

**CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS  
INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MÉDICAS  
DE LA HABANA**

**DESARROLLO  
A CICLO COMPLETO DE LAS PRIMERAS  
VACUNAS ESTANDARIZADAS  
DE ALERGENOS DE ÁCAROS  
PARA LA INMUNOTERAPIA  
DEL ASMA EN CUBA**

**Tesis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias de la Salud**

**Autor: MSc Alexis Labrada Rosado  
Tutor: DrC Gustavo Sierra González**

La Habana 2008

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mis compañeros del Laboratorio de Alergenos de BIOCEN que tomaron parte directamente en este trabajo: Arelis Más, Bárbara Fernández, Bárbara Luis, Bárbara Navarro, Benito Espinosa, Dámaris Torralba, Elisa Facenda, Keiko Uyema, Marco A. Coca, Mayelín Montesino, Mayrel Labrada, Maytee Mateo, Migdalis Pérez. Minerva Sewer, Niurka Martínez, Noelvys Lorenzo, Olga Jorge, Rafael Ferrándiz, Raisa Quintero, Raúl L. Castro, Raysi Morales, Rosa E. Aranda, Rosario Diéguez, Rosaura Casas, Wendy Ramírez, Yamiris Hernández, Yunia Oliva.

A otros compañeros de BIOCEN, del vivario, laboratorios de control de calidad, plantas de producción y dpto. de informática que también participaron en trabajos experimentales y de desarrollo: Aymée Pérez, Ernesto Guerra, Eylon Macías, Gisela Noriega, Ivette Novoa, José Díaz, Juan Carlos Pérez, Laudelina Lazo, Leonela Huergo, Roland Expósito, Tatiana Morales, Virgilio Bourg, Yoel Perea.

A los médicos de los Servicios de Alergia de los Hospitales “Calixto García”, “Juan M. Márquez”, “Joaquín Albarrán” y Policlínico “Fonseca Amador” por su participación decisiva en los ensayos clínicos: Anselmo Abdo, Dania Fabrè, Catalina Irragorri, Irene Enríquez, Iris García, Jorge L Artiles, José Rodríguez Canosa, Magalys Olivares, Mayda González, Mercedes Ronquillo, Mirta Álvarez, Rafaela Andina, Rosa M Naranjo, Victor White, Yadir Fuentes; y a otros que también colaboraron en estudios clínicos y obtención de sueros de pacientes alérgicos: Olimpio Rodríguez y Sonia Garriga.

A los compañeros del Centro de Toxicología Experimental de CENPALAB que realizaron los estudios de Toxicidad por dosis repetidas: Bárbara González, Dasha Fuentes, Liset Aldana, Yana González, Ana Margarita Bada.

A Sten Dreborg (Suecia) por su asesoramiento durante la ejecución del Proyecto Cuba-Suecia, la gestión de dicho proyecto y la revisión del documento.

A Leonardo Puerta y Luis Caraballo de Cartagena, Colombia, por su participación y colaboración en los estudios con alergen recombinantes de *Blomia tropicalis*. A Naomi Cuervo por su colaboración en la identificación y aislamiento de ácaros y apoyo sistemático.

A los cros. del sistema de Aseguramiento de Calidad de BIOCEN que colaboraron en diferentes aspectos del proyecto: Albertina Estrada, Isabel Rojas, Dania Hernández, Joel Iglesias, Vivian San Germán, Joel Pérez, Yurián Reyes, Odalys Espinosa, Dennis Reynoso, Teresa Símil, Ofelia Castillo.

A. Ada del Castillo, J' del Grupo Nacional de Alergia por su apoyo incondicional a este proyecto y a Ilonka Estruch, del Hospital “Hermanos Ameijeiras” y Roberto Águila, Presidente de la Sociedad Cubana de Alergia, por su aliento y apoyo.

A. Elisa Aznar y Yamilet Díaz, por su colaboración en la gestión del Registro de los productos y a Grisel Pérez por su ayuda y colaboración permanente.

A los compañeros que desde puestos de dirección o funciones técnicas específicas contribuyeron a que este trabajo alcanzara los resultados esperados: Alberto Agraz, Claudio Rodríguez, Julio C. Portuondo, Gabriel González, Roberto Figueroa, Marisely González, Alejandro Silva, Gisel Sánchez, Cristóbal Alfonso, Daniel Ortega, Nilo Álvarez, Beatriz Rivero, Carlos Flores, Humberto Pérez, Milenis Curbelo, Idalmis Alonso, Noel Pereda, Vivian Quesada.

A los expertos del CECMED que evaluaron nuestros estudios clínicos, y datos farmacéuticos e inspeccionaron nuestras producciones: Deybis Orta, Lídice Hernández, Rolando Domínguez.

A los técnicos e ingenieros de mantenimiento que han aportado soluciones a problemas prácticos importantes: Antonio Pérez Penabaz, Luis Galindo, Juan C. Aguilar, Luis Hernández y Ramón Castro.

A Enrique Fernández-Caldas (España/Alemania) por su ayuda en la obtención de la bibliografía más actualizada y su aliento y aval.

A Gustavo Sierra, por su apoyo como tutor que ha requerido de él un esfuerzo extra y por su apoyo sistemático como J' del Grupo de Expertos en Vacunas. A los oponentes de la predefensa: María del Carmen Luzardo y Alina Alerm; y de la defensa: Verena Muzio y Gustavo Bracho por su acertada revisión minuciosa y crítica del documento.

A Irma Castro del CITMA, por su apoyo al frente del Programa Nacional de Vacunas. A Oliver Pérez, Presidente de la Sociedad Cubana de Inmunología por su apoyo y acicate. A Silvia Venero del INHEM por suministrar datos epidemiológicos nacionales y referencias bibliográficas importantes.

A la Asociación de Amistad Cuba-Suecia por proveer una buena parte del financiamiento requerido para estos estudios durante 1997-2001.

A la Dirección de BIOCEN por haberme concedido el tiempo necesario para la preparación de este trabajo de Tesis.

*Dedicado a todos aquellos que nos brindaron inspiración, aliento y fuerzas,  
para perseverar en este proyecto durante 12 años.*

*A mi madre, profesora de biología.*

*...a Anna.*

## SÍNTESIS

Los ácaros domésticos constituyen los alérgenos de mayor preeminencia en el país, causantes de alergias respiratorias y asma. Se describe el desarrollo, a ciclo completo, de tres extractos alérgicos estandarizados de las especies más importantes: *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP), *Dermatophagoides siboney* (DS) y *Blomia tropicalis* (BT), como vacunas terapéuticas para el asma. La estandarización de los productos se apoyó en el desarrollo de inmunoensayos analíticos para la actividad y composición alérgicas, basados en IgE de pacientes alérgicos, y para la determinación de Alérgenos Mayores con anticuerpos monoclonales o policlonales. El proceso de fabricación estandarizado, desarrollado a partir de un método original de cultivo de ácaros, logró altos índices de consistencia. Se demostró la estabilidad de los productos liofilizados durante 60 meses a 4°C. Dos ensayos clínicos por producto para la aplicación diagnóstica, permitieron estandarizar la prueba cutánea con la dosis y límite de corte óptimos, en cuanto a sensibilidad y especificidad. Finalmente, la consistencia de la eficacia y seguridad como vacunas terapéuticas, se demostró mediante un meta-análisis de seis ensayos clínicos de inmunoterapia en asma. El tratamiento fue eficaz en el 76% de los pacientes, y se redujeron los síntomas y la medicación en 60%. No se registraron reacciones sistémicas severas. Los productos fueron Registrados en Cuba para ambas indicaciones, constituyendo los primeros de su tipo en el país, y los primeros en el mundo para DS y BT. La disponibilidad de vacunas alérgicas estandarizadas de alta calidad, a escala industrial, constituye una herramienta útil para el manejo etiológico del asma.

# ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>6</b>
II.1	LA ALERGIA.....	6
II.2	LOS ALERGENOS.....	9
II.3	ENFOQUE ETIOLÓGICO DEL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS: DIAGNÓSTICO E INMUNOTERAPIA.....	13
II.4	MECANISMOS DE LA INMUNOTERAPIA.....	15
II.5	ESTANDARIZACIÓN DE VACUNAS Y EXTRACTOS ALERGÉNICOS.....	16
II.6	ASPECTOS REGULATORIOS.....	18
<b>III.</b>	<b>CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
III.1	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA EVALUACIÓN DE ALERGENOS.....	20
III.1.1	<i>Prueba cutánea y determinación de potencia biológica in-vivo</i> .....	20
III.1.2	<i>ELISA de inhibición de IgE</i> .....	20
III.1.3	<i>Composición de proteínas (SDS-PAGE)</i> .....	22
III.1.4	<i>Composición alergénica (Western Blotting IgE)</i> .....	22
III.1.5	<i>Contenido de proteínas</i> .....	23
III.1.6	<i>Contenido de Alergenos Mayores Der p 1, Der p 2 y Der s 1</i> .....	23
III.1.7	<i>Otros ensayos</i> .....	25
III.2	MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE EXTRACTOS ALERGÉNICOS.....	25
III.2.1	<i>Cultivo de ácaros</i> .....	25
III.2.2	<i>Fabricación de los extractos alergénicos</i> .....	26
III.2.3	<i>Solución diluyente</i> .....	26
III.2.4	<i>Metodología para la introducción a escala industrial y evaluación de la consistencia</i> .....	27
III.3	EXPERIMENTOS PARA DEFINIR MARCADORES DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	28
III.4	DISEÑO DE ESTUDIOS DE ESTABILIDAD.....	29
III.5	DISEÑO DE ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS.....	31
III.6	DISEÑO DE ENSAYOS CLÍNICOS DE DIAGNÓSTICO.....	32
III.7	DISEÑO DE ENSAYOS CLÍNICOS DE INMUNOTERAPIA.....	34
III.8	META-ANÁLISIS DE ENSAYOS CLÍNICOS DE INMUNOTERAPIA.....	38
<b>IV.</b>	<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>40</b>
IV.1	DEFINICIÓN DE LOS COMPONENTES ALERGÉNICOS PRINCIPALES COMO MARCADORES DE LA ACTIVIDAD ALERGÉNICA TOTAL.....	40
IV.1.1	<i>Correlación entre el contenido de alergenos del Grupo 1 y la actividad alergénica total</i> .....	41
IV.1.2	<i>Aporte de Der s 1 a la actividad alergénica total</i> .....	41
IV.1.3	<i>Caracterización de componentes alergénicos de Blomia tropicalis</i> .....	42
IV.1.4	<i>Discusión del sistema de estandarización</i> .....	43
IV.1.5	<i>Elementos de salida</i> .....	45
IV.2	DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS Y REFERENCIAS.....	46
IV.2.1	<i>Desarrollo y validación de ELISA IgE para la potencia alergénica total</i> .....	47
IV.2.2	<i>Desarrollo y validación de Western Blotting IgE para la composición alergénica</i> .....	49
IV.2.3	<i>ELISA para la cuantificación de Der s 1 y Der p 1</i> .....	51
IV.2.4	<i>Creación y caracterización de Referencias Internas</i> .....	52

IV.2.5	<i>Discusión del desarrollo de métodos analíticos y referencias</i> .....	53
IV.2.6	<i>Elementos de salida del desarrollo analítico y de referencias</i> .....	56
IV.3	<b>ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE FABRICACIÓN</b> .....	56
IV.3.1	<i>Estandarización de métodos para el cultivo y propagación de ácaros</i> .....	57
IV.3.2	<i>Estandarización de procesos para la fabricación del extracto alergénico</i> .....	58
IV.3.3	<i>Consistencia del proceso de fabricación en serie</i> .....	60
IV.3.4	<i>Discusión de los resultados de la estandarización del proceso de fabricación</i> .....	61
IV.3.5	<i>Elementos de salida de la estandarización del proceso de fabricación</i> .....	64
IV.4	<b>ESTUDIOS DE ESTABILIDAD</b> .....	64
IV.4.1	<i>Estabilidad de los liofilizados</i> .....	65
IV.4.2	<i>Estabilidad de los productos reconstituidos y las diluciones</i> .....	66
IV.4.3	<i>Discusión de los resultados de estabilidad</i> .....	67
IV.4.4	<i>Elementos de salida de los estudios de estabilidad</i> .....	69
IV.5	<b>ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS</b> .....	70
IV.6	<b>ENSAYOS CLÍNICOS PARA DIAGNÓSTICO POR PRUEBAS CUTÁNEAS</b> .....	71
IV.6.1	<i>Eficacia del diagnóstico en adultos</i> .....	73
IV.6.2	<i>Eficacia del diagnóstico en niños</i> .....	74
IV.6.3	<i>Seguridad del diagnóstico</i> .....	75
IV.6.4	<i>Discusión de los resultados de los ensayos clínicos de diagnóstico</i> .....	75
IV.6.5	<i>Elementos de salida de los ensayos clínicos de diagnóstico</i> .....	79
IV.7	<b>ENSAYOS CLÍNICOS COMO VACUNAS TERAPÉUTICAS</b> .....	79
IV.7.1	<i>Cumplimiento del tratamiento</i> .....	80
IV.7.2	<i>Resultados de las variables de eficacia analizados mediante meta-análisis</i> .....	81
IV.7.3	<i>Magnitud del efecto y correlación entre las variables de eficacia</i> .....	85
IV.7.4	<i>Resultados de las variables de seguridad analizadas mediante meta-análisis</i> .....	85
IV.7.5	<i>Discusión de los resultados de los ensayos clínicos de inmunoterapia</i> .....	86
IV.7.6	<i>Elementos de salida de los ensayos clínicos de inmunoterapia</i> .....	90
IV.8	<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	91
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>98</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>100</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	

## ABREVIATURAS

AcM: Anticuerpo monoclonal.

AcP: Anticuerpo policlonal.

BT: *Blomia tropicalis*.

BPF: Buenas Prácticas de Fabricación.

C50 o C<sub>50</sub>: Concentración de alérgeno que produce 50% de inhibición en el ELISA de Inhibición de IgE.

Ch10 o Ch<sub>10</sub>: Reactividad cutánea individual de cada paciente relativa a la histamina 10 mg/mL.

CECMED: Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos de Cuba.

CGM: Criterio General de Mejoría, variable empleada en los ensayos clínicos de inmunoterapia.

CV: Coeficiente de variación.

CVG: Coeficiente de variación geométrico.

d: Diámetro del habón.

D. : *Dermatophagoides*.

DF: *Dermatophagoides farinae*.

DP: *Dermatophagoides pteronyssinus*.

DS: *Dermatophagoides siboney*.

ECL: Enhanced Chemiluminescence, Quimioluminiscencia amplificada

EA: Eventos Adversos.

