sistema ÄKTA explorer para obtener la distribución del peso molecular de cada muestra en condiciones no decrecientes. Se disolvieron los extractos en amortiguador con fosfato 40 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM y se inyectó un volumen de aproximadamente 2 ml en la columna. El perfil cromatográfico obtenido para todos los extractos se muestra en la Figura 5.

Se obtuvieron los dos picos cromatográficos principales para todos los extractos, uno a los 56 min. aproximadamente, y el segundo a los 100 min. Sin embargo, cuando se comparan los perfiles cromatográficos de los extractos veterinarios (Figura 5B-D) con uno obtenido para el extracto humano (Figura 5A), se puede observar que los extractos veterinarios presentaron una disminución en la señal Abs de 280 nm con tiempos de elución mayores (Pico 2), que corresponde a proteínas con menor peso molecular. Por otro lado, el Pico 1 que contiene proteínas con peso molecular más elevado aumentó para los extractos veterinarios en comparación con el extracto humano.

Cuantificación de los alérgenos principales

Se cuantificaron los alérgenos principales humanos Der f 1 y Der f 2 en tres extractos veterinarios en comparación con el extracto humano. El contenido medio de ambos

alérgenos en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto liofilizado se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Contenido de Der f 1 y Der f 2 ($\mu\text{g}/\text{mg}\pm\text{SD}$) del extracto humano y de los extractos veterinarios (n = 2)

	Der f 1	Der f 2
Humano	9,24 $\pm$ 1,4	20,95 $\pm$ 2,7
Extracto 1	3,20 $\pm$ 0,6	1,24 $\pm$ 0,2
Extracto 2	1,45 $\pm$ 0,3	0,95 $\pm$ 0,1
Extracto 3	1,45 $\pm$ 0,4	0,66 $\pm$ 0,0

Der f 1 tenía menos de 4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en los tres extractos veterinarios y experimentó una disminución de 4,5 veces en promedio con respecto al extracto humano. Se halló que Der f 2 fue menor que 1,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en todos los extractos veterinarios, lo cual representó una disminución de 22 veces con respecto al extracto humano.

Contenido de hidratos de carbono

Se determinó el contenido de hidratos de carbono equivalente a la glucosa para todos los extractos mediante un método espectrofotométrico con ácido sulfúrico y fenol como reactivos. Los resultados obtenidos en μg de glucosa/ mg de extracto liofilizado se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Contenido de glucosa ($\mu\text{g}/\text{mg}\pm\text{SD}$) del extracto humano y los extractos veterinarios (n = 2)

	Contenido de glucosa ($\mu\text{g}/\text{mg}\pm\text{SD}$)
Humano	42,7 $\pm$ 0,2
Extracto 1	51,5 $\pm$ 7,7
Extracto 2	55,3 $\pm$ 5,0
Extracto 3	45,1 $\pm$ 11,7

Los tres extractos veterinarios presentaron un contenido muy similar de hidratos de carbono en comparación con el extracto humano, aunque el Extracto 3 presentó una mayor variabilidad entre los análisis.

Contenido de endotoxinas

Se determinó el contenido de los extractos en las endotoxinas. Se disolvieron los cuatro

extractos a una concentración de 1 mg/ml. Se usaron diluciones de 1/100 y 1/500 en cada caso. En la Tabla 3 se muestra el contenido medio de endotoxinas en EU/ml y EU/mg de extracto liofilizado obtenido para cada dilución y cada extracto.

Tabla 3: Contenido de endotoxinas del extracto humano y los extractos veterinarios (n = 2)

	1/100 (EU/ml)	1/500 (EU/ml)	Medio (EU/ml)	EU/mg
Humano	60,1±0,3	54,6±0,0	57,4±3,9	57,4±3,9
Extracto 1	64,9±0,8	87,9±0,5	76,4±16,2	76,4±16,2
Extracto 2	35±0,8	34,8±1,9	34,9±0,1	34,9±0,1
Extracto 3	83,4±4,2	95,7±6,0	89,5±8,7	89,5±8,7

El Extracto 1 presentó una variabilidad mayor entre las dos diluciones evaluadas. Sin embargo, todos los valores de contenidos de endotoxinas se encontraron en un intervalo similar, entre 30-90 EU/mg de extracto liofilizado, y las diferencias entre los extractos pueden deberse a las diferentes materias primas utilizadas para la producción de cada extracto.

