

PROTEÍNA HÍBRIDA PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALERGIA INDUCIDA POR ÁCAROS DOMÉSTICOS

CAMPO TÉCNICO

El presente desarrollo está relacionado con el campo de la biotecnología, particularmente con proteínas híbridas derivadas de ácaros, composiciones y métodos relacionados, y más particularmente con proteínas híbridas, composiciones y métodos relacionados para diagnosticar alergias inducidas por ácaros domésticos.

ANTECEDENTES

En las últimas décadas, se ha evidenciado un aumento en la prevalencia de enfermedades alérgicas en diferentes regiones alrededor del mundo, lo que tiene un impacto significativo en la calidad de vida de las personas afectadas, así como en la economía de sus respectivos países.

Entre las fuentes más comunes de alérgenos ambientales se encuentran los ácaros domésticos, tales como las especies *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides pteronyssinus*, las cuales se encuentran principalmente en regiones tropicales y subtropicales (Caraballo L, Valenta R, Puerta L, *et al.* 2020. The allergenic activity and clinical impact of individual IgE-antibody binding molecules from indoor allergen sources. World Allergy Organization Journal; 13:100118). El manejo de alergias producidas por ácaros domésticos incluye el tratamiento basado en inmunoterapia con extractos alérgicos (mezcla compleja de diferentes proteínas incluidas varias con capacidad alérgica) de estas dos especies en combinación o por separado. Estos extractos también se usan actualmente para un diagnóstico basado en pruebas serológicas o en pruebas cutáneas. Sin embargo, existe una gran variabilidad en los resultados generados con estos extractos, principalmente porque su composición varía dependiendo del método utilizado para su obtención, la fuente a partir de la cual se deriva el extracto y la solubilidad de las proteínas responsables de generar la reacción alérgica.

Una de las alternativas planteadas para superar estos problemas es la producción y utilización de alérgenos recombinantes purificados, incluyendo proteínas quiméricas purificadas, las cuales pueden ser empleadas para detectar individuos susceptibles a desarrollar alergias, así como para desarrollar formulaciones farmacéuticas para inmunoterapia de las alergias más eficaces. Un ejemplo de esto se encuentra en el documento US9163069, el cual divulga moléculas de ADN recombinantes que codifican proteínas de fusión generadas a partir de fragmentos de diferentes alérgenos derivados de *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus*, tales como Der p 1, Der p 2, Der p 7, Der p 8, Blo t 5, Blo t 8, Blo t 12, Blo t 18, Blo t 12 y Blo t 13.

Un método para el diagnóstico de las alergias es el denominado “diagnóstico resuelto por componentes” (en inglés *Component-Resolved Diagnosis (CRD)*), el cual puede mejorar la sensibilidad del diagnóstico serológico y proporcionar información más detallada sobre el estado clínico de los pacientes. En este método, se usan alérgenos purificados recombinantes para definir el perfil de sensibilización e identificar la sensibilización real de la inducida por alérgenos de reactividad cruzada. No obstante, este tipo de pruebas serológicas que usan extractos de alérgenos completos presentan limitaciones para identificar los componentes realmente comprometidos en la inducción de la respuesta alérgica. Se ha observado que la apropiada identificación de estos alérgenos aumenta las probabilidades de éxito de la inmunoterapia de las enfermedades alérgicas.

Un punto interesante que puede impactar positivamente los costos y eficacia de las metodologías para diagnóstico serológico basado en alérgenos recombinantes es limitar el número de moléculas o alérgenos necesarios para lograr diferenciar la población alérgica de la no alérgica en términos personalizados, de acuerdo al patrón de sensibilización de cada paciente. De otra parte, las características estructurales de cada alérgeno y la representación en estos de los diferentes epítomos que interactúan con los anticuerpos desempeñan un papel importante en estas nuevas metodologías.

Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar alérgenos recombinantes derivados de ácaros que permitan reemplazar los extractos alérgicos completos utilizados actualmente para el

diagnóstico de alergias con el fin de mejorar la especificidad y reducir sus efectos adversos asociados con el uso de los extractos.

BREVE DESCRIPCIÓN

El presente desarrollo corresponde a una proteína híbrida derivada de ácaros que comprende:
a) una proteína Blo t 5 de *B. tropicalis*; y b) una proteína Der p 2 de *D. pteronyssinus*.

En un aspecto adicional, el desarrollo hace referencia a una molécula de ácidos nucleicos que codifica la proteína híbrida derivada de ácaros, así como a un vector de expresión que comprende dicha molécula de ácidos nucleicos.

En otro aspecto, el presente desarrollo comprende una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína híbrida derivada de ácaros, o el vector de expresión que porta dicha molécula de ácido nucleico.