EMA: European Medicine Evaluation Agency, Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos.

FDA: Food and Drug Administration, Agencia Federal de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU.

FPE: Flujo Pico Espiratorio.

VFPE: Variabilidad del Flujo Pico Espiratorio.

IC, IC95% o IC<sub>95%</sub>: Intervalos de confianza del 95%.

ICH: Conferencia internacional de armonización de las regulaciones farmacéuticas, siglas en inglés.

IT: Inmunoterapia alérgeno-específica.

MD: Mean Difference, Diferencia de Promedios entre Activo y Placebo, variable empleada en el meta-análisis.

MPA: Materia Prima Alérgica.

OR: Odds Ratio, Razón de Tasas.

P<sub>R</sub> o Pr: Potencia relativa.

RAST: Radio-Allergo-Sorbent Test, Radioinmunoensayo para la determinación de IgE alérgeno-específica.

RC: Reactividad cutánea.

RI: Referencia Interna.

ROC: Receiving Operator Curve.

RR: Risk Ratio, Razón de Riesgo.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato de sodio, siglas en inglés.

SMD: Standardized Mean Difference, Diferencia Estandarizada de Promedios entre Activo y Placebo, variable empleada en el meta-análisis.

UB: Unidades Biológicas.

UI: Unidades Internacionales.

USP: United States Pharmacopeia, Farmacopea de los Estados Unidos.

WB-IgE: Western Blotting con inmunodetección de IgE.

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades alérgicas y en particular el asma, constituyen un problema de salud a escala global por su alta prevalencia y tasa de crecimiento, asociada al estilo de vida de la sociedad moderna, la urbanización y los cambios ambientales; así como, por su creciente impacto socioeconómico. En varios países desarrollados la prevalencia del asma alcanza cerca del 20% de la población y es, incluso, más elevada en los niños. El asma de etiología alérgica aporta la mayor parte. La sensibilización alérgica se ha duplicado en varios países en un término de dos o tres décadas. El enfoque farmacológico convencional para el manejo del asma y las enfermedades alérgicas ha demostrado su ineficacia en términos de política de salud pública, al incrementar considerablemente los costos de atención sin incidir en la prevalencia. Por ejemplo, en EE.UU., el asma es responsable del 12% de los gastos de salud, lo que equivale al 2% de su Producto Interno Bruto. En Cuba, la prevalencia e impacto del asma son similares a los países desarrollados y superiores a la media latinoamericana.

Los alérgenos de ácaros domésticos son los principales agentes etiológicos del asma alérgica y su importancia es aún mayor en las condiciones climáticas del trópico. El papel de los ácaros, como alérgeno dominante en el polvo doméstico, se descubrió en los años 60. En las últimas dos décadas, con la aplicación de la tecnología del ADN recombinante, se han caracterizado hasta 22 proteínas alérgicas (propiedades alérgicas) derivados de varias especies de ácaros y se han identificado las principales, los llamados Alérgenos Mayores, como los responsables de inducir anticuerpos IgE en los pacientes alérgicos, con mayor frecuencia e intensidad. En Cuba se han identificado tres especies de importancia: *Dermatophagoides pteronyssinus*, (la más importante a nivel mundial) *Blomia tropicalis* (propia de zonas tropicales) y *D. siboney* (endémica de Cuba). En estudios realizados durante 1994-1997, que sirvieron de antecedente directo a este trabajo, investigadores de nuestro grupo caracterizaron los componentes alérgicos principales de *D. siboney*. Cerca del 80% de los asmáticos cubanos están sensibilizados a alguna de estas especies.

La inmunoterapia alérgeno-específica (IT) tuvo sus orígenes en 1911. Durante varios decenios fue un tratamiento de base empírica, en el que se empleaban inyecciones de extractos alérgicos con dosis progresivas hasta alcanzar la desensibilización o hiposensibilización del paciente. En la actualidad, a partir del empleo de las técnicas modernas de la inmunología molecular, se ha avanzado considerablemente en el esclarecimiento de los mecanismos de



acción de la IT. Se conoce que la misma modifica la función inmunitaria alérgico-específica, antagonizando con la respuesta alérgica de anticuerpos IgE y células Th2, mediante la inducción de células T reguladoras y anticuerpos IgG4. De ese modo, los preparados alérgicos para IT han merecido la denominación de vacunas terapéuticas.

La eficacia de la IT se ha documentado mejor en los últimos años, en ensayos clínicos controlados. La IT mejora sustancialmente los síntomas clínicos y reduce el consumo de medicamentos antiasmáticos, y su efecto perdura después de discontinuada. Al actuar sobre la memoria inmunológica, tiene el potencial de evitar la progresión de la enfermedad alérgica, en lo cual radica su efecto preventivo. De esa forma, la IT moderna, constituye el principal pilar del enfoque etiológico en el manejo de las enfermedades alérgicas, tornándose en una alternativa promisoriosa a la vía farmacológica que se limita al tratamiento de los síntomas. No obstante, a la IT se le ha achacado falta de consistencia en cuanto a eficacia clínica, asociada, en primer lugar, a una insuficiente estandarización de los extractos alérgicos. También desde el punto de vista de la seguridad del tratamiento, la estandarización de los productos, en términos de actividad o contenido alérgico, es esencial para un control adecuado de la dosis, que permita reducir los riesgos de reacciones adversas de naturaleza alérgica, particularmente de reacciones sistémicas severas.

Los extractos alérgicos son mezclas complejas de proteínas extraídas de fuentes naturales, que se emplean para dos propósitos principales: el diagnóstico o identificación del alérgeno causante (usualmente mediante pruebas cutáneas *in-vivo*) y la IT. Durante decenios los extractos alérgicos fueron preparaciones pobremente definidas, en términos de su composición molecular y sin conocimiento cabal de su actividad biológica. El concepto de estandarización de los productos alérgicos, que comienza a gestarse en los 80, y aún está en desarrollo, ha tenido como principal propósito establecer métodos para la determinación de la actividad biológica de los productos y lograr su consistencia a partir de la caracterización de los componentes alérgicos principales o Alergenos Mayores.

De esa forma, el sistema analítico de estandarización debe, en primer lugar, resolver la cuestión de qué y cómo medir. Se requiere, básicamente, de la definición del concepto de actividad biológica para este tipo de productos; del desarrollo de métodos analíticos y referencias para determinar dicha actividad; y del establecimiento de parámetros nominales y límites de tolerancia. La estandarización de los productos requiere también de la obtención de

materias primas alergénicas definidas y, en general, incluye la estandarización de los procesos de fabricación y la determinación de la estabilidad de los productos. En la actualidad, existen diferentes sistemas de estandarización empleados en diversos países, lo cual no facilita la comparación entre fabricantes y productos homólogos. También subsisten todavía y se emplean en la clínica, un gran número de productos no estandarizados, incluso en nuestro país, donde desde la década del 60 se preparan extractos alergénicos en diferentes servicios de alergia, de forma artesanal.

El proceso de estandarización ha servido de premisa tecnológica para la instauración del Registro de las preparaciones alergénicas como productos biofarmacéuticos, de acuerdo a los estándares de la industria farmacéutica moderna. El Registro, como institución estatal que evalúa y garantiza la calidad, eficacia y seguridad de los medicamentos, sobre la base de evidencias científicas, establece también, para estos productos, estudios preclínicos específicos y ensayos clínicos.

En el presente trabajo nos hemos propuesto el desarrollo a ciclo completo, como productos biofarmacéuticos, de tres vacunas alergénicas de las especies de ácaros domésticos de mayor importancia en el país, dos de ellas (DS y BT), propias de países tropicales. El desarrollo de estos productos requiere, tanto de la investigación con propósitos cognitivos, como de elementos de diseño y desarrollo de procesos. En nuestro trabajo se entrelazan dialécticamente ambos elementos. Así, primeramente, los estudios de caracterización de los componentes alergénicos de DS y BT, son necesarios para establecer marcadores de actividad biológica que sirvan de base para el diseño del sistema de estandarización y el desarrollo de los métodos analíticos necesarios, particularmente, de ensayos inmunoenzimáticos con el empleo de IgE de pacientes alérgicos, o basados en anticuerpos mono y policlonales contra Alergenos Mayores. La validación de los métodos debe demostrar su capacidad para determinar la actividad y composición alergénica de los productos, de acuerdo a lo requerido para el control de la calidad de un producto farmacéutico.

Asimismo, el diseño y desarrollo tecnológico del proceso de fabricación, que parte del método de cultivo y propagación de los ácaros, e incluye procesos de purificación mediante ultrafiltración, y de liofilización, debe cumplir los requerimientos de las Buenas Prácticas de Fabricación. La efectividad de las medidas de estandarización del proceso, se evalúa determinando la consistencia de los parámetros de calidad de los productos, haciendo uso del

sistema analítico desarrollado, que también se emplea en la determinación de la estabilidad de productos finales e intermedios. Finalmente, la seguridad y eficacia de los productos se evalúan en ensayos preclínicos de toxicidad y en ensayos clínicos, primeramente, para su aplicación en el diagnóstico mediante la prueba de punción cutánea, y posteriormente, como vacunas terapéuticas, en seis ensayos clínicos de IT del asma, dos por cada producto. El método estadístico del meta-análisis permite la integración de los resultados clínicos y hace posible juzgar su consistencia.

En general, el trabajo tiene como **hipótesis, que el desarrollo de vacunas de alergenios de ácaros domésticos tropicales, basado en la estandarización de su actividad y composición alergénicas, permite la obtención de resultados consistentes en cuanto a eficacia y seguridad, en el tratamiento del asma alérgica en la población cubana.** En consecuencia, el objetivo general, que es el desarrollo de vacunas alergénicas estandarizadas de los ácaros: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. siboney* y *Blomia tropicalis*, hasta su Registro como productos biofarmacéuticos, se concibe a partir de las tareas de desarrollo esbozadas previamente y de los siguientes **objetivos específicos** de carácter cognoscitivo:

1. Caracterizar los componentes alergénicos principales de los extractos alergénicos y determinar su aporte individual a la actividad alergénica total, como elemento básico para el diseño del sistema analítico de estandarización.
2. Validar los métodos analíticos desarrollados para determinar actividad, composición alergénica y contenido de alergenios individuales, evaluando su capacidad como ensayos de control de calidad.
3. Evaluar la consistencia de los procesos de fabricación desarrollados, incluyendo el cultivo de ácaros, en términos de reducción de la variabilidad biológica natural, a partir del diseño y aplicación de medidas de estandarización y desarrollos tecnológicos específicos.
4. Determinar la estabilidad de la formulación liofilizada y del producto reconstituido.
5. Evaluar la inocuidad de los productos desde el punto de vista toxicológico.
6. Evaluar la eficacia diagnóstica de los productos en la prueba de punción cutánea y seleccionar la dosis óptima.
7. Evaluar la seguridad, eficacia y consistencia clínica de los productos como vacunas terapéuticas para la inmunoterapia del asma.

El **impacto científico-técnico** del trabajo radica primeramente, en los conocimientos

aportados referentes a las propiedades inmunobiológicas de los alérgenos de los ácaros DS y BT; así como, en cuanto a la reactividad alérgica hacia los mismos en nuestra población. Desde el punto de vista tecnológico, se introduce en el país por primera vez la tecnología de producción y evaluación de productos alérgicos industriales. En los casos de DS y BT, se obtienen las primeras vacunas estandarizadas y registradas en el mundo, ya que, al tratarse de ácaros tropicales, no son de interés para los fabricantes de países desarrollados. Se realizan aportes tecnológicos de particular novedad como el método de cultivo de los ácaros, patentado en Cuba. Como aporte metodológico, el proceso integral de desarrollo a ciclo completo de estas vacunas, reviste aspectos de novedad por su aplicación por primera vez fuera de países desarrollados y en el contexto de un complejo científico-industrial con diversas producciones biofarmacéuticas y un sistema de calidad único, como lo es BIOCEN. Esta metodología sería de utilidad para otros productos alérgicos en perspectiva. Los resultados del trabajo han sido publicados en 18 artículos en revistas nacionales e internacionales, a la vez que otros 15 artículos, publicados por el autor, guardan una estrecha relación con los mismos. También han sido expuestos en 16 eventos científicos internacionales y han merecido un Premio de la Academia de Ciencias y un Premio Anual de Salud, en Cuba.

El principal aporte de **valor práctico y social** es la posibilidad de contar en el país, con vacunas alérgicas estandarizadas y registradas para la IT del asma, una enfermedad de alta y creciente prevalencia en Cuba, lo cual hace posible la extensión y generalización de un enfoque etiológico en el manejo de la misma, con potencialidades preventivas. Los productos han sido introducidos en el cuadro básico de medicamentos, sustituyendo crecientemente los preparados artesanales que aún se emplean en los servicios de alergia.

El documento está estructurado en un capítulo de Revisión Bibliográfica, un capítulo de Materiales y Métodos y otro de Resultados y Discusión, este último subdividido en siete acápites correspondientes a cada objetivo y un acápite de discusión general. En los mismos, si bien se abarca el enfoque integral de ciclo completo, se profundiza en mayor grado en aquellos resultados que tienen un mayor impacto en la estandarización de los productos alérgicos y guardan por ello, más relación con la hipótesis. Para ilustrar el proceso de desarrollo a ciclo completo y la interrelación entre sus diferentes fases, se incluye en la Fig. 1, un esquema cronológico, que hace referencia a los acápites del capítulo de Resultados y Discusión.