Actividad enzimática

La mayoría de los alérgenos de ácaro tienen actividad enzimática, por tal motivo es importante analizar la actividad enzimática de los extractos. Se usó el sistema API-ZYM para evaluar la actividad de 19 enzimas diferentes: fosfatasa alcalina, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), lipasa (C14), leucina arilamidasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa, tripsina, α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -glucuronidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, α -manosidasa y α -fucosidasa. Se prepararon las muestras a 1 mg de proteína/ml en agua destilada. Luego de la incubación de cada muestra con los sustratos, se produjeron actividades enzimáticas durante 10 minutos. Se interpretaron los resultados en forma óptica de acuerdo con el manual de instrucciones de 0 a 5 (0 significa sin color, 5 significa un color muy fuerte). Los resultados de 2 o menos se consideraron negativos. Se dividieron los resultados de determinación semicuantitativos de las diferentes actividades enzimáticas en grupos según el tipo de enzima analizada.

Las fosfatasas (Tabla 4) dieron positivo en todos los extractos, que constituyó la actividad más intensa para la fosfatasa ácida. No se encontraron diferencias entre los extractos humano y veterinarios.

Tabla 4: Actividad de fosfatasa de extractos humano y veterinario determinada mediante APIZYM

	Fosfatasa alcalina	fosfatasa ácida	Naftol-AS-BI-fosfo- hidrolasa
Humana	4	5	5
Extracto 1	4	5	4
Extracto 2	4	5	4
Extracto 3	4	5	4

Con respecto a las proteasas (Tabla 5), no se halló actividad de cisteína arilamidasa en ninguno de los extractos mientras que la valina y leucina arilamidasa dieron positivo y fueron similares en todos los extractos. La actividad de tripsina fue menor o incluso negativa en los extractos veterinarios, en comparación con el extracto humano y la α -quimotripsina dio positivo en todos los extractos (esto es en contraste con los resultados obtenidos por Morales et al. (Enzymatic Activity of Allergenic House Dust and Storage Mite Extracts, J. Med. Entomol., 2013, 50, 147-54) que no encontró actividad de la α -quimotripsina en un extracto humano de *D. farinae*).

Tabla 5. Actividad de proteasas de extractos humano y veterinarios determinada por APIZYM

	Leucina arilamidasa	Valina arilamidasa	Cistina arilamidasa	Tripsina	α -quimotripsina
Humana	4	3	1	3	2
Extracto 1	4	3	0	1	2
Extracto 2	3	2	0	2	3
Extracto 3	4	2	0	0	3

La Tabla 6 contiene la información sobre las lipasas. No se halló actividad de lipasa en los extractos, mientras que dieron positivo para esterasa y esterasa lipasa y fueron similares en todos los extractos, con excepción del Extracto 2 que dio negativo para la esterasa.

Tabla 6. Actividad de lipasas de los extractos humano y veterinarios determinada por APIZYM

	Esterasa	Esterasa lipasa	Lipasa
Humana	3	4	1
Extracto 1	2	4	0

Extracto 2	1	3	1
Extracto 3	3	4	1

Finalmente, la Tabla 7 resume la actividad de la glucosidasa. Esta actividad fue evidente en todos los extractos, los cuales dieron positivo para todos los tipos de enzimas analizados. No se hallaron diferencias relevantes entre los extractos humano y veterinarios, excepto por la β -galactosidasa y la α -glucuronidasa, que presentaron un nivel de APIZYM de 5 en todos los extractos veterinarios en comparación con el extracto humano (nivel 4).

Tabla 7. Actividad de la glucosidasas de extractos humano y veterinarios determinada por APIZYM

	α - gal.	β - gal.	α - glucur.	α - glucos.	β - glucos.	N-acetil- β - glucosam.	α - manos.	α - fucos.
Humana	4	4	4	4	4	3	4	4
Extracto 1	4	5	5	4	4	3	4	3
Extracto 2	4	5	5	5	5	2	4	4
Extracto 3	4	5	5	4	4	3	4	4

Por tanto, en general, se puede decir que hay algunas diferencias entre los extractos humano y veterinarios con respecto a la actividad enzimática. Este resultado se explica con la pérdida de algunos tipos de proteínas, muchas de las cuales probablemente con actividad enzimática, en los extractos veterinarios durante el proceso de diálisis. Por otra parte, los tres extractos veterinarios presentaron perfiles muy similares de actividad enzimática, lo que demuestra la estabilidad elevada del producto.