En un aspecto adicional, el desarrollo hace referencia a un método para producir la proteína híbrida aquí descrita, en donde dicho método comprende (a) proporcionar una célula hospedadora recombinante que comprende el vector que expresa dicha proteína híbrida o el ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican dicha proteína híbrida; (b) cultivar la célula hospedadora en un medio de cultivo en condiciones que permitan la expresión de la proteína híbrida; y (c) obtener la proteína híbrida a partir de dicha célula hospedadora.

En otro aspecto, el presente desarrollo está dirigido a una composición farmacéutica que comprende la proteína híbrida derivada de ácaros aquí referida y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, el presente desarrollo corresponde a una combinación farmacéutica que comprende la proteína híbrida derivada de ácaros aquí referida y al menos un ingrediente activo adicional.

En otro aspecto, el presente desarrollo corresponde al uso de la proteína híbrida derivada de ácaros, o la composición o la combinación farmacéutica que la comprenden para el diagnóstico de alergias producidas por *B. tropicalis* o *D. pteronyssinus*.

En un aspecto adicional, el presente desarrollo corresponde a un método para diagnosticar alergias asociadas por *B. tropicalis* o *D. pteronyssinus* en un individuo o a partir de la muestra obtenida de un individuo, mediante el uso de la proteína híbrida aquí descrita.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Representación esquemática del inserto que codifica la proteína híbrida recombinante BP-2 (A) y del vector de expresión pET-45b (+) con el inserto codificador de la proteína híbrida flanqueado por los sitios de restricción KpnI y PmII (B).

FIG. 2 Expresión y purificación de la proteína híbrida BP-2. (A) Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostrando expresión en *Escherichia coli* BL21(DE3). MW: marcador de peso molecular pre-teñido (Ref. 26614, Thermo Fisher), IPTG (-): lisado bacteriano no inducción con IPTG; IPTG (+) 3h/4h, lisado bacteriano inducido por 3 horas y 4 horas, respectivamente. B) Proteína purificada mediante columna de níquel (Ni-NTA), 1: Fracción No unida; 2: Fracción de lavado; E: Fracción purificada. La flecha indica la proteína BP-2.

FIG. 3 Prueba epicutánea realizada con extractos alergénicos y la proteína híbrida BP-2. Panel 1: Histamina; Panel 2: Extracto de *B. tropicalis*; Panel 3: Extracto de *Dermatophagoides farinae*; Panel 4: Extracto de *D. pteronyssinus*; Panel 5: Epitelio de perro; Panel 6: Epitelio de gato; Panel 7: Mezcla de gramíneas; Panel 8: *Aspergillus fumigatus*; Panel 9: *Periplaneta americana*; Panel 10: Proteína híbrida BP-2; Panel 11: Proteína PF3a; Panel 12: Control negativo (Glicerol).

FIG. 4 Análisis ROC de resultados de la prueba de ELISA IgE con la proteína híbrida BP-2 en comparación con la prueba cutánea con extracto de acaro doméstico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Para propósitos de interpretar los términos usados a lo largo del presente documento se debe tener en cuenta su significado usual en el campo técnico, a menos que se incorpore una definición particular o el contexto indique claramente lo contrario. Adicionalmente, los términos utilizados en forma singular también incluirán la forma plural.

Proteínas híbridas derivadas de alergenitos de ácaros

En un aspecto, la presente invención está dirigida a proteínas híbridas derivadas de alergenitos de ácaros. Para efectos de la presente invención, el término “*proteína*” o “*polipéptido*” hace referencia a una molécula compuesta por una secuencia de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Una “*proteína híbrida*” corresponde a una molécula compuesta por dos o más proteínas diferentes o fragmentos de proteínas diferentes. Una “*proteína híbrida recombinante*” corresponde a una proteína híbrida codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende dos o más genes, en donde dicha molécula de ácido nucleico se obtiene a partir de metodologías de ADN recombinante.

En el contexto de la presente divulgación, un “alergeno” corresponde a un compuesto que es reconocido por el sistema inmune de un organismo como un elemento foráneo que consecuentemente induce una respuesta inmune, en donde dicha respuesta está caracterizada por la producción de IgE. En el contexto del presente desarrollo, el término “alergeno” hace referencia a proteínas o fragmentos de proteínas, especialmente aquellas proteínas derivadas de ácaros.