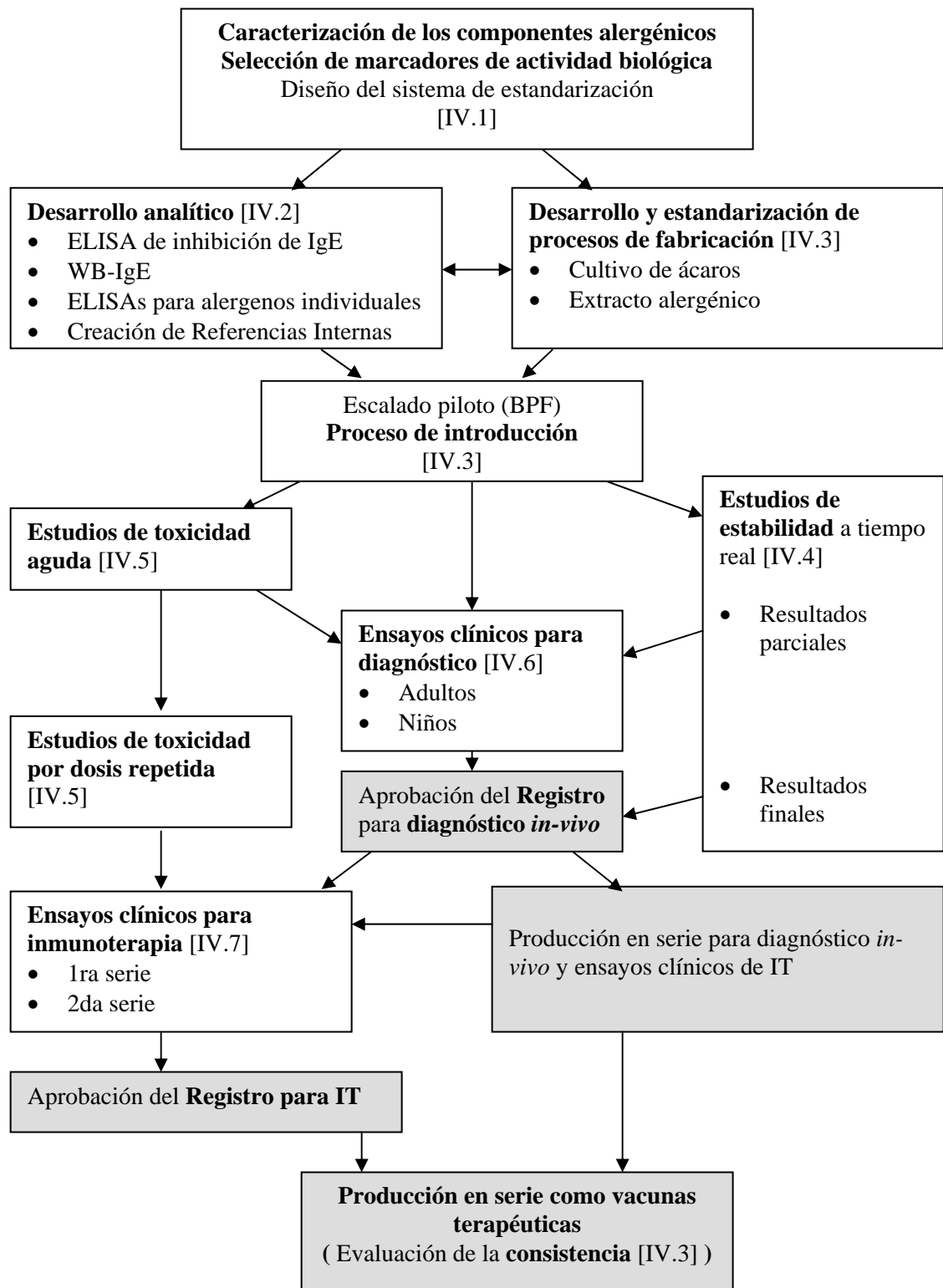


Fig. 1. Esquema en orden cronológico de las etapas del ciclo completo de investigación-desarrollo con referencias a los acápites específicos del capítulo de Resultados y Discusión, indicadas entre corchetes.

## **CAPÍTULO II**

### **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## II. CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### II.1 La alergia

La alergia es una inmunopatología definida por una reactividad alterada del individuo a la estimulación por un antígeno ambiental, ligada a una respuesta exagerada de anticuerpos IgE y células Th2 específicas a ese antígeno, que se define así como alérgeno. Se cree que el mecanismo de hipersensibilidad mediado por IgE/Th2 ha sido, evolutivamente, un mecanismo importante de defensa contra parásitos que, paradójicamente, en la sociedad moderna se ha convertido en causa de una de las enfermedades crónicas más comunes. La sensibilización alérgica consiste en el desarrollo de anticuerpos IgE hacia los alérgenos por individuos atópicos, lo cual ocurre en la temprana infancia, e incluso *in-utero*. La respuesta efectora alérgica de tipo inmediato (hipersensibilidad tipo I) se desarrolla a partir de la degranulación de mastocitos y basófilos y la liberación de histamina y otros mediadores inflamatorios, como consecuencia de la exposición al alérgeno y el entrelazamiento de al menos dos anticuerpos IgE unidos a la membrana de estas células. La reacción alérgica tardía se desarrolla generalmente a partir de la inmediata y en ella intervienen protagónicamente las células Th2, que secretan citocinas pro-inflamatorias como IL-4, IL-5 e IL-13. La inflamación alérgica crónica, característica por ejemplo, del asma, consiste básicamente en una respuesta tardía continuada con aporte importante de los eosinófilos. La respuesta contra los alérgenos en los individuos sanos se distingue por una preponderancia de células T reguladoras (Tr1) que controlan la respuesta Th2/IgE.<sup>1</sup>

La IgE está involucrada en ambos tipos de reacciones alérgicas, interviniendo, en el llamado mecanismo de presentación a células T, facilitada por IgE. Dicha presentación, que ocurre en individuos sensibilizados, la realizan las células dendríticas a través de anticuerpos IgE unidos a su membrana, por medio de su receptor de alta afinidad (FcεRI); o alternativamente, por los linfocitos B actuando como células presentadoras de antígenos, con la ayuda de la IgE unida al receptor CD23. Este mecanismo sería responsable de la amplificación de la respuesta inflamatoria alérgica ante pequeños estímulos alérgicos.<sup>2</sup>

Las enfermedades alérgicas han incrementado considerablemente su prevalencia a nivel mundial y se han convertido en la causa más frecuente de demanda de asistencia médica.<sup>3</sup> Se estima que alrededor del 22 % de la población mundial es alérgica. Entre las enfermedades

alérgicas, el asma es la de mayor morbilidad y mortalidad. Se ha publicado que cerca de 300 millones de pacientes en el mundo son asmáticos, la mitad de ellos en los países subdesarrollados. Aún así, se reconoce que el asma es una enfermedad sub-diagnosticada y por consiguiente sub-tratada.<sup>3</sup> Particularmente en niños, la prevalencia del asma ha crecido a un ritmo del 50% por década, en los últimos 40 años. Se estima que 250 000 personas mueren anualmente por asma.<sup>4</sup> Aproximadamente, 70-80% del asma en niños y 50-60% en adultos es de naturaleza alérgica, y la atopia es el factor de predisposición de mayor influencia para el desarrollo del asma.<sup>5</sup> También, se ha identificado que el crecimiento de la prevalencia del asma está causado, fundamentalmente, por el incremento del asma alérgica, asociada a la progresión de la sensibilización a aeroalergenos, la cual se ha duplicado en los países desarrollados en los últimos 25 años, afectando entre el 20 y el 30 % de la población.<sup>6,7</sup>

La prevalencia del asma en Cuba se ha estimado en 15 % en la población adulta urbana,<sup>8</sup> y de acuerdo a un estudio realizado con el cuestionario internacional ISAAC, pudiera alcanzar más de 17 % en adolescentes.<sup>9</sup> El número de pacientes asmáticos dispensarizados se ha incrementado constantemente, desde 6,02 % de la población en 1998, hasta 8,87 % en el 2006. El asma se considera la tercera causa de ingresos hospitalarios en el país con el 2,8% de los casos.<sup>10,11</sup> El asma y la alergia se incluyeron entre los diez padecimientos más frecuentes referidos por la población en Cuba: 9,2 y 8,7 %, respectivamente, en una encuesta realizada en el 2000.<sup>12</sup> La prevalencia del asma en Cuba es similar a algunos países desarrollados y, aparentemente, algo superior al promedio latinoamericano: 13,4%; de acuerdo a un estudio con la misma metodología ISAAC.<sup>13</sup> En ese informe, los sitios con climas húmedos y cálidos mostraron valores superiores sugiriendo una relación entre ambos factores. La tasa de mortalidad por asma en Cuba, a pesar de haberse reducido en los últimos años, es aún de 1,5 muertes por 100 000 habitantes, valor que se considera muy elevado en el contexto internacional.<sup>4,14,15,16</sup>

Las enfermedades alérgicas representan también una apreciable carga para la salud pública en términos socioeconómicos. Por ejemplo, el impacto del costo del asma en Estados Unidos se calcula en el 2% del Producto Interno Bruto y en el 12 % de los gastos de salud.<sup>17</sup> Los costos de atención a pacientes asmáticos alcanzan entre 300 y 1300 USD al año, en diferentes países desarrollados, incluyendo atención sanitaria y gastos indirectos.<sup>18</sup>

Las causas del incremento de la alergia no han sido completamente comprendidas aún. La



atopia, o sea, la predisposición a desarrollar una respuesta alérgica, es en gran parte hereditaria, sin embargo, el incremento de las enfermedades alérgicas es un fenómeno del último siglo y en tan breve lapso no es posible que se produzcan cambios genéticos importantes a escala poblacional. De modo que podría ser explicado, únicamente, por cambios ambientales y del modo de vida, asociados a la urbanización y al incremento del bienestar.<sup>19, 20, 21</sup> Entre las causas probablemente relacionadas con el crecimiento de la prevalencia del asma, se encuentra el aumento de la exposición a alérgenos de interiores, sobre todo a los ácaros del polvo doméstico, aunque éste aún se considera un tema polémico.<sup>22, 23</sup> Otros factores ambientales como la contaminación con derivados del combustible automotor, pueden también estar ligados al incremento de la sensibilización hacia alérgenos respiratorios.<sup>3</sup>

Además, en la actualidad se discute sobre otras probables causas del crecimiento de las enfermedades alérgicas, vinculadas con la función del sistema inmunológico. Por ejemplo, se ha considerado un posible efecto colateral de la disminución de parásitos en las sociedades desarrolladas que afectaría el repertorio de especificidades de los anticuerpos IgE. Otra idea en boga es la llamada “Teoría de la Higiene” que postula que tanto el incremento de las enfermedades alérgicas como autoinmunes está asociada a la falta de estímulos adecuados para el desarrollo del sistema inmunitario en la temprana infancia.<sup>24, 25</sup> Estos estímulos deberían provenir de agentes infecciosos comunes en el medio ambiente original donde evolucionó el hombre, los cuales habrían sido reducidos en la sociedad moderna mediante el incremento de la higiene ambiental y la aplicación de vacunas anti-infecciosas y antibióticos. Una variante de dicha teoría propone que el sistema inmune innato estaría programado evolutivamente para identificar determinados microorganismos, que han convivido con el hombre desde sus orígenes biológicos (por ejemplo, saprofitos intestinales) y que no son peligrosos o mantienen una relación simbiótica con los humanos. La respuesta inmunológica hacia estos “viejos amigos” está controlada por el sistema inmunitario mediante las células T reguladoras.<sup>26, 27</sup> La falta de exposición a estos microorganismos, asociada al creciente consumo de alimentos procesados, estaría ligada a una maduración deficiente del sistema inmunitario, incapaz de desarrollar una respuesta efectiva de células T reguladoras, provocando, por consiguiente, el desarrollo de alergias hacia antígenos ambientales normalmente inocuos, o sea, hacia los alérgenos.

## II.2 Los alergen

Los alergen

A partir de los años 80, con el surgimiento de la tecnología del ADN recombinante, el número de alergen

El polvo casero había sido ya identificado desde 1922 como una importante fuente de aeroalergen

Se han descrito varias especies de este género: *D. pteronyssinus* (DP), *D. farinae* (DF), y más recientemente *D. siboney* (DS) (Fig. 3); este último identificado en nuestro país y en el Caribe,

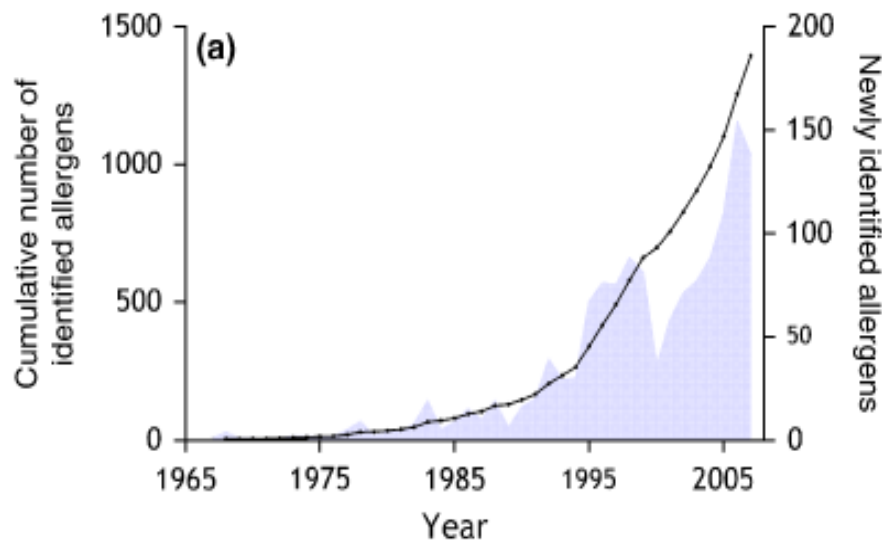


Fig. 2. Tendencia en la identificación de nuevos alérgenos mediante la tecnología del ADN recombinante en los últimos 40 años. Tomado de la base de datos Allergome ([www.allergome.org](http://www.allergome.org)).