Además del sistema APIZYM, se evaluó la actividad de la quitinasa de los extractos con un equipo de análisis de quitinasa (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. El equipo se basa en la hidrólisis enzimática de los sustratos de quitinasa que liberan *p*-nitrofenol que se puede cuantificar a un pH básico a 405 nm. El equipo proporciona tres sustratos diferentes para la detección de diversos tipos de actividad quitinolítica. Se prepararon las muestras a una concentración de 5 mg/ml para la prueba. En la Tabla 8 se muestra la actividad de la quitinasa para cada muestra y para cada sustrato hidrolizado.

Tabla 8. Actividad de la quitinasa de los extractos humano y veterinarios para tres sustratos diferentes (n = 2)

	Sustrato 1 (1 mg/ml)		Sustrato 2 (0,2 mg/ml)		Sustrato 3 (1 mg/ml)	
	mU/mg ext.	mU/mg prot.	mU/mg ext	mU/mg prot.	mU/mg ext	mU/mg prot.
Humana	20,6±3,1	89,0±13,3	10,7±0,0	46,3±0,0	11,2±7,2	48,3±31,2
Extracto						
1	44,3±6,7	92,7±14,1	11,5±0,7	24,1±1,4	18,9±11,2	39,5±23,4
Extracto						
2	57,6±9,7	142,9±24,1	11,7±0,9	28,9±2,3	21,7±13,0	53,9±32,2
Extracto						
3	48,8±9,2	104,7±19,7	12,8±2,3	27,5±5,0	20,8±11,9	44,6±25,5

Sustrato 1: N-acetil-β-D-glucosaminida de 4-Nitrofenilo; Sustrato 2: N,N'-diacetil-β-D-quitolbiosa de 4-Nitrofenilo; Sustrato 3: β-D-N,N', N''-triacetilquitotriosa de 4-Nitrofenilo.

Con respecto a los sustratos 1 y 3, no hubo diferencias significativas en mU/mg de proteínas de la actividad de la quitinasa entre los extractos. Para el sustrato 3, se observó una desviación estándar considerable entre los análisis, probablemente debido a los diferentes tiempos de incubación. El sustrato 2, que es adecuado para la detección de la actividad de la exoquitinasa, fue mayor en el extracto humano en comparación con los extractos veterinarios. De modo que a pesar del hecho de que Der f 15 y Der f 18 se han descrito como quitinasas, no se detectó un aumento en la actividad de quitinasa en los extractos veterinarios.

Identificación de alérgenos (secuenciación con espectrometría de masas)

Para confirmar la presencia de los alérgenos principales de perro Der f 15 y Der f 18 en los tres extractos veterinarios, se quitaron las bandas de proteínas con el peso molecular esperado de 109/96 kDa (Der f 15) y 60 kDa (Der f 18) de un gel de SDS teñido con Coomassie y se envió a la Unidad de Proteómica del CSIC («Centro Nacional de Biotecnología», Madrid, España). Se digirieron las proteínas con tripsina y se secuenciaron los péptidos obtenidos con espectrometría de masas y se compararon con las bases de datos con MASCOT.

En la Figura 6, se obtuvieron secuencias de Der f 15 (SEQ ID NO. 1) y Der f 18 (SEQ ID NO. 2) con péptidos emparejados tal como se muestra subrayado, así como el porcentaje de cobertura de secuencia para cada extracto veterinario.

Cuantificación relativa de alérgenos

Para demostrar que se logra un aumento en los alérgenos principales de perro Der f 15 y Der f 18 en los extractos veterinarios, se desarrolló una nueva metodología para la cuantificación relativa de proteínas con proteómica selectiva (LC-MS/MS). Este estudio se llevó a cabo en la Unidad de Proteómica de «Parc Científic de Barcelona» (Barcelona, España).