En algunas modalidades del desarrollo, los alergenitos derivados de ácaros que componen la proteína híbrida corresponden a alergenitos derivados de *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus*. En modalidades particulares, la proteína híbrida comprende los alergenitos Blo t 5 de *B. tropicalis* y Der p 2 de *D. pteronyssinus*. En modalidades aún más particulares, la proteína Blo t 5 presente en la proteína híbrida tiene una secuencia de aminoácidos con un porcentaje de

identidad del 80%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100% frente a la SEQ ID NO: 1. En otras modalidades particulares, la proteína Der p 2 tiene una secuencia de aminoácidos con un porcentaje de identidad del 80%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100% frente a la SEQ ID NO: 2. En otras modalidades, la proteína híbrida derivada de ácaros del presente desarrollo comprende una proteína Blo t 5 de *B. tropicalis* de SEQ ID NO: 1; y una proteína Der p 2 de *D. pteronyssinus* de SEQ ID NO: 2. En modalidades particulares, la proteína híbrida del presente desarrollo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos y nucleótidos

Descripción	SEQ ID NO.	Secuencia
Secuencia de aminoácidos de la proteína Blo t 5	1	MKFAIVLIACFAASVLAQEHKPKKDDF RNEFDHLLIEQANHAIEKGEHQLLYLQH QLDELNENKSKELQEKKIIRELDVVCAMI EGAQGALERELKRTDLNILERFNYYEEAQ TLSKILLKDLKETEQQVKDIQTQ
Secuencia de aminoácidos de la proteína Der p 2	2	DQVDVKDCANHEIKKVLVPGCHGSEPC IIHRGKPFQLEAVFEANQNSKTAKIEIKA SIDGLEVDVPGIDPNACHYMKCPLVKG QQYDIKYTNVVPKIAPKSENVVVTVKVL LGDNGVLACA IATHAKIRD
Secuencia de aminoácidos de la proteína híbrida BP-2	3	MKFAIVLIACFAASVLAQEHKPKKDDF RNEFDHLLIEQANHAIEKGEHQLLYLQH QLDELNENKSKELQEKKIIRELDVVCAMI EGAQGALERELKRTDLNILERFNYYEEAQ TLSKILLKDLKETEQQVKDIQTQDQVDV KDCANHEIKKVLVPGCHGSEPCIIHRGK PFQLEAVFEANQNSKTAKIEIKASIDGLE VDVPGIDPNACHYMKCPLVKGQQYDIK YTNVVPKIAPKSENVVVTVKVLGDNG VLACAIATHAKIRD

Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Blo t 5	4	ATGAAGTTCGCCATCGTTCTTATTGCC TGCTTTGCCGCTTCGGTTTTGGCTCAA GAGCACAAGCCAAAGAAGGATGATTT CCGAAACGAATTCGATCACTTGTTGAT CGAACAGGCAAACCATGCTATCGAAA AGGGAGAACATCAATTGCTTTACTTG CAACACCAACTCGACGAATTGAATGA AAACAAGAGCAAGGAATTGCAAGAG AAAATCATTTCGAGAACTTGATGTTGTT TGCGCCATGATCGAAGGAGCCCAAGG AGCTTTGGAACGTGAATTGAAGCGAA CTGATCTTAACATTTTGGAACGATTCA ACTACGAAGAGGCTCAAACCTCTCAGC AAGATCTTGCTTAAGGATTTGAAGGA AACCGAACAAAAAGTGAAGGATATTC AAACCCAA
Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Der p 2	5	GATCAAGTCGATGTCAAAGATTGTGC CAATCATGAAATCAAAAAAGTTTTGG TACCAGGATGCCATGGTTCAGAACCA TGTATCATTTCATCGTGGTAAACCATTC CAATTGGAAGCCGTTTTCGAAGCCAA CCAAAACCTCAAAAACCGCTAAAATTG AAATCAAAGCTTCAATCGATGGTTTA GAAGTTGATGTTCCCGGTATCGATCCA AATGCATGCCATTATATGAAATGTCC ATTGGTTAAAGGACAACAATATGATA TTAAATATACATGGAATGTTCCAAAA ATTGCACCAAAATCTGAAAATGTTGT CGTCACTGTCAAAGTTTTGGGTGATAA TGGTGTTTTGGCCTGTGCTATTGCTAC TCATGCTAAAATCCGCGATTAA

Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína híbrida BP-2	6	ATGAAATTCGCTATTGTGCTGATCGCC TGCTTCGCTGCTAGTGTGCTGGCTCAA GAACATAAACCGAAAAAAGACGACTT CCGTAATGAATTTGATCACCTGCTGAT TGAACAAGCGAACCATGCCATCGAAA AAGGCGAACACCAGCTGCTGTATCTG CAGCATCAACTGGATGAACTGAACGA AAACAAAAGCAAAGAACTGCAGGAA AAAATTATCCGTGAACTGGACGTGGT TTGCGCAATGATCGAAGGCGCACAGG GTGCTCTGGAACGTGAACTGAAACGC ACCGATCTGAACATTCTGGAACGCTTC AATTACGAAGAAGCGCAAACGCTGAG TAAAATCCTGCTGAAAGATCTGAAAG AAACCGAACAGAAAGTTAAAGACATT CAGACGCAAGATCAGGTCGACGTGAA AGATTGTGCGAACCACGAAATCAAAA AAGTTCTGGTCCCGGGTTGCCACGGTT CCGAACCGTGTATTATCCATCGTGGA AACCGTTTCAACTGGAAGCGGTGTTC GAAGCCAACCAGAACAGCAAAACCGC AAAAATCGAAATCAAAGCTTCTATTG ACGGCCTGGAAGTGGATGTTCCGGGT ATCGACCCGAATGCGTGCCATTATAT GAAATGTCCGCTGGTTAAGGGTCAGC AATACGATATCAAATACACCTGGAAC GTCCCGAAAATCGCCCCGAAAAGCGA AAATGTCGTGGTTACGGTCAAAGTGC TGGGCGATAATGGTGTGCTGGCTTGT GCTATTGCTACGCATGCTAAAATCCGT GACTAA
---	----------	--