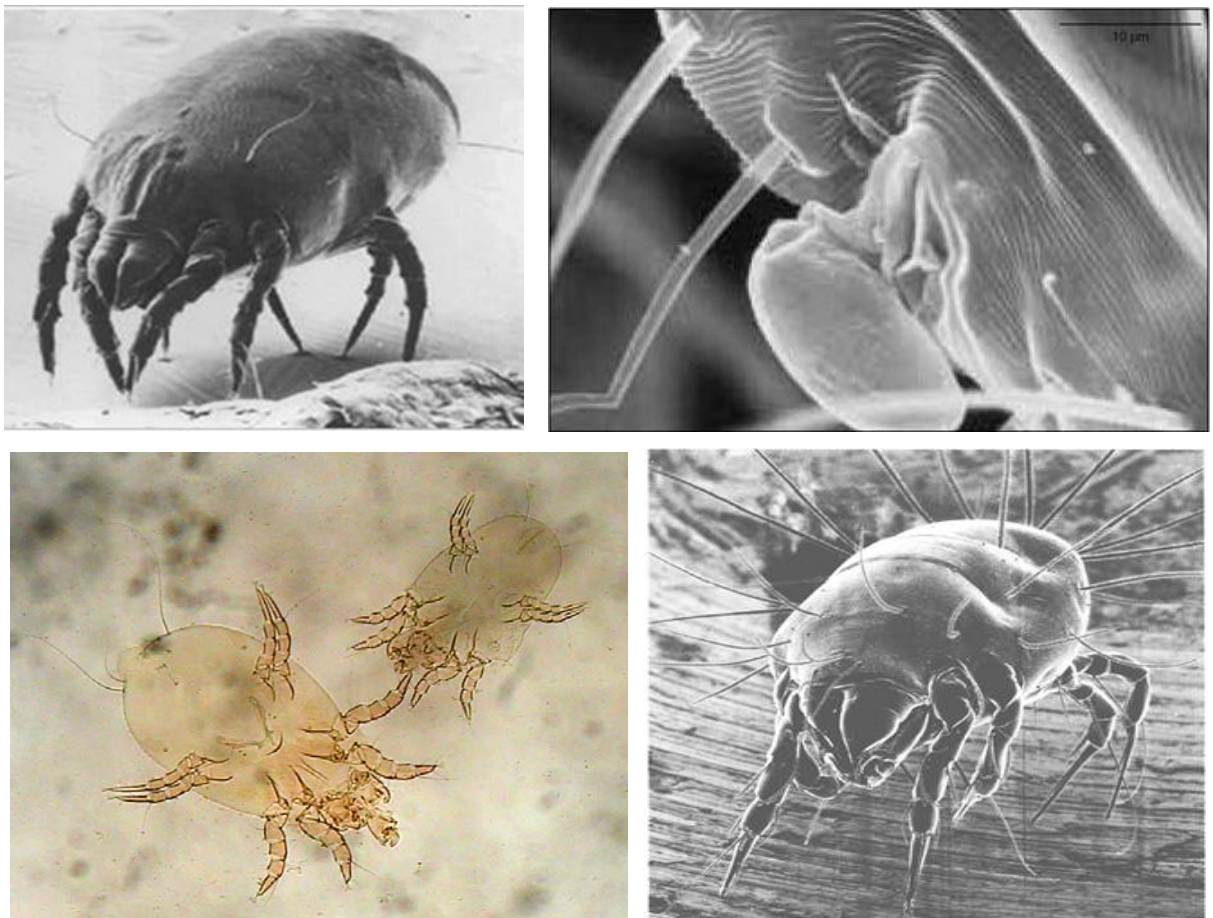


Fig. 3. Microfotografías de los ácaros. Arriba: *Dermatophagoides pteronyssinus*, en la imagen de arriba a la derecha se puede apreciar un partícula fecal de dicho ácaro. Abajo izquierda: *Dermatophagoides siboney*. Abajo derecha: *Blomia tropicalis*.

donde se ha observado en el 85,2% de las casas de pacientes alérgicos.<sup>35</sup> Las condiciones climáticas del trópico son ideales para la proliferación de los ácaros. Otros ácaros no piroglífidos, fundamentalmente de las familias *Acaridae* y *Glycyphagidae*, conocidos inicialmente como “ácaros de almacén” por habitar en alimentos y granos, son también importantes fuentes alérgicas. Particularmente, la especie *Blomia tropicalis* (BT), muy abundante en climas cálidos y húmedos, donde puede constituir el 40% de la población total de ácaros en las casas,<sup>36</sup> se considera una de las tres de mayor relevancia alérgica a nivel mundial, junto con DP y DF.<sup>37,38</sup> Al conjunto de estas especies presentes en el ambiente casero se les ha denominado ácaros domésticos.<sup>39</sup>

En los extractos alérgicos de ácaros se han resuelto, mediante Western Blotting, más de 30 componentes con actividad de unión de IgE para *Dermatophagoides* y otras tantas para BT.<sup>40</sup> Las bandas alérgicas más importantes de *Dermatophagoides* se localizan en las regiones de 15-17, 25-26 y 30 kDa.<sup>41, 42,43</sup> Con el empleo de la secuenciación de ADNc o de proteínas, se han logrado identificar hasta 22 grupos de proteínas alérgicas homólogas de ácaros domésticos (Tabla 1).<sup>44</sup>

El primer alérgeno caracterizado fue Der p 1,<sup>45</sup> glicoproteína de 25 kDa con actividad cisteíno-proteasa, proveniente del tracto digestivo y contenida en las partículas fecales del ácaro (Fig. 3).<sup>46</sup> Der p 1 representa típicamente el 10-20 % del contenido de proteínas del extracto alérgico obtenido del cultivo completo de DP y es reconocido por más del 80% de los pacientes alérgicos al mismo, y responsable del 50-70% de toda la IgE dirigida al extracto alérgico. Características similares posee Der f 1 con cerca de 80 % de homología de secuencia con Der p 1.<sup>47</sup> La estructura tridimensional de Der p 1 y Der f 1 ha sido dilucidada recientemente<sup>48,49</sup> y su función enzimática, perteneciente a un nuevo subgrupo en la familia de las Cisteíno-peptidasas C1, ha quedado esclarecida.<sup>50</sup>

La actividad proteolítica de Der p 1 está asociada a su alergenidad, en primer lugar, porque incrementa la permeabilidad de las barreras epiteliales y propicia su acceso a las células presentadoras de antígenos en un contexto alérgico. También, es capaz de promover una respuesta pro Th2/IgE mediante el corte de los receptores CD25 en las células T y el CD23 en las B, entre otros mecanismos.<sup>51,52,53</sup> Análogamente, otros alérgenos con actividad serino-proteasa (Grupos 3, 6 y 9) son capaces de activar los receptores PAR, conllevando a respuestas inflamatorias locales independientes de IgE. La actividad proteolítica de estos

Tabla 1. Alergenos identificados de ácaros domésticos (Datos extraídos de [www.allergome.org](http://www.allergome.org)).

<b>Gru po</b>	<b>Especies</b>	<b>Función</b>	<b>PM* (SDS-PAGE) kDa</b>	<b>Frecuencia unión IgE, %</b>
1	<b>Der p 1</b> , Der f 1, <b>Der s 1</b> , Der m 1, Eur m 1, Blo t 1	Cisteíno-proteasa	25 (26-30)	80-100
2	<b>Der p 2</b> , Der f 2, <b>Der s 2</b> , Eur m 2, Lep d 2, Tyr p 2, Gly d 2, Aca s 2, Blo t 2	Desconocida (Homología estructural con proteínas de unión de lípidos)	14 (15-16)	80-100
3	Der p 3, Der f 3, Der s 3, Eur m 3, Blo t 3	Tripsina (serino-proteasa)	25 (30 )	16-100
4	Der p 4, Eur m 4, Blo t 4	$\alpha$ -Amilasa	57 (56-63)	40-46
5	<b>Blo t 5</b> , Der p 5, Lep d 5	Desconocida	15 (14-18, 28 dímero)	40-98
6	Der p 6, Der f 6, Blo t 6	Quimotripsina, homología con Grupo 3	25 (30)	40
7	Der p 7, Der f 7, Lep d 7	Desconocida	25 (31, 29, 26)	50-67
8	Der p 8	Glutation-S-transferasa	26	40
9	Der p 9	Serino-proteasa colagenolítica	No ADN 24 (28)	90
10	Der p 10, Der f 10, Blo t 10, Lep d 10	Tropomiosina	33 (37)	5-80
11	Der f 11, Blo t 11	Paramiosina	96 (92, 98)	52-80
12	<b>Blo t 12</b>	Desconocida	14	50
13	<b>Blo t 13</b> , Lep d 13, Aca s 13, Der f 13	Proteína de unión de ácidos grasos	15	11-54
14	Der f 14, Der p 14, Eur m 14	Tipo vitelogenina/apolipoporfina	177 (variable)	66-84
15	Der f 15, Der p 15	Quitinasa	62,5 (98, 105)	73
16	Der f 16	Gelsolin	55	47
17	Der f 17	Proteína de unión de Ca	30	35
18	Der f 18	Quitinasa	60	60
19	Blo t 19	Péptido antimicrobiano	7	10
20	Der p 20, Der f 20	Arginina-quinasa	40	15-44
21	Der p 21, Blo t 21	Desconocida, homología con Grupo 5	15 (17, 30 dímero)	26-93
22	Der f 22			

(\*) Peso Molecular calculado a partir de ADN o SDS-PAGE del alergeno natural.

alergenos puede tener también implicaciones para la estabilidad de los extractos alérgicos.<sup>54,55</sup>

En el polvo casero se han descrito niveles de Der p 1 o Der f 1 por encima de 10 µg/g, en varias partes del mundo.<sup>56</sup> Partiendo de ese valor, se ha estimado que la cantidad de alérgeno que inhala una persona en un día, es cerca de 10 ng, lo que corresponde a 50 partículas fecales.<sup>34</sup> La exposición a 2 µg/g de polvo, se considera un factor de riesgo de sensibilización, mientras que el umbral de 10 µg/g está asociado al desarrollo de síntomas clínicos de asma.<sup>39</sup>

Por otra parte, los alérgenos del Grupo 2 son igualmente importantes que los del Grupo 1, con similar frecuencia de unión de anticuerpos IgE, aunque su contenido en los extractos suele ser menor.<sup>57,58</sup> Su estructura tridimensional muestra cierta homología con proteínas de unión de lípidos,<sup>59</sup> sin embargo, su función biológica exacta no se ha esclarecido aún. Der p 2 y Der f 2 presentan mayor homología de secuencia y reactividad cruzada entre sí que sus análogos del Grupo 1, aunque se caracterizan por poseer múltiples isoformas, que incluso pueden ser distinguidas por diferentes anticuerpos monoclonales.<sup>60</sup>

El concepto de Alérgeno Principal o “Mayor” se ha empleado para designar aquellos alérgenos con más del 50 % de frecuencia de unión de IgE entre los pacientes positivos a la fuente alérgica.<sup>30</sup> Varios de los 22 alérgenos de ácaros identificados cumplen con este criterio (Tabla 1). No obstante, este parámetro suele ser muy dependiente de la sensibilidad de los métodos de detección de IgE, que han ido perfeccionándose en los últimos años. En la actualidad, un panel de expertos internacionales ha propuesto considerar, no sólo la frecuencia, sino también la cantidad de IgE fijada y el contenido de dichos alérgenos en los extractos alérgicos.<sup>39</sup> De acuerdo a esos criterios y a la evidencia actual, solamente Der p 1/Der f 1 y Der p 2/Der f 2 pueden, ser clasificados consistentemente como Alérgenos Mayores del género *Dermatophagoides*. Según diferentes informes, cerca del 95% de los pacientes alérgicos a ácaros son positivos a la combinación de Der p 1 y Der p 2 y ambos alérgenos responden por el 50-100 % de la IgE dirigida a la fuente alérgica en más del 60 % de los pacientes.<sup>58,61</sup> Su papel dominante es más prominente en niños, mientras que en adultos, el espectro de reconocimiento se amplía a otros alérgenos.<sup>62</sup> Además de su actividad IgE, estos alérgenos han demostrado su capacidad de inducir una respuesta celular proliferativa en linfocitos de sangre periférica con secreción de citocinas Th2 en pacientes alérgicos.<sup>63</sup>

No obstante, a pesar del papel dominante de los Alergenos Mayores 1 y 2, varios estudios evidencian la importancia no despreciable de los alergenios “menores” para una parte de los pacientes.<sup>61</sup> Particularmente, los llamados pan-alergenios, por ejemplo, el Grupo 10 (tropomiosina) sería responsable de la reactividad cruzada entre ácaros y crustáceos o moluscos y el Grupo 8 con las cucarachas.<sup>44</sup>

Se conoce que los extractos alergénicos de BT presentan una reactividad cruzada muy limitada con los de *Dermatophagoides*<sup>64</sup> en correspondencia con la distancia filogenética que los separa. La homología de secuencia de los alergenios identificados entre ambas especies fluctúa de 30 a 70 %. A diferencia de *Dermatophagoides*, los alergenios del Grupo 1 y 2 no juegan un papel dominante en la reactividad hacia BT. De ellos, sólo el primero ha demostrado una reactividad moderada, aunque su contenido en los extractos es muy bajo.<sup>65</sup>

Actualmente, el principal candidato a Alergeno Mayor es Blo t 5, que es reconocido por el 60-75% de los pacientes alérgicos a BT.<sup>66-68</sup> Sin embargo, no se han publicado estudios de adsorción de IgE que demuestren convincentemente un aporte sustancial a la actividad total del extracto y sus niveles en el polvo no son elevados (por ej. ~100 ng/g en Taiwán<sup>69</sup>). La mayor parte de los estudios se han realizado con el alergeno recombinante, a pesar de que se han descrito diferencias antigénicas con respecto a las isoformas nativas.<sup>70</sup> La homología de secuencia entre Blo t 5 y Der p 5 es de 43%, sin embargo, su reactividad cruzada es muy limitada.<sup>66,71</sup> Se desconoce la función biológica de los alergenios del Grupo 5, aunque los mismos se han localizado también en el tracto digestivo del ácaro y están presentes en las partículas fecales. Recientemente se ha identificado un alergeno en BT y DP con alta frecuencia de unión de IgE (58-95%), alta homología de secuencia (39-41%) y similar peso molecular que el Grupo 5, al que se le ha asignado el número 21.<sup>72</sup> Otros alergenios importantes de BT son Blo t 13, proteína de unión de ácidos grasos,<sup>73</sup> Blo t 12 (de función desconocida, sin homólogo en *Dermatophagoides*)<sup>74</sup> y Blo t 3.<sup>75</sup>

En Cuba, al igual que en otros países tropicales, los ácaros son los alergenios de mayor importancia y particularmente, los pertenecientes a las especies DP, DS y BT. En estudios realizados por nuestro grupo se ha encontrado que alrededor del 80% de los asmáticos están sensibilizados a una o más de las tres especies antes mencionadas.<sup>76,77</sup> La caracterización alérgica de la especie endémica DS fue llevada a cabo por investigadores de nuestro grupo entre 1994 y 1997, lográndose identificar y purificar los alergenios Der s 1, Der s 2 y Der s 3.

Der s 1 ha mostrado una frecuencia de unión de IgE in-vitro de 89% de los pacientes positivos a DS, mientras que Der s 2 alcanzó 86%.<sup>78</sup> Ambos alérgenos mostraron reactividad cruzada con los AcM anti Der f 1 y Der f 2, respectivamente. En su conjunto, el extracto alérgico de DS mostró un elevado grado de reactividad cruzada con DP y aún mayor con DF, mientras que con BT fue muy limitada.<sup>79</sup> El alérgeno de 30 kDa, identificado originalmente como Der s 3<sup>80</sup> con frecuencia de unión de IgE mayor de 50%, debe ser reclasificado como Der s 6, atendiendo a la secuencia de su extremo N-terminal.

Estudios más recientes, llevados a cabo por nuestro grupo han proseguido la caracterización de los alérgenos de DS, mediante la generación de AcM contra Der s 1<sup>81</sup> y la determinación de la secuencia de ADNc de Der s 1, Der s 2 y Der s 3 (aún no publicada). También, se ha trabajado en la caracterización de alérgenos recombinantes de BT, particularmente de Blo t 13, hacia el cual, también se generaron AcM, que han servido para detectar indirectamente la existencia, igualmente, del alérgeno homólogo Der s 13.<sup>82,83</sup> De ese modo, se han identificado cinco proteínas alérgicas de *D. siboney*.