Con este fin, se seleccionó el extracto humano como norma y el Extracto 2 veterinario como muestra de consulta. Se digirieron ambas muestras con tripsina y se analizó la solución peptídica obtenida con análisis con nanoUPLC y espectrometría de masas, de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. Se hizo una búsqueda de los archivos de datos en bruto obtenidos contra la base de datos de *D. farinae* de Uniprot. Se seleccionaron tres péptidos de Der f 15 y dos de Der f 18 (Tabla 9) que demostraron ser estables en el transcurso de las series y no presentaron problemas con la detectabilidad, la degradación ni la ionización menos que óptima, para los análisis de cuantificación. Se calcularon las áreas de los picos de cada péptido obtenido en tres análisis diferentes y se usaron para el análisis estadístico.

Tabla 9. Características de los péptidos adquiridos para los análisis de cuantificación

Alérgeno	Secuencia	m/z	Tiempo de inicio	Tiempo de finalización	de SEQ NO.	ID
Der f 15	FDGLDLWEYPSGR	835,38	41	47		3
Der f 15	VDPYTIEDIDPFK	776,38	41	47		4
Der f 15	IWVGYYDLASISCK	813,89	37	43		5
Der f 18	TVHHCANHLQAFDEVSR	505,99	18	24		6
Der f 18	GDFGLEK	383,19	20	26		7

Para Der f 15, hubo un aumento significativo de 2,97 veces, es decir x 2,97, en el Extracto 2 veterinario en comparación con el extracto humano, mientras que para Der f 18 hubo un múltiplo de variación significativo de 0,24, es decir, x 0,24, en el Extracto 2 en comparación con el extracto humano.

Estos resultados confirman que los extractos veterinarios contienen un contenido elevado del alérgeno Der f 15 en comparación con un extracto humano de *D. farinae*.

Inmunotransferencia

Se analizaron 10 µg de proteínas de cada extracto con inmunotransferencia con una mezcla de sueros (diluida 1/5) de perros sensibilizados a este ácaro (Figura 7). El resultado de la inmunotransferencia confirmó la modificación en el perfil proteico de reconocimiento entre los extractos humano y veterinarios y destacó la estabilidad entre los tres extractos.

ELISA directo

Se analizaron todos los extractos con ELISA directo (se usaron 8 µg de proteínas de cada extracto/ml para recubrir la placa) con la misma mezcla de sueros. Se halló un nivel mayor específico de IgE para los tres extractos veterinarios en comparación con el extracto humano (Figura 8), que muestra mayor afinidad de la mezcla de sueros de perros con dermatitis atópica para los extractos veterinarios.

Resumen

Los resultados principales obtenidos de la producción y caracterización de los tres extractos estables de *D. farinae* son los siguientes:

- El proceso de ultrafiltración optimizado con 50k de membranas Pellicon® y presión elevada permitieron la obtención de tres extractos de *D. farinae* con una mayor estabilidad tal como se demuestra mediante diferentes procedimientos analíticos;
- Los extractos veterinarios tuvieron menor producción en el proceso de elaboración pero mayor contenido de proteínas con respecto al extracto humano;
- Los tres extractos presentaron un perfil proteico modificado con respecto al extracto humano, con una mayor proporción de proteínas con peso molecular elevado y una disminución significativa en los alérgenos principales en humanos, tal como se demostró con electroforesis, cromatografía por exclusión de tamaño y cuantificación de los alérgenos principales en humanos;
- Con respecto a otras características de los extractos, tal como el contenido de hidratos de carbono y endotoxinas, no se hallaron diferencias relevantes entre los extractos humano y veterinarios. Hubo pequeñas diferencias en algunas actividades enzimáticas entre los extractos humano y veterinarios pero con respecto

a la actividad de la quitinasa, no hubo aumento en esta actividad enzimática en los extractos veterinarios;

- Se identificaron los alérgenos principales para perros Der f 15 y Der f 18 en todos los extractos mediante espectrometría de masas. Adicionalmente, se optimizó una nueva metodología que no se había usado antes para la caracterización de los extractos, para la cuantificación relativa de proteínas mediante proteómica selectiva. Esta técnica ha permitido la demostración con uno de los extractos veterinarios de que Der f 15 aumentó significativamente en esta muestra con respecto al extracto humano;
- Desde un punto de vista inmunitario, una mezcla de sueros de perros sensibilizados a este ácaro presentaron un nivel mayor de IgE específica para los tres extractos veterinarios en comparación con el extracto humano natural.