En algunas modalidades, los polipéptidos que conforman las proteínas híbridas recombinantes están conectadas directamente en sus extremos C-terminal y N-terminal. En otras modalidades, dichas proteínas están unidas por medio de enlazadores conformados por 1 a 20 aminoácidos.

En algunas modalidades, las proteínas híbridas recombinantes comprenden además fragmentos de proteínas que facilitan su expresión, secreción, purificación y/o detección, también conocidas como “*etiquetas*”, las cuales pueden ser escindidas de la proteína híbrida mediante lisis química o enzimática. Las etiquetas que se pueden utilizar para las proteínas híbridas recombinantes aquí descritas se seleccionan de manera no limitativa entre β -galactosidasa, glutatión S-transferasa (GST), luciferasa, polihistidina, proteína verde fluorescente (GFP), ribonucleasa S, tioredoxina, o combinaciones de las mismas.

Ácidos nucleicos, vectores de expresión y células hospedadoras

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a moléculas de ácidos nucleicos que codifican las proteínas híbridas recombinantes aquí descritas. Los ácidos nucleicos contemplados en esta divulgación incluyen moléculas monocatenarias y/o bicatenarias seleccionadas entre ADN, ADNc, ARN o combinaciones de los mismos. Además de la secuencia que codifica cada proteína, estos ácidos nucleicos pueden estar ligados o unidos operativamente a elementos para el control de su expresión, tales como promotores, potenciadores y/o terminadores.

Tal como entenderá la persona versada en la materia, debido a la degeneración del código genético, existen una gran variedad de posibles secuencias de nucleótidos que codifican una proteína particular. En este sentido, la presente divulgación abarca cualquier molécula de ácido nucleico que codifique las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos que conforman la proteína híbrida recombinante.

En modalidades particulares, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Blo t 5 presente en la proteína híbrida tiene un porcentaje de identidad del 80%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100% frente a la SEQ ID NO: 4. En otras modalidades particulares, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Der p 2 presente en la proteína híbrida tiene un porcentaje de identidad del 80%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100% frente a la SEQ ID NO: 5. En otras modalidades, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína híbrida recombinante tiene un porcentaje de identidad del 80%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100% frente a la SEQ ID NO: 6 (Tabla 1).

En modalidades particulares, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína híbrida recombinante comprende además una secuencia que codifica una etiqueta. En modalidades particulares, dicha secuencia que codifica una etiqueta corresponde a una secuencia que codifica una etiqueta de histidina.

Los ácidos nucleicos de la presente divulgación se pueden obtener mediante síntesis química o métodos basados en la tecnología del ADN recombinante. Cualquiera de los métodos de síntesis de ácidos nucleicos conocidos en el campo técnico puede ser utilizado por la persona versada en la materia para generar las secuencias de nucleótidos aquí descritas.

Otro aspecto de la presente divulgación contempla vectores de expresión recombinantes que contienen los elementos necesarios para expresar las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos y proteínas híbridas aquí referidas. Dichos vectores de expresión se seleccionan de manera no limitativa entre vectores virales, plásmidos, cósmidos, fagémidos, cromosomas artificiales de levadura (YAC), cromosomas artificiales de bacterias (BAC), entre otros.

Un aspecto adicional de la divulgación contempla las células hospedadoras que permiten la producción de los polipéptidos y proteínas híbridas aquí descritas. En particular, los ácidos nucleicos de la presente divulgación, o los vectores de expresión que los comprenden, pueden ser introducidos en dichas células hospedadoras mediante métodos de ADN recombinante conocidos en el campo técnico (Sambrook, *et al.* 1989. Molecular Cloning: A Laboratory

Manual, segunda edición. Cold Spring Harbor Press) en donde pueden insertarse en el ADN cromosómico del hospedero o mantenerse en forma episomal, en el caso de los vectores de expresión. Las células hospedadoras contempladas en la presente divulgación pueden seleccionarse, por ejemplo, entre células procariotas, tales como bacterias (v.g. *Escherichia coli*); y células eucariotas, tales como levaduras (v.g. *Saccharomices cerevisiae*), células de insecto (v.g. células Sf9) y células de mamífero (v.g. células CHO).