### **II.3 Enfoque etiológico del tratamiento de las enfermedades alérgicas: diagnóstico e inmunoterapia**

El enfoque etiológico en el manejo de las enfermedades alérgicas se basa en la identificación de los alérgenos causantes de la sensibilización, en contraste con el tratamiento puramente farmacológico, más extendido en la actualidad, que se limita a aliviar los síntomas. El diagnóstico y la inmunoterapia alérgeno-específica son los pilares del enfoque etiológico.

El diagnóstico alérgeno específico permite tomar medidas para eliminar o reducir la exposición al alérgeno identificado, cuando esto es posible. En la actualidad, la técnica diagnóstica más empleada es la prueba cutánea por punción (o epicutánea) debido a su sencillez y seguridad para el paciente, así como su sensibilidad y especificidad cuando se emplean alérgenos de calidad a dosis adecuadas.<sup>84</sup> La misma consiste en la introducción de pequeñas cantidades de alérgeno en la capa superficial de la piel, que al difundir en el tejido circundante provocan, en los individuos sensibilizados, una reacción inmediata mediada por IgE, caracterizada por la aparición de habón y eritema. De esa forma, las pruebas cutáneas son utilizadas para evaluar la presencia de anticuerpos IgE específicos.<sup>85,86</sup>

La inmunoterapia o hiposensibilización con alérgenos data de 1911 cuando Noon empleó



inyecciones con dosis progresivas de “vacunas” de polen para la prevención de la rinitis estacional.<sup>87</sup> Ya desde 1921 se comenzaron a emplear empíricamente extractos de polvo de casa para el tratamiento del asma. A partir de la identificación de los ácaros como principales alérgenos del polvo, comenzó, en la década de los 70, el empleo de extractos preparados a partir del cultivo de ácaros, en lugar de la colección de polvo.<sup>88</sup>

En las últimas décadas la inmunoterapia alérgeno-específica (IT) ha adquirido una base científica y documentado su eficacia mediante estudios controlados rebasando el empirismo inicial. La IT modifica la respuesta inmunitaria específica antagonizando con la respuesta Th2 alérgica. Un punto de inflexión importante fue la publicación en 1998, de un artículo de opinión de la OMS sobre la IT, que realizó una revisión sistemática de su efectividad y seguridad para diferentes manifestaciones alérgicas y reconoció su capacidad de modificar el curso de la enfermedad alérgica, en lo cual radica su potencial preventivo.<sup>89</sup> La OMS introdujo el término de “vacunas terapéuticas antialérgicas” para indicar que estos preparados que modifican la memoria antígeno-específica, son similares conceptualmente a otras vacunas terapéuticas surgidas en los últimos tiempos contra enfermedades infecciosas, tumorales o autoinmunes.

Múltiples ensayos clínicos controlados han documentado la eficacia de la IT con diferentes alérgenos, refiriendo mejoría clínica desde 60 % hasta 95 % de los pacientes, después de 3 ó 4 años de tratamiento. Un meta-análisis de ensayos clínicos de IT en asma, publicado inicialmente en 1995 y actualizado en 2003, por Abramson y col.<sup>90</sup> analizó 54 ensayos controlados y aleatorizados, incluyendo 25 con extractos alérgicos de ácaros. Sus resultados mostraron una reducción significativa de los síntomas (OR= -0,52; IC<sub>95%</sub>: -0,70 a -0,35) y la medicación antiasmática. Los pacientes sometidos a IT tuvieron menor probabilidad de empeoramiento de su enfermedad. (OR= 0,27, IC<sub>95%</sub>: 0,21 a 0,35). Otros ensayos clínicos han demostrado el efecto a largo plazo de la IT, 10 años después de discontinuada,<sup>91,92</sup> y su efecto preventivo, no sólo evitando la progresión de la enfermedad (por ej. de rinitis a asma),<sup>93,94</sup> sino también en la prevención de nuevas sensibilizaciones.<sup>95,96,97</sup>

La eficacia de la IT es dosis-dependiente. Se ha recomendado alcanzar dosis de mantenimiento entre 5 y 20 µg de Alérgeno Mayor,<sup>101</sup> aunque no hay muchos ensayos clínicos que sustenten dicha recomendación.<sup>98</sup> Recientemente, un panel de expertos de la Organización Mundial de la Alergia ha propuesto recomendaciones para estandarizar y mejorar el diseño de los ensayos clínicos de IT con vistas a incrementar la calidad de sus

resultados.<sup>99</sup> Las investigaciones clínicas más actuales se enfocan en la IT por vías no inyectables (sublingual),<sup>100</sup> y con diferentes esquemas y dosis en busca de un balance óptimo en cuanto a eficacia y seguridad; así como, la investigación de sus mecanismos y la búsqueda de subrogados de eficacia clínica y predictores inmunológicos de su eficacia a largo plazo.<sup>101</sup>

La IT tiene como principal desventaja el riesgo de reacciones adversas de carácter sistémico, las cuales pueden, potencialmente, poner en peligro la vida del paciente. Varios autores han realizado revisiones de las reacciones adversas durante la IT. Por ejemplo, en estudios realizados en EE.UU y Europa<sup>102-111</sup> se refieren frecuencias entre 0,84 y 10 % de reacciones adversas del total de inyecciones administradas, incluyendo entre 0,05 y 0,27 % de reacciones sistémicas, la mayor parte de naturaleza leve o moderada. La heterogeneidad de las cifras refleja la ausencia de criterios uniformes. Las reacciones sistémicas severas (anafilaxis), que representan un peligro potencial para la vida del paciente se producen con una frecuencia aproximada de 1 cada 50 000 a 100 000 inyecciones. En EE.UU. se informaron 3,4 reacciones fatales (una por cada 2,5 millones de inyecciones) y 22,7 reacciones sistémicas severas casi fatales por año, en el período 1985-1998.<sup>112</sup> En su gran mayoría, las reacciones severas son causadas por errores en el manejo de la dosis y la administración de inyecciones en pacientes con asma inestable, sin previo examen del médico. La estandarización inadecuada de las vacunas alérgicas constituye también un riesgo potencial.

#### **II.4 Mecanismos de la inmunoterapia**

La comprensión de los mecanismos de acción de la IT ha avanzado considerablemente. Se conoce que la misma ejerce cambios inmunoreguladores en diferentes componentes de la respuesta alérgica.<sup>113,114</sup> En primer lugar, en los mecanismos efectores de la respuesta inmediata: los anticuerpos IgE y la actividad de mastocitos y basófilos. El papel fundamental se le atribuye a la inducción de una respuesta de células T reguladoras (T<sub>R</sub>1), productoras de IL-10 o TGF- $\beta$ , las cuales ejercen un papel antagonista de la respuesta inflamatoria Th2, reduciendo las citocinas pro-alérgicas: IL-4, IL-13 e IL-5. Por otra parte, la IL-10 es inductora de IgG4, con capacidad bloqueadora de la respuesta alérgica a diferentes niveles.<sup>113,115</sup>

Los anticuerpos IgG4 no activan el complemento, y tienen poca o ninguna actividad inflamatoria.<sup>116</sup> La capacidad bloqueadora de la IgG4 inducida por la IT, se manifiesta en primer lugar, en la inhibición de la respuesta inmediata a partir de la competencia con la IgE por la unión del alérgeno.<sup>117</sup> Recientemente se ha descrito también su capacidad de bloquear

el mecanismo de presentación antigénica facilitada por IgE, y por consiguiente, suprimir la respuesta específica de células Th2.<sup>2,118,119</sup> La inhibición de dicho mecanismo propiciaría la vía “normal” de presentación a dosis más elevadas que favorecería una respuesta de células T, no patológica (Treg). De ese modo, la IgG4 puede interferir no solamente en la respuesta alérgica inmediata, sino también en la respuesta inflamatoria tardía y crónica, organizada por las células Th2, la cual juega un papel esencial en las alergias respiratorias.

## **II.5 Estandarización de vacunas y extractos alérgicos**

Los extractos alérgicos son productos biológicos de composición compleja que se administran a las personas para el diagnóstico o tratamiento de las enfermedades alérgicas, o sea, como vacunas terapéuticas. Son obtenidos mediante la extracción de los componentes activos a partir de fuentes naturales, llamadas materias primas alérgicas. Durante decenios la concentración de los extractos se expresó en unidades de peso/volumen, referidas a la relación de extracción y posteriormente, en unidades de contenido de proteínas (nitrógeno proteico). A partir del descubrimiento de la IgE en 1967, fue posible comenzar a identificar los componentes activos de los extractos sobre la base de su actividad de unión de IgE. En los años 70 se realizaron los primeros intentos por estandarizar los extractos alérgicos en cuanto a actividad biológica, en los que se hizo evidente que su contenido de proteínas no reflejaba adecuadamente la actividad.<sup>120</sup> La variabilidad de la actividad biológica de los extractos era del orden de un factor de 10 000, lo cual refleja la variabilidad natural de las fuentes alérgicas, así como los factores no controlados en el procesamiento de los extractos y su falta de estabilidad.<sup>121</sup>

Actualmente, por extracto alérgico estandarizado se entiende un producto con una composición que refleje adecuadamente la composición natural de la fuente alérgica; con actividad biológica consistente lote a lote, expresada preferentemente en unidades que permitan su comparación con otros productos y que sean informativas desde el punto de vista clínico; así como con estabilidad definida, que sirva de base para el establecimiento de su período de validez.<sup>121</sup> El objetivo final de la estandarización es garantizar una eficacia y seguridad consistente, tanto para el diagnóstico como para la IT.<sup>89</sup> Particularmente, la seguridad durante la IT ha estado en el centro de atención del proceso de estandarización.

El desarrollo de métodos analíticos para la determinación de la actividad biológica, así como la definición del propio concepto de actividad biológica para estos productos, juega un papel

clave para su estandarización. Los primeros métodos desarrollados, tanto *in-vivo* (pruebas cutáneas) como *in-vitro*, se basaron en el empleo de IgE; o sea, en la actividad alérgica como concepto de actividad biológica, la cual guarda una relación obvia con la eficacia diagnóstica de los productos y es un predictor directo de su capacidad anafiláctica, muy importante para la seguridad de la IT. Sin embargo, es tema actual de debate la fundamentación científica de su relación con la eficacia del tratamiento.<sup>122</sup>

En la actualidad existen dos tendencias en los métodos para la estandarización: (i) los que determinan actividad total a partir de la IgE, empleando sueros o pruebas cutáneas en pacientes y (ii) los que determinan componentes individuales, o sea, Alérgenos Mayores. Ambas variantes tienen ventajas y desventajas: La primera depende de la selección de pacientes, lo cual puede comprometer su reproducibilidad entre poblaciones diferentes, aparte de las limitaciones prácticas y éticas que esto implica. No obstante, responde al concepto de prueba biológica, al involucrar directamente a los anticuerpos IgE humanos y teóricamente, es capaz de considerar el aporte de todos los componentes alérgicos. La segunda determina sólo algunos componentes, obviando la influencia del resto de los alérgenos en la actividad total, lo cual puede ser muy apropiado en los productos con un solo Alérgeno Mayor.

Los primeros métodos basados en componentes individuales se establecieron en los EE.UU. por la FDA en los años 70 y fueron ensayos de inmunodifusión radial con antisueros contra Amb a 1 (polen de Ambrosia)<sup>123</sup> y posteriormente para Fel d 1 (caspa de gato).<sup>124</sup> En la actualidad, la determinación de Alérgenos Mayores se realiza usualmente empleando ELISA con AcM, con mayor especificidad y sensibilidad analítica, así como, homogeneidad y disponibilidad de los reactivos, que los ensayos basados en IgE de sueros humanos. Ésta es la tendencia predominante en los últimos años, ya que también permitiría potencialmente comparar productos de diferentes fabricantes.<sup>122</sup> Evidentemente, este enfoque precisa de un desarrollo primario en la caracterización de los alérgenos y la generación de AcM contra los mismos, en lo cual se ha avanzado mucho en los últimos años.<sup>122</sup> No obstante, no hay aún ensayos adecuados para muchos alérgenos importantes, incluyendo, por ejemplo, BT. En adición, no todos los ELISA-AcM han demostrado utilidad en la estandarización, ya sea por una pobre correlación entre el alérgeno individual y la actividad total del extracto, o por una especificidad demasiado exquisita de los AcM, que reconocen sólo determinadas isoformas de los alérgenos, no representativas del repertorio natural.<sup>98, 125</sup> El desarrollo y validación

internacional de ensayos para Alergenos Mayores es el objetivo de un proyecto colaborativo financiado por la Unión Europea.<sup>126</sup>

La estandarización de las vacunas de alergenios ha sido un proceso complejo a nivel internacional, debido a la falta de un enfoque armonizado y la coexistencia de diferentes sistemas. Existen marcadas diferencias entre los enfoques prevalecientes en Europa y EE.UU, incluyendo unidades y métodos analíticos no completamente compatibles (Tabla 2).

Las Unidades Biológicas (UB) fueron introducidas en 1989 por las Guías Nórdicas para el Registro de Preparaciones Alergénicas, y se definen como la concentración de alérgeno capaz de inducir un habón del mismo tamaño que una solución de histamina 54,3 mmol/L, en la mediana de 20 pacientes.<sup>127</sup> Como no ha existido un preparado de referencia único calibrado en UB, este sistema ha degenerado en unidades específicas de los fabricantes, basadas en sus referencias internas, en algunos casos con modificaciones del concepto original que las hace difícilmente comparables.<sup>128</sup> En EE.UU existe un sistema de referencias nacionales organizado por la FDA que ha implementado las Allergy Units (AU). Éste se basa también en la reactividad cutánea, pero determinada por la técnica intradérmica, sin el uso del patrón de histamina.<sup>129</sup> No se han adoptado aún referencias internacionales de uso obligatorio. Otra diferencia radica en el empleo de un ensayo complementario para la evaluación de la composición alérgica, que en el enfoque europeo tiene carácter obligatorio. El Western Blotting IgE, empleando sueros de pacientes alérgicos, es uno de los métodos preferidos con ese propósito.<sup>130</sup>

## **II.6 Aspectos regulatorios**

La estandarización de los alergenios ha sido acompañada de la evolución de los aspectos regulatorios. A partir de la década de los 90 se introduce en Europa y los EE.UU. el Registro de los productos alérgicos. El Registro exige, entre otros aspectos, la determinación de la actividad alérgica y la caracterización de la composición de los extractos, la consistencia entre lotes y la ejecución de estudios de estabilidad. La seguridad y eficacia de los productos deben ser demostradas mediante estudios toxicológicos en animales y ensayos clínicos en humanos. De ese modo, el Registro se basa en la estandarización de los productos. En Europa, los fabricantes deben desarrollar sus propias referencias internas y sistema de estandarización, como parte del proceso de Registro.