Normalización del extracto veterinario de *Dermatophagoides*

1.1 Estudio *in vivo*

Se usó un extracto veterinario 4, preparado de la misma manera que los extractos veterinarios 1 a 3 que anteceden, para preparar una solución para análisis intradérmico en perros sensibilizados a *D. farinae*. Con este fin, se preparó una solución del extracto a una concentración de 1 mg/ml en SSFA (solución salina fenolada con albúmina), se mantuvo con agitación durante 2 horas y se filtró con filtros de 0,22 µm. Junto con el extracto veterinario 4, se evaluó a perros con clorhidrato de histamina 0,05 mg/ml (testigo positivo) y SSFA como testigo negativo.

- Animales incluidos en este estudio:

Catorce perros de entre 1 y 6 años, con un diagnóstico clínico de dermatitis atópica y que presentaban IgE específica contra *D. farinae* > 1000 unidades de absorbancia en ELISA (EAU, por su sigla en inglés) (análisis ELISA de Greer Laboratories). Se excluyó a los perros con las siguientes características: perros tratados con corticoides, ciclosporina A, compuestos inmunosupresores; perros tratados con inmunoterapia; perros que padecieran infecciones bacterianas, víricas o parasitarias, inmunodeficiencia o enfermedades inmunopatológicas.

Se tomó una muestra de 5 ml de suero de cada animal para análisis *in vitro*.

- Procedimiento de análisis intradérmico:

Se inyectaron de forma intradérmica 50 µl de solución del extracto a 1 mg/ml o los testigos por duplicado en la zona torácica de los animales, a los cuales se los afeitó previamente. Luego de 15 minutos de la inyección, se extrajo la roncha producida y se transfirió a un papel.

- Análisis del tamaño de la roncha:

Se midió el área de las ronchas con el software PC Draft (Microspot). Se consideró positivo el tamaño de las ronchas si su área fue $\geq 7 \text{ mm}^2$.

Resultados:

Todos los animales dieron positivo para el extracto veterinario 4 con un tamaño de roncha medio de $115,3 \pm 66,8 \text{ mm}^2$.

1.2 Estudio *in vitro*

- Caracterización de las muestras de suero

Se analizó la IgE específica de cada muestra de suero mediante ELISA directo (se describió anteriormente la metodología) contra el extracto veterinario 4 y el extracto humano usado anteriormente. Todas las muestras de suero presentaron valores de IgE específica significativamente mayores para el extracto veterinario 4 con respecto al extracto humano de *D. farinae* (Figura 9).

- Potencia biológica

Se usaron todas las muestras de suero para preparar una mezcla para llevar a cabo la normalización *in vitro* mediante el análisis de potencia ELISA. En la Tabla 10 se muestra la cantidad de extracto veterinario 4 (µg) necesaria para obtener una inhibición del 50 % de la mezcla de sueros de 5 análisis diferentes.

Tabla 10: Cantidad de extracto veterinario 4 (µg) necesaria para obtener 50 % de inhibición de la mezcla de sueros de perros de 5 análisis diferentes

Análisis	Inhibición 50 % (µg)
1	0,063
2	0,069
3	0,053

4	0,061
5	0,065

El valor medio obtenido para la inhibición de 50 % fue de $0,062 \pm 0,006$ μg . Se muestra un ejemplo de las curvas obtenidas en este análisis en la Figura 10. Se calculó la inhibición al 50 % para un lote diferente de extracto veterinario, preparado tal como se describe anteriormente (extracto 5). El valor obtenido fue de 0,066 μg . Este resultado demuestra la estabilidad de los diferentes lotes de extracto veterinario en cuanto a la potencia biológica (actividad alergénica total de IgE).

Comparación de la potencia biológica del extracto veterinario con respecto al extracto humano

Se usó el análisis de potencia ELISA descrito anteriormente para analizar la potencia del extracto veterinario 4 con respecto al extracto humano. En la Figura 11 se muestran las curvas obtenidas en este análisis.

La cantidad de extracto humano necesario para alcanzar la inhibición de 50 % de una mezcla de sueros de perros atópicos (seleccionada de la misma forma que se describe en «Normalización del extracto veterinario de *Dermatophagoides farinae*») fue 0,132 μg , que representa un aumento de 2,13 veces con respecto al extracto veterinario 4 (0,062 μg), que demuestra que el extracto veterinario 4 es aproximadamente dos veces más potente que el extracto humano en cuanto a potencia biológica.