Una vez se obtienen las células hospedadoras recombinantes con los ácidos nucleicos de interés, estas son cultivadas en medios de cultivo apropiados en condiciones ambientales propicias para la expresión de los polipéptidos o proteínas híbridas aquí descritos. Estos polipéptidos o proteínas pueden ser aislados a partir de las células hospedadoras recombinantes o de su medio de cultivo por métodos establecidos en el campo técnico. Así entonces, en un aspecto adicional, el presente desarrollo contempla un método para producir un polipéptido, proteína o fragmento de los mismos, que comprende cultivar la célula hospedadora recombinante descrita anteriormente en un medio de cultivo en condiciones que permitan la expresión de la proteína híbrida codificada por el ácido nucleico o vector de expresión, según sea el caso; y aislar la proteína híbrida a partir de dicha célula hospedadora o de su medio de cultivo.

Composiciones y combinaciones farmacéuticas

Otro aspecto del presente desarrollo contempla composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas híbridas aquí descritas. Además de las proteínas híbridas, estas composiciones farmacéuticas pueden comprender un “*excipiente farmacéuticamente aceptable*”, el cual corresponde a cualquier material fisiológicamente compatible que permite mantener las propiedades fisicoquímicas y actividad biológica de la proteína híbrida derivada de ácaros aquí referida. De forma no limitativa, los posibles excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen disolventes, medios de dispersión, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes isotónicos, agentes reguladores y amortiguadores de pH, agentes estabilizadores, espesantes, lubricantes y colorantes, entre otros. Las composiciones farmacéuticas que comprenden excipientes farmacéuticamente aceptables pueden formularse

empleando métodos convencionales conocidos en el campo técnico (Gerbino, P.P. 2005. Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Vigésimoprimera edición. Mack Publishing, EUA). En modalidades particulares, el excipiente farmacéuticamente aceptable presente en la composición farmacéutica corresponde a glicerol.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica que comprende la proteína híbrida derivada de ácaros de la presente divulgación corresponde a una composición líquida.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende una concentración entre 5 y 50 microgramos de la proteína híbrida derivada de ácaros.

En otro aspecto, el presente desarrollo hace referencia a una combinación farmacéutica que comprende la proteína híbrida derivada de ácaros. Para efectos de la presente divulgación, el término “*combinación farmacéutica*” hace referencia a una composición que comprende la proteína híbrida aquí descrita y un ingrediente activo adicional. En modalidades particulares, el ingrediente activo adicional corresponde a una proteína recombinante.

En algunas modalidades, tanto la proteína híbrida como el ingrediente activo adicional de las combinaciones farmacéuticas se proporcionan en una sola forma de dosificación o entidad única. En otras modalidades, la proteína híbrida y el ingrediente activo adicional se proporcionan de manera separada, esto es, en donde cada uno de estos elementos se proporciona en más de una unidad.

En algunas modalidades, la composición o combinación farmacéutica de la presente divulgación se formula para ser compatible con su ruta de administración. De manera no limitativa, la composición o combinación farmacéutica aquí referida puede ser administrada por vía intradérmica o subcutánea.

Usos médicos y métodos diagnósticos

Un aspecto adicional del presente desarrollo corresponde al uso de la proteína híbrida derivada de ácaros, o la composición farmacéutica que la contiene, para el diagnóstico de alergias producidas por *B. tropicalis* o *D. pteronyssinus*.

En modalidades particulares, la proteína híbrida derivada de ácaros, o la composición o combinación farmacéutica que la contenga, puede ser utilizada para la preparación de un producto para el diagnóstico o tratamiento de alergias. En modalidades más particulares, dichas alergias corresponden a alergias producidas por ácaros, tales como *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus*.

En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un método para diagnosticar alergias asociadas por *B. tropicalis* o *D. pteronyssinus*. En algunas modalidades, este método de diagnóstico se realiza en condiciones *in vitro* a partir de una muestra biológica. En modalidades particulares, el método de diagnóstico *in vitro* comprende las siguientes etapas: a) poner en contacto la muestra biológica con la proteína híbrida derivada de ácaros aquí referida, o la composición o combinación farmacéutica que la contienen; b) adicionar un anticuerpo marcado con una etiqueta; c) adicionar un sustrato de detección e incubar; y d) detectar la señal generada.

En algunas modalidades, la muestra biológica utilizada en el método de diagnóstico *in vitro* descrito anteriormente se selecciona de manera no limitativa entre una muestra de sangre, suero o plasma de un individuo.

En algunas modalidades, el anticuerpo empleado en el método *in vitro* para diagnosticar alergias aquí referido corresponde a un anticuerpo anti-IgE.