La primera iniciativa exitosa de establecer la institución del Registro, se produjo en 1982 con la creación de las Guías Nórdicas para el Registro de Preparaciones Alergénicas.<sup>127</sup> A partir de 1989 la Comunidad Europea extendió el alcance de su directiva 65/65/EEC y 75/319/EEC, que regulaban el Registro de fármacos, a “los productos farmacéuticos inmunológicos” tales como vacunas y alergenicos. Sin embargo, los productos alergénicos, requieren de un enfoque regulatorio diferenciado debido a las peculiaridades de su proceso productivo y modo de uso, y especialmente, a sus métodos de estandarización. La primera guía europea para productos alergénicos se completó en 1992 y se actualizó en 1996.<sup>131</sup> En 1997 se publicó la monografía sobre productos alergénicos en la Farmacopea Europea que establece los requisitos y límites de calidad para los mismos (Tabla 3).<sup>132</sup> Los avances más recientes en el ámbito europeo han sido el desarrollo del concepto de agrupación por familias taxonómicas, que permite la extrapolación de datos preclínicos y clínicos entre productos alergénicos de especies taxonómicas cercanas. Este concepto, que ha sido útil en el manejo regulatorio de un amplio rango de productos alergénicos, está siendo revisado actualmente, teniendo en cuenta los datos existentes de reactividad cruzada y homología de secuencia, con la intención de oficializar las familias de alergenicos homólogos.<sup>133</sup>

Por otra parte, en EE.UU. existe un programa regulatorio regido por la FDA que, desde 1973, implementó normas relativas a la producción de extractos alergénicos.<sup>134</sup> En 1999 se publicaron los requisitos para el Registro de los extractos alergénicos estandarizados.<sup>135</sup> Sin embargo, solamente se cuenta en ese país con 19 productos registrados de más de 100 presentes en el mercado, aunque los estandarizados se corresponden con los de mayor uso como vacunas. Es evidente la falta de armonización entre ambos enfoques que ha impedido la inclusión de los productos alergénicos en la Conferencia Internacional de Armonización de las regulaciones farmacéuticas (ICH).

En Cuba, el Registro de los productos farmacéuticos en el CECMED, constituye un requerimiento del estado cubano para la comercialización y uso de los mismos. Los extractos alergénicos quedaron sujetos a la obligatoriedad del Registro desde el año 1980. No obstante, solamente en el 2002 se aprobó una regulación específica que define los requisitos de Registro para los Productos Alergénicos.<sup>136, 137</sup> Dicha regulación establece criterios muy similares a los de la Guía Europea, incluyendo el concepto de agrupamiento en familias taxonómicas.

Tabla 2. Comparación de los requerimientos para la estandarización de los productos alérgicos de acuerdo a diferentes enfoques regulatorios.

Guías Nórdicas	EMEA	FDA
Referencias internas (RI) del fabricante	Referencias internas del fabricante	Referencias nacionales FDA
Estandarización biológica por punción cutánea, patrón de histamina 54,3 mmol/L	Potencia biológica por pruebas cutáneas o métodos in-vitro alternativos (IgE). Adicionalmente Alergenos Mayores.	Estandarización biológica por método intradérmico o ensayos de alérgenos individuales o actividad enzimática para productos específicos
Unidades Biológicas (UB)	Unidades específicas por fabricante	<u>Allergy Units (AU)</u> , <u>Bioequivalent Allergy Units (BAU)</u>
Ensayos para el producto final:		
Potencia relativa a la RI Límites: 50-200%	Potencia relativa a la RI, contenido de Alergeno Mayor Límites: 50-200%	Ensayo de potencia establecido por la FDA. Liberación por CBER/FDA Límites: 50-200%
Composición o perfil alérgico y de proteínas	Composición o perfil alérgico y de proteínas	

Tabla 3. Ensayos para productos alérgicos según la Farmacopea Europea (*Ph Eur <1063>*).

Ensayos	Límites
Potencia alérgica total	50-200%
Contenido de alérgenos individuales	50-200 %
Perfil de alérgenos (IgE) y proteínas	Similar a la referencia interna
Contenido de proteínas (si no hay prueba de potencia)	± 20 %
Esterilidad	Cumple
Agua (liofilizados)	< 5 %
Toxicidad anormal (Seguridad general)	Cumple

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**



### III. CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA EVALUACIÓN DE ALERGENOS

##### III.1.1 Prueba cutánea y determinación de potencia biológica *in-vivo*

La prueba de punción cutánea se realizó empleando lancetas de acero inoxidable con puntas de 1 mm (ALK, Dinamarca).<sup>127</sup> Se aplicó una gota del alérgeno sobre la piel de ambos antebrazos, presionando la lanceta durante 1 s. La lectura se realizó después de 15 min, marcando con una pluma el contorno del habón que se desarrolla alrededor de la punción. El dibujo del habón se registró sobre una cinta adhesiva transparente. Se midió el diámetro mayor y el diámetro ortogonal y se calculó el promedio entre ambos, así como el diámetro promedio de ambos brazos (d). Para considerar válida la prueba, la diferencia entre los brazos, no debe ser mayor de 2 mm, para habones entre 3 y 6 mm; ni mayor de 3 mm, para habones mayores. También, debe ser positiva para el control positivo (histamina HCl 10 mg/mL) y negativa para la solución diluyente. La prueba se consideró positiva para  $d \geq 3$  mm.

La potencia alérgica *in-vivo* o actividad biológica se determinó a las Referencias Internas, de acuerdo al método descrito en las Guías Nórdicas para el Registro de Productos Alérgicos.<sup>127</sup> Se aplicó la prueba de punción por duplicado, a 20 pacientes consecutivos con síntomas clínicos de alergia al polvo doméstico y se calculó el área de la reacción. Se define 10 000 UB/mL como la concentración del producto capaz de producir un habón igual al provocado por una solución de histamina 54,3 mmol/L. La potencia individual (Ch10) se calculó según la fórmula:<sup>85</sup>

$$P = (A_a/A_h)^{2.5} \cdot 10\,000 \text{ UB/mL}$$

donde,  $A_a$  es el área del habón del alérgeno y  $A_h$  es el área del habón de la histamina. La potencia total se calculó como la mediana de los valores individuales.<sup>127</sup>

##### III.1.2 ELISA de inhibición de IgE

El ELISA de inhibición de IgE se empleó para la determinación de la actividad alérgica total. El ensayo es similar al método de referencia de la FDA.<sup>138</sup> Se recubrieron microplacas MAXISORP (Nunc) con el extracto alérgico de referencia (RI) a una concentración de 1000 UB/mL para DP/DS y a 4000 UB/mL para BT, en solución carbonato-bicarbonato pH 9,6 por 16 h a 4°C. Se bloquearon los sitios de unión inespecífica de la placa con PBS-Tween 20 0,1 %- BSA 1 %. (PBST-BSA). A continuación se realizó la inhibición de la IgE con un pool de

sueros de pacientes alérgicos, mediante la incubación del suero con diluciones seriadas 1:3 del alérgeno muestra y la RI, en paralelo, en el rango de 1-4000 UB/mL. Durante esta incubación, la IgE no inhibida por los alérgenos en solución, se une al alérgeno fijado a la placa. Después de efectuar el procedimiento de lavado correspondiente, empleando solución PBST, se realizó la detección de la IgE fijada, mediante un conjugado anti-IgE-peroxidasa (BIOGEN), dilución 1:500. El revelado se realizó con adición de sustrato cromogénico H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03 % y tetra-metil-bencidina (TMB). Se detuvo la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 mol/L y se determinó la Absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas Multiscan.

### **Pool de sueros IgE**

Para los métodos basados en IgE humana (ELISA de inhibición y Western Blotting) se empleó una mezcla o “pool” de sueros de pacientes alérgicos, seleccionados de acuerdo a criterios de representatividad de su patrón de reconocimiento de Alergenos Mayores por Western Blotting. Para DS y DP se empleó un mismo pool de sueros obtenido a partir de 6 pacientes, que reconoce al menos 12 componentes diferentes del extracto (14-80 kDa), con las bandas más intensas a 15-17 y 25 kDa. Para BT el pool de sueros se conformó a partir de 5 pacientes, con un patrón de reconocimiento de al menos 11 componentes del extracto (entre 11 y 60 kDa), siendo las bandas más importantes las de 16 y 18 kDa. Ambos reactivos se liofilizaron y se conservaron a -70°C como materiales de referencia.

### **Cálculo de la Potencia Relativa**

Los valores de inhibición se calcularon a partir de los valores de Absorbancia, según:

$$I = [(CP - Muestra)/(CP - CN)] \cdot 100 \%$$

donde: CP: control positivo, CN: control negativo. La Potencia Relativa ( $P_R$ ) entre el producto muestra y la RI se calculó mediante el método estadístico de las rectas paralelas.<sup>139,140</sup> Para considerar la curva de inhibición de la RI o de una muestra como válida, se establecieron los siguientes requisitos o criterios de validez.<sup>138</sup> (i) Deben existir puntos por debajo y por encima del 50 % de inhibición; (ii) El coeficiente de correlación ( $r$ ) debe ser superior a 0,95; (iii) Cada par de rectas ‘muestra’ y ‘referencia’ deben ser paralelas (prueba de Student;  $p = 0,05$ ). Se calculó la potencia relativa ( $P_R$ ) como la distancia horizontal entre ambas rectas paralelas, empleando la expresión:

$$P_R = 10^{(b_s - b_r)/a}$$

donde:  $b_s$  es el intercepto de la muestra y  $b_r$  el de la referencia, y  $a$  la pendiente común.

## Validación

Se determinó la precisión intra e interensayo, exactitud y límite de cuantificación, así como el rango del ensayo y se analizó la consistencia de sus criterios de validez en el tiempo. El estudio consistió en el análisis de 65 ensayos válidos consecutivos de los tres productos. En cada ensayo se empleó la RI y una réplica de la misma, preparada de forma independiente, denominada control de la RI. El límite de cuantificación fue determinado a partir de 18 ensayos tomando los valores de  $C_{50}$  (concentración que corresponde al 50 % de inhibición) de la RI y su control. La exactitud fue determinada empleando 8 lotes diferentes de los 3 productos, con 4 diluciones decimales cada uno, con valores nominales de potencia de: 20 000 UB/mL, 2 000 UB/mL, 200 UB/mL y 20 UB/mL. El cálculo de la precisión intraensayo se realizó mediante ANOVA, de acuerdo al método de las rectas paralelas con la ayuda del programa Kyber-ELISA (BIOCEN).<sup>141</sup> La precisión interensayo se expresó a través de la varianza ( $\sigma^2$ ) de  $\text{Log}(P_R)$ . El intervalo del 95% de confianza para  $P_R$  se determinó como:

$$IC95\%_{\text{inf}} = P_R \cdot 10^{-1.96\sigma/\sqrt{n}} \quad IC95\%_{\text{sup}} = P_R \cdot 10^{1.96\sigma/\sqrt{n}}$$

### III.1.3 Composición de proteínas (SDS-PAGE)

La composición o perfil de proteínas fue determinada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 12.5 %, sistema discontinuo en presencia de SDS, según Laemmli.<sup>142</sup> Se usó una minicámara Mighty-Small II (Sigma, USA) y un patrón de peso molecular de 14 a 94 kDa (Amersham-Pharmacia, UK). Las muestras se aplicaron en tampón no reductor o reductor ( $\beta$ -mercaptoetanol), con calentamiento previo durante 5 min a 100 °C. El gel se tiñó con azul de Comassie y se sometió a análisis densitométrico en el densitómetro scanner SHARP JX-330, con la ayuda del programa ImageMaster 1D v 3.0 (Amersham-Pharmacia, UK). El ensayo fue validado en cuanto a exactitud en la determinación del peso molecular de los picos principales de los productos, repetibilidad, precisión intermedia y límite de detección en la determinación del área bajo los picos principales.

### III.1.4 Composición alérgica (Western Blotting IgE)

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0,45  $\mu\text{m}$ ), empleando el procedimiento de transferencia semiseca (Pharmacia LKB, Multiphor II), durante 2 h. Se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos de la membrana con PBS-Tween 20 0,1 %- BSA 1 %. A continuación la membrana se incubó con el

pool de sueros IgE y, después de lavar, se aplicó anti-IgE marcada con peroxidasa (BIOCEN). Por último, se realizó el revelado mediante el método de quimioluminiscencia amplificada (ECL, Amersham, UK). La emisión de luz, producto de la reacción quimioluminiscente, queda registrada en una placa fotográfica POLAROID. El procedimiento fue optimizado en cuanto a relación señal/fondo, dilución del pool de sueros y del conjugado anti-IgE. Este ensayo fue usado para el control de calidad de los lotes experimentales e industriales y para los estudios de estabilidad. Paralelamente en los primeros experimentos se empleó también detección con el sustrato cromogénico diaminobencidina (DAB, SIGMA, USA) o alternativamente con conjugado anti-IgE con fosfatasa alcalina (SIGMA, USA) y revelado con el sustrato cromogénico BCIP-NBT (Sigma, USA). El análisis densitométrico de los filmes o membranas se realizó con la ayuda del sistema ImageMaster 1D v 3.0 (Amersham-Pharmacia, UK). En cada ensayo se aplicó un patrón de pesos moleculares, con la ayuda del cual se calcularon los pesos moleculares de las bandas de las muestras. Se determinaron, la intensidad de los picos principales (altura) y el área bajo la curva de los mismos. La intensidad relativa se calculó con respecto al pico correspondiente de la RI.

### **Validación**

Se evaluó la linealidad de la función de respuesta del ensayo (intensidad de los picos principales vs. concentración) mediante diluciones seriadas en el rango de 0,2 a 5,0 RI (equivalente a 400 - 10 000 UB para DP y DS, y a 2000 - 50 000 UB para BT) en dos experimentos separados, y se calculó el límite de detección (LD) empleando la expresión:<sup>143</sup>  $LD = 3\sigma / K$ ; donde,  $\sigma$  es el error estándar del intercepto y K es la pendiente de la recta de regresión. Se determinó la precisión intraensayo analizando 8 réplicas de una misma muestra, e interensayo a partir del análisis independiente de 21 ensayos de los tres productos.

### **III.1.5 Contenido de proteínas**

El contenido de proteínas totales en los extractos alérgicos y en productos intermedios se determinó mediante la técnica de Lowry y col.<sup>144</sup> empleando un patrón de seroalbúmina bovina (BSA) en el rango de 20-200  $\mu\text{g/mL}$ . El método fue validado adecuadamente.