Análisis densitométrico e inmunotransferencia para la estimación del contenido de Der f 15 y Der f 18

El análisis de perfiles proteicos y alergénicos por densitometría se puede usar como enfoque para la estimación de la cantidad de alérgenos en los extractos. Por esta razón, se analizó la intensidad de banda de los alérgenos Der f 15 y Der f 18 en los perfiles alergénicos obtenidos con la mezcla de sueros descrita en «Comparación de la potencia biológica del extracto veterinario con respecto al extracto humano». Se analizaron las imágenes correspondientes a los experimentos de inmunotransferencia de diferentes extractos veterinarios y el extracto humano de *D. farinae* con el software ImageQuant (GE Healthcare). Se analizó el volumen densitométrico de cada banda proteica así como su peso molecular y se comparó en las diferentes muestras.

En la Figura 12 y la Figura 13 se muestran imágenes de inmunotransferencia, analizadas con el software ImageQuant, en las que se muestran las muestras incluidas en el análisis y los alérgenos principales Der f 15 y Der f 18. En la Figura 14 se muestran las bandas identificadas en ambas imágenes con el software ImageQuant. Se muestran los valores obtenidos para los diferentes parámetros analizados y para cada muestra en las Tablas 11 y 12.

Tabla 11. Volumen y peso molecular de cada una de las bandas identificadas en la imagen de la Figura 12. Las bandas que corresponden a los alérgenos Der f 15 (número 1 y 2) y Der f 18 (banda número 4) se marcan en negrita.

Pauta de peso molecular de intervalo bajo			Extracto veterinario 4		
Banda n.º	Volumen	Peso molecular (kd)	Banda n.º	Volumen	Peso molecular (kd)
1	35464,00	97,000	1	60734,00	107,333
2	66797,00	66,000	2	72716,00	89,380
3	102555,00	45,000	3	67529,00	71,826
4	85339,00	30,000	4	47267,00	52,652
5	113878,00	20,100	5	75616,00	46,802
6	83895,00	14,400	6	40241,00	43,250
			7	32036,00	40,907
			8	25668,00	36,294
			9	31293,00	30,239
			10	13244,00	25,916
			11	29311,00	21,362
Extracto humano			Extracto veterinario 2		
1	23348,00	102,167	1	66548,00	97,000
2	35043,00	85,642	2	80296,00	81,989
3	21474,00	68,799	3	70923,00	64,694
4	19169,00	52,037	4	38508,00	50,392
5	29530,00	42,957	5	35159,00	41,785
6	26585,00	36,013	6	15831,00	39,739
7	22801,00	30,000	7	24475,00	34,902
8	25769,00	16,947	8	16082,00	29,764
9	17174,00	15,653	9	10006,00	24,973

10	14627,00	20,929
----	----------	--------

Tabla 12. Volumen y peso molecular de cada una de las bandas identificadas en la imagen de la Figura 13. Las bandas que corresponden a los alérgenos Der f 15 (número 1 y 2) y Der f 18 (banda número 4) se marcan en negrita.

Pauta de peso molecular de intervalo bajo			Extracto veterinario 5		
Banda n.º	Volumen	Peso molecular (kd)	Banda n.º	Volumen	Peso molecular (kd)
1	6752,00	97,000	1	57421,00	114,222
2	25467,00	66,000	2	79715,00	97,000
3	49473,00	45,000	3	76210,00	76,755
4	42837,00	30,000	4	64094,00	56,191
5	50551,00	20,100	5	69077,00	47,490
6	65968,00	14,400	6	40960,00	40,819
			7	41925,00	35,647
			8	35178,00	29,203
			9	24296,00	24,721
			10	62490,00	20,924
			11	13603,00	16,275
			12	11024,00	14,647
Extracto veterinario 4			Extracto humano		
Banda n.º	Volumen	Peso molecular (kd)	Banda n.º	Volumen	Peso molecular (kd)
1	48830,00	114,222	1	24884,00	112,500
2	60622,00	97,000	2	26198,00	95,090
3	54418,00	75,075	3	17742,00	75,075
4	45967,00	56,191	4	18943,00	54,551
5	50336,00	46,622	5	23501,00	43,060
6	24598,00	40,819	6	38645,00	35,324
7	27402,00	35,004	7	48094,00	29,203
8	24494,00	29,466	8	6976,00	20,756
9	12378,00	24,721	9	38710,00	15,893
10	26333,00	20,924	10	22113,00	14,264
			11	14696,00	12,364

Las bandas número 1 y 2 de las tablas 11 y 12 corresponden al alérgeno Der f 15 en todas las muestras mientras que Der f 18 corresponde a la banda número 4. Las Tablas 13 y 14 resumen la información correspondiente al volumen (intensidad) de estos alérgenos y el múltiplo de aumento con respecto al extracto humano:

Tabla 13. Volumen de Der f 15 y Der f 18 y múltiplo de aumento (entre paréntesis) con respecto al extracto humano (Figura 12).