La etiqueta unida al anticuerpo utilizado en el método de diagnóstico *in vitro* de la presente divulgación puede seleccionarse de manera no limitativa entre fluoróforos como fluoresceína y rodamina; radionúclidos como azufre-35, fluor-18, y iodo-131; enzimas como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, β -galactosidasa y luciferasa; y grupos prostéticos como estreptavidina, avidina y biotina; entre otros. Métodos para realizar el

marcaje o etiquetado de anticuerpos pueden encontrarse en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.* 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición. Cold Spring Harbor Press).

La selección del sustrato de detección empleado en el método *in vitro* de diagnóstico aquí referido depende de la naturaleza de la etiqueta unida al anticuerpo. En modalidades particulares, dicho sustrato de cuantificación se selecciona de forma no limitativa entre 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), o-fenilenediamina (OPD), 2,2'-azino-di[3-etil-benzotiazolin] sulfonato (ABTS), luminol, polifenoles, ésteres de acridina, luciferina o una combinación de los mismos.

En algunas modalidades, la incubación de la etapa c) se realiza a una temperatura entre 20 °C y 35 °C. En modalidades particulares, la incubación se realiza a una temperatura entre 20 °C y 30 °C, 22 °C y 35 °C, 22 °C y 30 °C, 24 °C y 35 °C, 24 °C y 30 °C o 24 °C y 28 °C.

En algunas modalidades, la incubación de la etapa c) se realiza durante 5 a 20 minutos. En modalidades particulares, la incubación de la etapa c) tiene una duración entre 2 y 20 minutos, 1 y 15 minutos, 2 y 15 minutos, 2 y 10 minutos o 2 y 5 minutos.

En algunas modalidades, la detección de la señal generada en la etapa d) se realiza mediante espectrofotometría, fluorometría, colorimetría o cualquier metodología apropiada conocida en el campo técnico.

En una modalidad particular del desarrollo, la detección se puede realizar a partir de un volumen de muestra entre 1 y 100 microlitros. En otra modalidad particular, la muestra puede ser diluida en un factor de 10, 50 o 100 para facilitar el diagnóstico. En modalidades particulares, el diluyente empleado para diluir la muestra se selecciona de manera no limitativa entre solución salina, agua purificada y tampón de fosfato.

En algunas modalidades, el método para diagnosticar alergias asociadas con *B. tropicalis* o *D. pteronyssinus* se realiza *in vivo* con un individuo. En modalidades particulares, dicho

método de diagnóstico *in vivo* comprende a) administrar la proteína híbrida derivada de ácaros del presente desarrollo, o la composición o combinación farmacéutica aquí referida, a un individuo; y b) medir el tamaño y magnitud del endurecimiento (“pápula”) y del eritema generado en el sitio de la administración.

En algunas modalidades, el individuo corresponde a un mamífero. En modalidades particulares, el individuo corresponde a un humano.

En algunas modalidades, la administración de la etapa a) del método de diagnóstico *in vivo* aquí referido se realiza por vía epicutánea.

En algunas modalidades, en el método de diagnóstico *in vivo* la proteína híbrida derivada de ácaros, composición o combinación farmacéutica que la contiene es administrada en el antebrazo o la espalda del individuo.

En algunas modalidades, el tamaño y la magnitud del endurecimiento y del eritema generado en el método de diagnóstico *in vivo* se mide entre 10 y 20 minutos luego de la administración de la proteína híbrida derivada de ácaros, composición o combinación farmacéutica aquí referida. Un endurecimiento o pápula con un tamaño mayor de 3 mm con respecto al control negativo indica que el individuo es alérgico, mientras que un endurecimiento con un tamaño menor a 3 mm con respecto al control negativo indica que el individuo no es alérgico a los alérgenos que componen la proteína híbrida utilizada en el método.

EJEMPLOS

El desarrollo tecnológico se presenta en detalle a través de los siguientes ejemplos, los cuales son suministrados solamente con propósitos ilustrativos y no con el objetivo de limitar su alcance.

Ejemplo 1. Producción de la proteína híbrida recombinante BP-2

Construcción del inserto y vector para expresión de la proteína híbrida

Las secuencias correspondientes a los genes codificadores de Blo t 5 (SEQ ID NO: 4) y Der p 2 (SEQ ID NO: 5), alérgenos de *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides petronyssinus*, respectivamente, se manipularon *in silico* para mantener la orientación de izquierda a derecha Blo t 5 seguido de Der p 2 (Figura 1A). La secuencia resultante se diseñó para ser insertada dentro de la secuencia del vector pET 45b+ de tal manera que en el vector resultante (pET 45b+/BP-2) la secuencia insertada estuviera en marco de lectura abierto para expresión de BP-2 con el codón de iniciación incluyendo la etiqueta HISx6 presente en el vector y teniendo el inserto flanqueado en un extremo por la enzima de restricción KpnI y en el otro extremo por la enzima de restricción PmII. El vector así diseñado se ordenó a la compañía GenScript (Figura 1B).