### **III.1.6 Contenido de Alergenos Mayores Der p 1, Der p 2 y Der s 1**

#### **ELISA-AcM**

El procedimiento del ELISA-AcM anti Der s 1, desarrollado por nuestro grupo, se describe en detalles en la publicación de Sewer y col.<sup>81</sup> Brevemente, se recubrieron placas MaxiSorp

(Nunc) con el AcM anti Der s 1 5F7/H8 (BIOGEN), en tampón de recubrimiento (carbonato-bicarbonato, pH 9,6). Después del bloqueo con PBST-BSA 1 %, se adicionaron las muestras, así como la referencia de Der s 1, en diluciones dobles seriadas desde 50 hasta 1,56 ng/mL. Después de la incubación de las muestras y del lavado, se añadió el AcM 4E10/E10 biotinilado (BIOGEN). A continuación del correspondiente lavado, se adicionó el conjugado streptavidina-peroxidasa (Sigma, USA) dilución 1:5000. Por último, la reacción se reveló con el sustrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03 % y TMB. Se detuvo la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 mol/L y se determinó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas ELISA (Labsystems Multiscan MS).

Para Der p 1 y Der p 2, se emplearon los ELISA-AcM comerciales de la firma INDOOR (UK), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para Der p 1: el AcM 5H8 como recubrimiento y AcM 4C1 biotinilado como anticuerpo secundario. Para Der p 2: los AcM 1D8 y 7A1 biotinilado, respectivamente, con curvas patrones entre 100 y 2 ng/mL en ambos casos. El revelado se realizó con streptavidina-peroxidasa como se describió para Der s 1.

### **ELISA anti Grupo 1 basado en anticuerpos policlonales**

Se obtuvieron anticuerpos policlonales (AcP) en conejos inmunizados con 3 dosis de 100 µg de Der s 1 inmunopurificado, inoculadas con un intervalo de dos semanas y una dosis de refuerzo a los 45 días. Se purificaron los anticuerpos IgG del suero mediante precipitación con sulfato de amonio 50 % y cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel (Pharmacia, Suecia) y se conjugó con peroxidasa por el método del periodato de sodio.<sup>145</sup> Los AcP reconocieron tanto Der s 1 como Der p 1, en virtud de su reactividad cruzada y alta homología. Se desarrolló un ELISA-AcP tipo sandwich directo tapizando placas Maxisorp con 0,5 µg por pocillo del AcP, aplicando curvas de referencia de Der s 1 o Der p 1 en el rango de 2 a 100 ng/mL y revelando con el AcP conjugado con peroxidasa, a una dilución optimizada de 1:2000 para Der s 1 y de 1:1000 para Der p 1, con los correspondientes pasos intermedios de lavados y bloqueo, similares a los ELISA descritos previamente.

### **Validación de los ELISA para Der s 1 y Grupo 1**

Se realizaron estudios prospectivos, con límites de aceptación prefijados, de acuerdo a lo recomendado en guías internacionales.<sup>143,146</sup> Se hicieron 12 ensayos por dos operadores en diferentes días, para cada ELISA. Se determinó la especificidad, exactitud, linealidad de la función de respuesta, repetibilidad (precisión intraensayo) y precisión intermedia (interensayo). Los últimos cuatro parámetros se estudiaron en tres concentraciones diferentes de las

muestras, correspondientes a las regiones alta, media y baja de la curva de calibración. Se determinó el rango del ensayo, como el rango de concentraciones en el que se cumplían los criterios de aceptabilidad para la linealidad, la exactitud y la precisión.

### **III.1.7 Otros ensayos**

Para el control de calidad de los extractos alérgicos liofilizados se emplearon también el ensayo de esterilidad por filtración por membrana (USP), la determinación de humedad residual (Karl Fisher, USP), la prueba de uniformidad del contenido (USP) y el ensayo biológico de seguridad general o toxicidad inespecífica (USP). Para la Solución Diluyente se emplearon, además, la determinación de endotoxinas (LAL, USP) y de fenol mediante valoración colorimétrica con p-nitroanilina.<sup>147</sup>

## **III.2 MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE EXTRACTOS ALÉRGICOS**

### **III.2.1 Cultivo de ácaros**

El método empleado para el cultivo o propagación de ácaros ha sido registrado como invención ante la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial y aparece descrito en detalles en ese documento.<sup>148</sup> Se realizó la propagación del cultivo en gran escala a partir de la inoculación con ácaros aislados del polvo doméstico colectado de colchones, e identificados mediante claves pictóricas según cada especie.<sup>149</sup> Se empleó un medio de cultivo artificial, consistente en una fórmula de aminoácidos hipoalérgicos y proteínas de origen animal, esterilizada; liofilizada y pulverizada. Los cultivos se llevaron a cabo en frascos ventilados de cultivo celular, manteniéndose entre 1 y 5 meses, en dependencia de la especie, a temperatura y humedad constantes, con adición periódica de medio de cultivo, y hasta dos reinoculaciones en caso de lento crecimiento. Fueron sometidos sistemáticamente a inspección visual para detectar posibles contaminantes (otros ácaros, microorganismos) y determinar la densidad de ácaros en el cultivo. Se empleó como indicador de crecimiento el “Grado de Madurez”, que refleja la densidad aparente de ácaros y su actividad.

Se determinó el contenido de Alergenos Mayores Der p 1 o Der s 1 para DP o DS, respectivamente por ELISA-AcM a los cultivos en la fase estacionaria. En el caso de BT se determinó el contenido de proteínas totales por el método de Lowry y col. y la actividad alérgica total mediante ELISA de inhibición de IgE y se calculó la actividad específica por unidad de masa de proteínas. En los experimentos para el establecimiento del tiempo óptimo

de cultivo se tomaron muestras del mismo con frecuencia bisemanal. Los cultivos se cosecharon e inactivaron mediante congelación a -20°C, constituyendo así la Materia Prima Alergénica (MPA), sometida a liberación por la función de aseguramiento de la calidad.

### **III.2.2 Fabricación de los extractos alergénicos**

El flujo de producción se describe en la Fig. 4. La extracción de las proteínas de la MPA, se realizó en solución acuosa tamponada con pH 7,8 y agitación moderada a 4°C durante 16 h. La clarificación se realizó mediante centrifugación a 4000 g durante 1 h a 4 °C y a continuación, mediante filtración a presión por cápsula filtrante de 0,45 µm. Se eliminaron los componentes de bajo peso molecular del extracto crudo mediante ultrafiltración empleando cartuchos de fibra hueca con un límite de corte de 10 kDa (Amicon, DC-10L, USA). Esta etapa consistió en una operación inicial de diafiltración a volumen constante con una relación 5:1 de solución de diafiltración con respecto al volumen de extracto y una operación final de concentración hasta aproximadamente una décima parte del volumen inicial, lo cual permite el ajuste de la concentración del producto mediante dilución, de acuerdo al contenido deseado de alérgenos o proteínas. Esta etapa se describe con más detalles en el Anexo 1. El extracto diafiltrado y concentrado fue esterilizado mediante filtración con diámetro de poro de 0,2 µm. Se aplicaron controles del contenido de alérgeno Der p 1 o Der s 1 y de proteínas totales, al extracto crudo clarificado, diafiltrado y estéril.

El extracto estéril se formuló en condiciones asépticas, a la concentración fijada para el proceso de liofilización. Se distribuyó en bulbos esterilizados en condiciones asépticas y se liofilizó en un equipo USIFROID SMH-100. El ciclo de liofilización se describe en el Anexo 2. El producto final liofilizado fue sometido a inspección visual bulbo a bulbo, para detectar posibles defectos. Muestras de cada lote del producto final fueron sometidas a los ensayos de control de la calidad descritos en la especificación (Anexo 3). Cada lote a escala piloto o industrial fue liberado por la función de aseguramiento de la calidad.

### **III.2.3 Solución diluyente**

La Solución Diluyente para Extractos Alergénicos VALERGEN® se empleó para la reconstitución de los productos liofilizados y la preparación de diluciones para las pruebas cutáneas o la inmunoterapia. La misma consiste en una solución salina tamponada con fosfatos a pH 7,4 con la adición de fenol 0,4 % como preservativo y seroalbúmina humana 0,03%

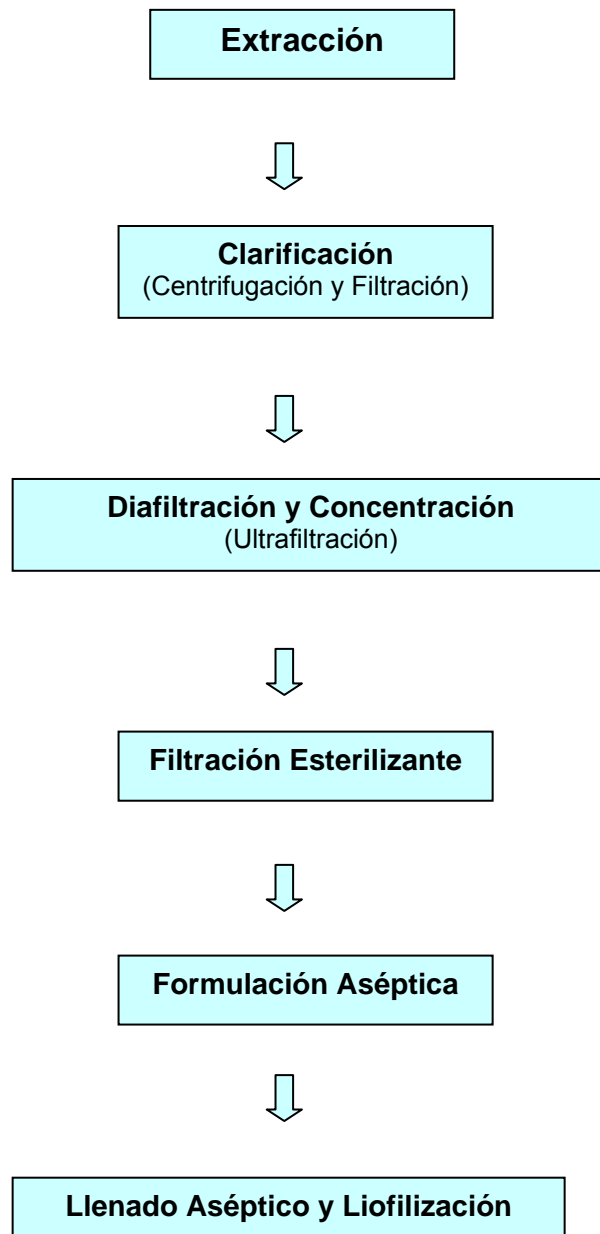


Fig. 4. Flujo de producción de extractos alérgicos, por etapas.



como estabilizante. Se fabricó mediante las etapas de formulación, filtración esterilizante y llenado aséptico, en la Planta de Productos Parenterales No. 1 de BIOCEN.

#### **III.2.4 Metodología para la introducción a escala industrial y evaluación de la consistencia**

Se siguió la metodología establecida en BIOCEN. El proceso de introducción a escala industrial tuvo como objetivo convertir las especificaciones de diseño en un prototipo industrial, de acuerdo a la terminología ISO 9001:2000<sup>150</sup> y constituyó un punto de revisión del diseño para evaluar la consistencia del proceso productivo en instalaciones industriales en condiciones de Buenas Prácticas de Fabricación. Se produjeron tres lotes consecutivos de cada extracto alergénico, partiendo de lotes diferentes de MPA, en las Plantas de Ingredientes Activos y de Productos Parenterales No. 1 de BIOCEN. Igualmente se fabricaron tres lotes consecutivos de la Solución Diluyente. Todos los procesos fueron descritos en Procedimientos Normalizados de Operación (PNO) previamente aprobados. Las materias primas fueron liberadas de acuerdo a Especificaciones de Calidad previamente establecidas. El producto fue sometido a controles intermedios, asegurando que cumplieran las especificaciones generadas para los productos en proceso. Finalmente los lotes fueron liberados por la función de aseguramiento de la calidad, atendiendo a los resultados de los ensayos y a partir de la revisión de la documentación del proceso productivo. El proceso de introducción fue aprobado en su conjunto para cada producto, una vez demostrados resultados consistentes.

Se realizó la evaluación de la consistencia de la producción en serie, posterior a la introducción, mediante el análisis de 28 lotes consecutivos de productos finales, así como de 65 lotes de MPA, empleando la herramienta de análisis de capacidad de proceso y gráficos de control, con la ayuda del programa WinStat v2003.1. La capacidad del proceso se calculó empleando el índice  $Cpk$  y se expresó en términos del número de fallos (lotes no conformes) esperados:

$$Cpk = \min \left[ \frac{L_{inf}}{3\sigma}, \frac{L_{sup}}{3\sigma} \right]$$

donde  $L_{inf}$  y  $L_{sup}$  son los límites inferior y superior de la especificación y  $\sigma$ , la desviación estándar de cada parámetro.

### **III.3 EXPERIMENTOS PARA DEFINIR MARCADORES DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Con el objetivo de evaluar el contenido de alergenios individuales como marcador de actividad biológica del extracto, en particular de alergenios del Grupo 1 para DS y DP; así como, de caracterizar el perfil alérgico de BT e identificar sus componentes más importantes, se diseñaron experimentos específicos.