Alérgeno	Extracto humano	Extracto veterinario 4	Extracto veterinario 2
Der f 15	58391	133450 (2,3)	146844 (2,5)
Der f 18	16169	47267 (2,5)	38508 (2,4)

Tabla 14. Volumen de Der f 15 y Der f 18 y múltiplo de aumento (entre paréntesis) con respecto al extracto humano (Figura 13).

Alérgeno	Extracto humano	Extracto veterinario 5	Extracto veterinario 4
Der f 15	51082	109452 (2,2)	137136 (2,7)
Der f 18	18943	45967 (2,3)	64094 (3,4)

Con el volumen de intensidad que indica el reconocimiento de los alérgenos Der f 15 y Der f 18 se presentó un aumento elevado en los extractos veterinarios (entre un aumento de 2,2 y 3,4 veces, es decir, un aumento de entre $\times 2,2$ y $\times 3,4$) con respecto al extracto humano. Con estos resultados se sustenta el aumento en la cantidad de estos alérgenos en el extracto veterinario con respecto al extracto humano de *D. farinae*.

Extracto veterinario para tratar la alergia de otros mamíferos: gatos

Para evaluar si el extracto veterinario se puede usar para tratar las alergias de mamíferos que no sean perros, se analizó el perfil de sensibilización de gatos sensibilizados a *D. farinae*.

Se incluyeron siete animales (1-7) que dieron positivo para *D. farinae* (EAU > 150; análisis ELISA de Greer Laboratories) y dos testigos negativos (C1, C2) (EAU < 150) en el estudio.

En la Figura 15 se muestra el perfil alergénico de los diferentes animales incluidos en el estudio. Todos los animales que dieron positivo (números 1-7) tuvieron reconocimiento de bandas con pesos moleculares de 14 a más de 100 kDa en el extracto veterinario 4 y/o el extracto humano, mientras que los testigos negativos (C1, C2) no presentaron ninguna banda de reconocimiento.

Se hallaron dos perfiles alergénicos principales entre los animales que dieron positivo con claras diferencias en el peso molecular de las bandas reconocidas. Dos animales tuvieron reconocimiento de bandas de peso molecular escaso mientras que varios animales tuvieron reconocimiento de la mayoría de las proteínas con más de 40 kDa. El gato número 2 tuvo un reconocimiento principalmente de una banda de 20 kDa y el gato número 7 tuvo un reconocimiento de bandas de 30 y 14 kDa, que podrían corresponder a los alérgenos principales humanos Der f 1 y Der f 2. Por el contrario, los gatos número 1, 3, 4 y 6 tuvieron

reconocimiento principalmente de proteínas de más de 40 kDa, incluso los alérgenos principales de perros Der f 15 y Der f 18. Finalmente, el gato número 5 tuvo un reconocimiento de proteínas de mayor y menor peso molecular.

De acuerdo con esta información, esos gatos que tuvieron un perfil alergénico de bandas mayor que 40 kDa e incluso los alérgenos Der f 15 y Der f 18, podrían tratarse con el extracto alérgeno veterinario de ácaro.

Análisis celular *in-vitro*

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad del extracto veterinario 2 de *Dermatophagoides farinae* y el extracto humano de *Dermatophagoides farinae* para la inducción de la producción de citocinas en los leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC, por su sigla en inglés) de perros atópicos y no atópicos.