Transformación de células competentes *E. coli* BL21 (DE3)

El vector de expresión pET 45B+/BP-2 fue transferido a células de *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen, Cat. No. C6010- 03) mediante choque térmico. Brevemente, 10 ng del vector se mezclaron e incubaron con las células competentes por 30 minutos en hielo, seguido por 30 segundos a 42°C y posterior enfriamiento en hielo. A la mezcla anterior se le agregaron 250 µL de medio S.O.C. compuesto por 2% triptona, 0,5% extracto de levadura 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ y 20 mM glucosa y se incubó a 37 °C y 250 rpm por 30 minutos. Luego se realizó siembra homogénea del cultivo en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con ampicilina (100 mg/mL), el cual fue incubado a 37°C durante la noche.

Las clonas positivas se seleccionaron previa confirmación del inserto esperado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando los cebadores universales T7 Promoter (5'-TAATACGACTCACTATA-3') y T7 Terminator (5'-TAGTTATTGGTCAGGGGTGG-3'). Para la PCR se preparó una mezcla de reacción así:

ADN plantilla (colonia)	2 µl
dNTPs (50mM)	1 µl

Cebador " <i>T7 terminator</i> " (10 pmol)	1 µl
Cebador " <i>T7 promoter</i> " (10 pmol)	1 µl
Solución amortiguadora para PCR 10X	5 µl
T _{aq} Polimerasa 5 U/µl	1 µl
Agua desionizada. c.s.p.	50 µl

El programa de la amplificación consistió de 30 ciclos de tres etapas así: 1) 94°C por un minuto, 2) 50 C por 1 minuto y 3) 72 °C por 2 minutos, con una extensión final de 7 minutos a 72°C. La reacción se realizó en un termociclador S-1000 (BioRad). El producto de la amplificación se analizó mediante electroforesis en agarosa al 2% en equipo Mini Sub™ DNA Cell (BioRad) a 50 voltios. Las clonas positivas se conservaron a -70 °C en glicerol al 8%.

Expresión y purificación de BP-2

La proteína híbrida BP-2 unida a la etiqueta de seis residuos de histidina (6xHis-tag) se obtuvo mediante inducción con IPTG (isopropil-3-D-tiogalactósido). Una sola colonia aislada de un cultivo de clona positiva incubada en plato LBA se sembró en medio LBA líquido e incubó a 37 °C y 250 rpm durante 12 a 14 horas. Luego, el cultivo se diluyó en LBA líquido (dilución 1:20) y se incubó durante 5 horas en iguales condiciones hasta alcanzar una OD (densidad óptica) entre 0,5 – 0,8, momento en que se añadió IPTG (Sigma-Aldrich Cat: I6758) durante 6 horas a 37 °C. Se tomaron muestras a 0, 2, 4 y 6 horas para seleccionar el tiempo óptimo de expresión. Luego, el cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 6000 rpm y se recuperó el botón celular. Para esto, se siguió procedimiento estándar descrito en el Manual de Sambrook (Sambrook & Russel. 2006. The Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSHL Press) con modificaciones.

Brevemente, las células fueron resuspendidas inicialmente en una solución buffer de lisis nativo (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 500 mM, pH 8,0) y las células se lisaron por sonicación en tandas de 15 segundos cada uno y con intervalos de 1 minuto (Sonic Dismembrator, Fisher Scientific, FB-705). La suspensión se centrifugó a 6500 rpm durante 15 minutos y el botón

de células como el sobrenadante obtenido se analizaron por SDS-PAGE. La proteína BP-2 se encontró en el botón de células en cuerpos de inclusión. Para solubilizar los cuerpos de inclusión, el botón de células se trató con buffer de lisis (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM y urea 8 M, pH 8,0) y dejó en agitación a 20 rpm durante dos horas a temperatura ambiente (TA). Posteriormente las células se lisaron por sonicación en 5 tandas de 15 segundos cada uno y con intervalos de 1 minuto en hielo y con amplitud de 50% a 60%. La mezcla se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE) se verificó la eficiencia de proceso.

La purificación se realizó usando resina de agarosa Ni-NTA siguiendo el protocolo con modificaciones. (Catálogo K950-01, Carlsbad, CA, USA). Ocho mililitros del sobrenadante del sonificado se mezclaron con la resina Ni-NTA (Agarose, Qiagen, 1018244) previamente preparada y equilibrada con buffer de lisis, pH 6,0 y se dejó en agitación a 20 rpm durante dos horas. La mezcla se centrifugó a entre 1200 y 1600 rpm durante un minuto y se separó el sobrenadante que contenía la fracción no unida a la resina. Se realizaron varios lavados de la resina con solución amortiguadora de NaH_2PO_4 20 mM, urea 8 M y NaCl 500 mM a pH 8,0, 6,0 y 5,3. La proteína híbrida se recuperó aplicando solución amortiguadora de elución (NaH_2PO_4 20 mM, urea 8 M y NaCl 500 mM a pH 4,0) a la columna. La presencia de la banda de interés en las fracciones recolectadas se analizó mediante electroforesis en poliacrilamida 15% en condiciones de reducción. Para eliminar la urea e inducir la renaturalización de las proteínas, se realizó renaturalización oxidativa asistida con arginina.

En resumen; las fracciones obtenidas y diluidas luego de la purificación se dializaron en bolsas de diálisis con punto de corte de 6-8000 kDa, en solución de renaturalización (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM, L-Arginina 0,5 M, Cisteína 5 mM y Cistina 1 mM) en la relación 1:20, bajo agitación suave y constante durante la noche a 4°C. Luego se dializaron contra solución amortiguadora de Tris-HCl 10 mM, Tritón X-100 0,1 % durante cuatro horas con un recambio a las dos horas, a las mismas condiciones. Los productos de la renaturalización se analizaron mediante electroforesis en poliacrilamida 15% en condiciones de reducción usando el equipo de Mini-PROTEAN® Electrophoresis System - Bio-Rad

(Figura 2) y se guardaron a -20 °C hasta su uso. La concentración de las proteínas se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Ejemplo 2. Prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA) con la proteína híbrida recombinante BP-2

La capacidad de unión a los anticuerpos IgE en sueros humanos, se demostró mediante técnica de ELISA siguiendo procedimiento estandarizado en nuestro laboratorio. Se usaron placas de microtitulación (Immulon-4 Dynatech, Chantilly, VA, USA) y ensayos por duplicado. La proteína BP-2 se preparó a concentración de 0,5 µg/100 µL y los extractos de ácaros a 5 µg/100 µL en buffer carbonato/bicarbonato 0,2 M a pH 9,2. De esta dilución se agregaron 100 µL a cada pozo de la placa de microtitulación y se incubaron durante la noche a TA. Luego de 4 lavados con PBS-Tween 20 al 0,1% (PBS-T), se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con 200 µL buffer de bloqueo (PBS-T/BSA 1% con azida de sodio 0,02% durante 3 horas a TA. Después de lavados con PBS-T, cada pozo se incubó a TA con 100 µL de suero diluido 1:5. Luego de cuatro lavados las placas se incubaron por 2 horas a TA con el segundo anticuerpo anti-IgE humana (Anti-Human IgE - Alkaline Phosphatase antibody produced in goat - Sigma A3525) diluida 1:500 en buffer de conjugado (Tris 0.05 M/BSA 1%/ MgCl₂ 1 mM, pH 8,0). Después del lavado, se procedió al revelado agregando 100 µL de la solución 1 mg/mL de p-nitrofenil fosfato (Sigma, 2640) diluida en 10% de dietanolamina, pH 9,8, durante 30 minutos a TA. La reacción se detuvo con 100 µl de NaOH 3N. Las placas se leyeron a 405 nm en un espectrofotómetro (Spectra MAX 250, Molecular Device Sunnyvale, CA, USA).

Ejemplo 3. Prueba epicutánea con la proteína híbrida BP-2

Una pequeña gota de varios alergenos y de la proteína híbrida BP-2, todos en solución de glicerol se colocaron en la piel del antebrazo del paciente, previa limpieza de la zona. También se aplicó en otros sitios del antebrazo histamina como control positivo, glicerol como control negativo, y otros alergenos para comparación, incluida la proteína PF3a referida en US9163069. Después de hacer un leve raspado en cada gota con una lanceta con punta

no mayor de 1 milímetro (administración epicutánea) se esperaron 15 minutos, luego de los cuales se retiraron las gotas de alergenos y controles y con una regla se midieron los diámetros tanto las pápulas como de los eritemas. Una pápula y eritema con diámetro mayor de 3 mm con respecto al control negativo indicó que el individuo es alérgico, mientras que una pápula menor a 3 mm indicó que el individuo no es alérgico a los alergenos utilizados. En la Figura 3 se muestra el resultado de la prueba epicutánea (también conocida como *Skin Prick Test*) en un paciente con asma alérgica.

Ejemplo 4. Evaluación de la utilidad diagnostica de la proteína BP-2 mediante curvas ROC

La utilidad de la proteína híbrida BP-2 en el diagnóstico de alergias se determinó mediante la prueba ROC (en inglés *Receiver Operating Characteristic*) usando datos de valores de IgE obtenidos en pruebas serológicas de ELISA y comparándolos con resultados obtenidos en pruebas intradérmica con extracto completo de ácaros como referente estándar. La sensibilidad y especificidad de los niveles séricos de IgE para la proteína recombinante BP-2 fueron de 71,0 y 94 %, respectivamente, con un AUC de 0,82 (intervalo de confianza del 95%: 0,74 a 0,89) (Figura 4). Esto sugiere que la proteína híbrida BP-2 es un producto útil para diferenciar la población alérgica a los ácaros domésticos de la no alérgica.