1.1. Metodología

Se obtuvieron sobrenadantes de cultivo de PBMC de cuatro perros atópicos y tres testigos saludables. Los cuatro perros atópicos presentaron una anamnesis de dermatitis atópica y un nivel de IgE específica contra *D. farinae* > 1000 EAU (análisis ELISA de Greer Laboratories). Se excluyó a los perros con las siguientes características: perros tratados con corticoides, ciclosporina A y compuestos inmunosupresores; perros tratados con inmunoterapia; perros que padecieran infecciones bacterianas, víricas o parasitarias, inmunodeficiencia o enfermedades inmunopatológicas. Los tres perros sanos no presentaron ningún síntoma clínico y tuvieron un nivel de IgE específica contra *D. farinae* < 150 EAU.

Se cuantificó el contenido de citocina en los sobrenadantes con el equipo para perros Milliplex® Mag con ELISA (Millipore), que se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se estimularon PBMC ($2,5 \times 10^6$ células por pocillo) de donantes (cuatro atópicos y tres testigos no atópicos) por triplicado con el extracto humano o el extracto veterinario 2 (40 µg de proteínas/ml), y la producción de IFN-γ e IL-10 se cuantificó por duplicado en los sobrenadantes de cultivo luego de 24 y 48 horas de incubación a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 %. Se usó el medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma–Aldrich) como testigo negativo y se usaron Concanavalina A (Con A, 3 µg/ml) y LPS (lipopolisacáridos, 3 µg/ml) como testigos positivos.

Para la cuantificación de citocinas, se ajustaron datos normales a una curva logística de cinco parámetros y se llevó a cabo el análisis estadístico de U Mann-Whitney. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

1.2. Resultados

Con los estudios celulares se demostró una inducción similar de IFN- γ e IL-10 con los extractos humano y veterinarios en perros atópicos y testigos (Figura 16). Luego de 24 horas, los extractos humano y veterinarios indujeron un nivel significativamente mayor de IL-10 que el testigo negativo (mediana (IQ) de 1170 [559-1502] pg/ml para el extracto humano y 1748 [1122-1998] pg/ml para el extracto veterinario). El IFN- γ luego de 48 horas de incubación también fue significativamente mayor que en el testigo negativo en células de perros atópicos tratados con los extractos humano (52,1 [15-113,2] pg/ml) y veterinarios (50,4 [20-76,3] pg/ml).

Los resultados de testigos positivos (ConA y LPS) fueron en todos los casos significativamente mayores que el testigo negativo ($p < 0,05$), de lo cual no se muestran datos.

También se compararon perros atópicos y no atópicos. Se observaron niveles mayores de ambas citocinas en perros no atópicos con los extractos humano y veterinarios con respecto a los perros atópicos.

Una inmunoterapia exitosa contra alérgenos debe estar acompañada de la inducción de linfocitos T reguladores (Treg) y del cambio de la respuesta de Th2 a la respuesta de Th1. Además, el éxito de la inmunoterapia se ha relacionado con la capacidad de las vacunas de alérgenos de estimular específicamente la producción de IL-10 e IFN- γ , que se encuentran implicados en las respuestas de los Treg y Th1, respectivamente, y una disminución de IL-4. Se demuestra con este estudio la capacidad que tienen los extractos humano y veterinarios de *D. farinae* de inducir la producción de IL-10 e IFN- γ en PBMC de perros sensibilizados a este ácaro, lo cual indica una inducción de las respuestas de los Th1 y Treg y, por lo tanto, una respuesta inmunitaria beneficiosa que podría conducir a la tolerancia.

Dado que los perros incluidos en este estudio no fueron tratados anteriormente con inmunoterapia, es normal que no se observe, de momento, una modificación en la capacidad de Th1 de los perros tratados con el extracto veterinario en comparación con aquellos tratados con el extracto humano. Sin embargo, el aumento de IL-10 demuestra que el extracto veterinario tiene la capacidad de volver a establecer el equilibrio de Th1-Th2. Se espera que el nivel de IFN- γ en perros tratados con el extracto veterinario aumente significativamente en comparación con perros tratados con el extracto humano luego de tratamiento con inmunoterapia.

Los animales no atópicos se encuentran en una situación inmunitaria en la cual existe un correcto equilibrio entre las respuestas de Th2/Th1 y, por lo tanto, el perfil de producción de citocinas es también diferente. Por tanto, el nivel más elevado de IL-10 e IFN- γ en perros no atópicos se observó debido a que, en un estado inicial, producen más de estas citocinas reguladoras que los perros atópicos y luego de la estimulación con los extractos humano y veterinarios de *D. farinae* la producción aumenta aún más.