#### **Correlación entre Der p 1/Der s 1 y la actividad biológica**

Se estudiaron 9 lotes de extractos alérgicos elaborados a escala piloto en forma liofilizada (5 de DP, 4 de DS) empleando el procedimiento de fabricación descrito, aunque sin ajuste de concentración antes de su liofilización. Fueron preparados a partir de cultivos con el mismo tiempo y Grado de Madurez, pero sin estandarización en cuanto a contenido de alergenios o proteínas; o sea, lotes esencialmente no estandarizados. A cada lote se le determinó el contenido de proteínas, Der p 1 y Der p 2 (para DP), y Der s 1 (para DS), empleando los ELISA-AcM respectivos (INDOOR, UK). Se determinó la potencia biológica *in vivo* mediante punción cutánea a 20 pacientes alérgicos adultos.<sup>127</sup>

#### **Aporte de Der s 1 a la actividad alérgica total**

Se evaluó la actividad alérgica *in-vitro* e *in-vivo* del alérgeno Der s 1 purificado con respecto al extracto alérgico total. Con ese fin, se purificó Der s 1 por inmunoafinidad, a partir del extracto completo de DS, empleando el AcM 4E10 acoplado a Sepharosa-CL4B (AP Biotech, UK).<sup>81</sup> El extracto de DS liofilizado se reconstituyó en PBS a 230 µg/mL de Der s 1 y se aplicó a la columna en PBS. Se colectó el eluato no retenido, depletado de Der s 1 y se eluyó posteriormente el Der s 1 retenido en la matriz, con tampón glicina–NaCl pH 11,5; el cual fue dializado de inmediato en PBS. Ambos preparados fueron liofilizados y analizados mediante SDS-PAGE. La pureza de Der s 1 fue de 95%, de acuerdo al análisis densitométrico (Image Master v4.0, AP Biotech, UK). El contenido de Der s 1 en ambos preparados fue determinado mediante ELISA-AcM. En el extracto depletado, el contenido residual de Der s 1 fue de 0,21 µg/mL (0,09% del contenido inicial). La actividad alérgica de Der s 1, así como del extracto completo y depletado de Der s 1, fue determinada mediante ELISA de inhibición de IgE, e *in-vivo* mediante prueba cutánea, en 26 pacientes alérgicos adultos. Para las pruebas cutáneas, ambos preparados liofilizados fueron resuspendidos en Solución Diluyente para Extractos Alérgicos VALERGEN (BIOCEN) y esterilizados por filtración a 0,2 µm. La concentración del Der s 1 purificado, para realizar la prueba cutánea, fue ajustada para coincidir con el contenido

de Der s 1 en el extracto: 135 µg/mL. Asimismo, la concentración de proteínas del extracto depletado de Der s 1 fue también ajustada hasta equipararse al extracto completo.

### **Caracterización de componentes alergénicos de *Blomia tropicalis***

Se caracterizó el perfil de proteínas y componentes alergénicos del extracto de BT mediante SDS-PAGE y Western Blotting IgE en condiciones reductoras y no reductoras. Los sueros analizados fueron extraídos de 12 pacientes con alergia respiratoria, positivos a la prueba cutánea con BT. En un segundo experimento, dirigido a determinar el papel alergénico de la fracción de peso molecular menor de 21 kDa ( $F_{<21K}$ ), se purificó la misma, primeramente mediante fraccionamiento del extracto alergénico de BT por precipitación con sulfato de amonio 50 %. Después de centrifugar a 10 000 g durante 10 min, se colectó el sobrenadante, que una vez dializado contra PBS fue aplicado a una columna cromatográfica XK 26/60 con matriz Sephadex G-50 superfina (AP Biotech, UK) a una velocidad de flujo de 3 mL/h. Se monitoreó la absorbancia a 280 nm y se colectó la fracción correspondiente a un peso molecular de 16-18 kDa, la cual fue liofilizada y analizada mediante SDS-PAGE. Su contenido de proteínas se determinó por el método de Lowry y col. y su actividad alergénica se evaluó mediante ELISA de inhibición de IgE con un pool de sueros, así como por ELISA-IgE directo con 41 sueros individuales. En ese mismo experimento, como comparadores, se emplearon los alérgenos recombinantes rBlo t 5 (expresado en *E. coli*), rBlo t 12 y rBlo t 13 (expresados en *P. pastoris*), suministrados por el Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena, Colombia.<sup>73,74</sup>

## **III.4 DISEÑO DE ESTUDIOS DE ESTABILIDAD**

### **Estabilidad del producto liofilizado**

Se realizó un estudio de estabilidad en tiempo real, con tres lotes industriales de cada producto: DP, DS y BT, en su presentación liofilizada, a dos temperaturas: 4°C (2- 8°C), con ensayos a los 6, 12, 18, 30, 42, 54, 60 y 66 meses; y a 37°C (36-38°C), con ensayos a los 3, 6 y 12 meses. Los índices de calidad principales fueron la potencia alergénica total, determinada mediante ELISA de inhibición de IgE, con respecto a la RI conservada a -70°C; y la composición alergénica, determinada mediante Western Blotting IgE con análisis densitométrico. En ambos métodos se empleó el mismo pool de sueros IgE, el cual se conservó también en forma liofilizada a -70 °C. Adicionalmente, se determinó la composición

de proteínas mediante SDS-PAGE, el pH y tiempo de reconstitución y las características organolépticas de la pastilla liofilizada. La esterilidad se evaluó al principio y final del estudio. Los límites de calidad fueron los descritos en la especificación de cada producto, con la excepción de la potencia alergénica total y de la composición alergénica, cuyos límites originales se modifican a no menos del 30 % del valor nominal, atendiendo a consideraciones estadísticas asociadas a la precisión de los ensayos y de acuerdo a lo estipulado para este tipo de producto en regulaciones internacionales.<sup>131,132,151</sup> La estabilidad de las RI fue también evaluada paralelamente mediante un estudio de estabilidad acelerada a tres temperaturas (-70°C, 4°C y 37°C) con ensayos a los 0, 3, 6 y 12 meses, determinándose la potencia alergénica total ( $C_{50}$  y  $P_R$  con respecto a -70°C) y el perfil de proteínas y alérgenos.

### **Estabilidad del producto reconstituido y diluciones**

Se diseñó un estudio de estabilidad a tiempo real de 12 meses de duración, con muestreos a los 0, 3, 6 y 12 meses. Se emplearon muestras de tres lotes consecutivos de cada producto a cuatro concentraciones diferentes: 20 000; 2000; 200 y 20 UB/mL; conservadas a 4°C, en posición normal e invertida (o sea, en contacto con el tapón). Como parámetro fundamental se determinó la potencia alergénica total, mediante ELISA de inhibición de IgE. Los cambios en la composición alergénica fueron estimados a partir de la diferencia en el paralelismo de las rectas de las muestras con respecto a la RI en dicho ensayo (Prueba *t* de Student,  $p= 0,05$ ). Se analizó, también, el contenido de Der s 1 y Der p 1, respectivamente para DS y DP, por ELISA con AcM (BIOCEN para Der s 1, INDOOR, UK para Der p 1) y se determinaron los cambios visuales en las características organolépticas y el pH.

### **Métodos estadísticos**

Se realizó el análisis de tendencia para los principales parámetros de calidad, mediante regresión lineal, asumiendo una cinética de degradación de primer orden y un nivel de significación de la pendiente  $p= 0,05$ . Se calculó la predicción del tiempo de vida, a partir de la ecuación de la recta:

$$\text{Log}(P_t) = K t + I$$

Donde *K* es la pendiente e *I* el intercepto. El tiempo para alcanzar el límite establecido en cuanto a potencia  $P_t= 0,3$ ; sería:

$$t_{P=0,3} = [\log(0,3) - I] / K$$

Para realizar la predicción mínima se tomó el límite inferior del IC95% de *K*. El procesamiento

estadístico se realizó con Microsoft Excel XP.

### **III.5 DISEÑO DE ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS**

#### **Estudios de toxicidad aguda**

Se realizaron según lo establecido por las Guías Nórdicas para el Registro de Productos Alergénicos.<sup>127</sup> Se utilizaron dos especies animales: ratones NMRI calidad SPF y curieles Hartley, suministrados por CENPALAB; divididos en dos grupos: en estudio con 10 animales, 5 de cada sexo y control con cuatro animales, dos de cada sexo. Se les aplicó al grupo en estudio 500 veces la dosis máxima por Kg de peso corporal, prevista para humanos: 1666 UB a los ratones y 25 000 UB a los curieles, por vía subcutánea. Al grupo control se le administró Solución Diluyente para Extractos Alergénicos VALERGEN. El ensayo se realizó en el Laboratorio de Ensayos Biológicos de BIOCEN con tres lotes consecutivos de cada producto DP, DS y BT. Se realizó la observación diaria de los animales en los siete días posteriores a la inyección, valorando la aparición de síntomas de toxicidad y muertes. Se controló el peso corporal al comienzo y final del ensayo y se efectuó la necropsia al final, para identificar posibles lesiones macroscópicas.

#### **Estudios de toxicidad por dosis repetida**

Se realizaron en dos especies animales de acuerdo a lo recomendado por las Guías Nórdicas para el Registro de Productos Alergénicos.<sup>127</sup> Los ensayos fueron realizados en el Centro de Toxicología Experimental de CENPALAB con los siguientes códigos:

TSDS0399: Extracto Alergénico de *D. siboney*, en ratones Cenp:NMRI

TSDS1100: Extracto Alergénico de *D. siboney*, en ratas Cenp:SPRD

TREA0299: Extracto Alergénico de *B. tropicalis*, en ratones Cenp:NMRI

TREA0300: Extracto Alergénico de *B. tropicalis*, en ratas Cenp:SPRD

En los ensayos en ratones se emplearon dos grupos con igual cantidad de animales (10 machos y 10 hembras), un grupo recibió el producto en estudio y el grupo control, la Solución Diluyente (que contiene fenol como preservo). En los estudios con ratas se incluyó un tercer grupo, también como control, al cual se le administró solución salina sin el preservo presente en el Diluyente. Se empleó una dosis de 1333 UB para las ratas y de 166 UB para los ratones, en cada inyección, 50 veces superior a la dosis máxima por Kg de peso corporal para uso clínico. Las inyecciones fueron administradas por vía subcutánea durante 28 días

consecutivos. Además de las observaciones clínicas, peso corporal y consumo de alimentos, se determinaron parámetros hematológicos (hemoglobina, hematocrito, leucocitos totales y conteo diferencial de leucocitos: neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos) y bioquímicos (proteínas totales, glucosa, creatinina, ácido úrico y nitrógeno ureico). Se realizó el estudio anátomo-patológico con observación microscópica de los órganos de interés y examen histológico del sitio de la inyección.

### **III.6 DISEÑO DE ENSAYOS CLÍNICOS DE DIAGNÓSTICO**

Se realizaron tres ensayos clínicos en adultos, uno por producto, en el Hospital “Calixto García” y un ensayo adicional en niños, en el Hospital Pediátrico “Juan Manuel Márquez”, este último con los tres productos simultáneamente, con vistas a evaluar su eficacia y seguridad en la prueba de punción cutánea. Los ensayos fueron abiertos, no aleatorizados y controlados. Participaron en cada uno 100 individuos, 50 pacientes con síntomas de alergia que acudieron consecutivamente a la consulta de alergología y 50 voluntarios no alérgicos. Los protocolos se analizaron y aprobaron por los Comités de Ética de los hospitales y por el CECMED. Se obtuvo el consentimiento de los participantes o de los padres o tutores.

#### **Criterios de inclusión y exclusión**

En los tres primeros estudios participaron adultos mayores de 16 años de ambos sexos. El otro estudio se realizó en niños entre 2 y 15 años de ambos sexos. En el grupo de alérgicos se incluyeron pacientes con historia clínica positiva de alergia (asma, rinitis y conjuntivitis) al polvo casero, reflejada en una encuesta preliminar. En el grupo de voluntarios no alérgicos, se incluyeron sujetos sin historia clínica de alergia. Se excluyeron los pacientes que recibieron inmunoterapia en los dos últimos años, así como, pacientes con síntomas de asma, rinitis o conjuntivitis en el momento de la prueba cutánea, o que hubieran usado medicamentos con posible interferencia en la misma. También se excluyeron mujeres embarazadas y pacientes con dermografismo en el área de la prueba, dermatitis atópica, urticaria o eccema.<sup>152</sup>

#### **Prueba Cutánea**

Se realizó según lo descrito anteriormente empleando nuestros extractos alergénicos de DP, DS y BT. Se emplearon también los siguientes extractos comerciales de DP, como productos de referencia: SoluPrick (ALK, Dinamarca, 10 000 BU/mL) y ALYOSTAL (Stallergenes, Francia, 100 IR/mL). Para distinguir claramente nuestros productos de los comerciales

hacemos uso de aquí en adelante de su marca registrada: VALERGEN®. Se emplearon dos dosis de VALERGEN-DS y BT: 20 000 y 2 000 UB/mL. Como control negativo se usó la Solución Diluyente para Extractos Alergénicos VALERGEN (BIOCEN) y como control positivo, histamina HCl 10 mg/mL.

### **Evaluación de las reacciones adversas**

Se empleó la siguiente clasificación para los eventos adversos esperados, consistentes en reacciones alérgicas: (i) Locales: habones y prurito en el área de la prueba, que persistan por más de 24 horas o que midan más de 15 mm; (ii) Focales (sistémicas grado I-III): reacciones a distancia, que toman un órgano de choque específico (rinitis, conjuntivitis, asma, urticaria, angioedema); (iii) Sistémicas (grado IV): shock anafiláctico.

### **Evaluación de la eficacia del diagnóstico**

El área de la reacción se calculó como:  $A = \pi d^2/4$ ; donde d es el diámetro promedio del habón entre ambos brazos. Se calculó la media geométrica y la mediana entre los pacientes positivos de cada grupo, con sus respectivos IC95%. La eficacia o exactitud diagnóstica de la prueba se determinó empleando las siguientes definiciones:<sup>153</sup>

- Sensibilidad (S): Porción de verdaderos positivos del total de sintomáticos:

$$S = VP/(VP + FN)$$

- Especificidad (E): Porción de verdaderos negativos del total de no sintomáticos:

$$E = VN/(FP + VN)$$

- Eficiencia diagnóstica (ED): Porción de resultados verdaderos (negativos o positivos) del total:

$$ED = (VP + VN) / (VP + VN + FP + FN)$$

Donde: VP: verdadero positivo, paciente sintomático (asma, rinitis, conjuntivitis), con prueba positiva; FN: falso negativo (FN), paciente sintomático, con prueba negativa; VN: verdadero negativo, persona no sintomática, con prueba negativa y FP: falso positivo, persona no sintomática, con prueba positiva.

### **Selección del tamaño de la muestra**

El número de pacientes ( $n$ ) necesarios para obtener una precisión determinada ( $\epsilon$ ) de los valores de sensibilidad o especificidad, se calculó mediante la siguiente expresión:

$$n = (K_{\alpha} s / \epsilon)^2$$

donde  $K_{\alpha}$  es el factor de confianza para un nivel  $\alpha$  y  $s$  la desviación estándar para una

proporción P:

$$s = [P(1-P)]^{1/2}$$

Se estimó que los valores de sensibilidad y especificidad se encontrarían entre 85 y 90 %. Entonces, para  $\alpha = 0,05$  y  $\varepsilon = 10$  %; obtenemos una  $n$  entre 35 y 49 sujetos. De ese modo, se seleccionaron 50 pacientes en cada grupo. Los cálculos se realizaron con la ayuda del programa para diseño de experimentos Glaxo-Wellcome C4-SDP v1.1.

### **Análisis estadístico de los resultados**

El ajuste a la normalidad de los datos, sometidos a una transformación logarítmica, se analizó mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov ( $p = 0,05$ ). Consiguientemente, se emplearon métodos paramétricos. Se compararon las medias geométricas del área del habón, mediante la prueba  $t$  de Student de muestras pareadas, en el caso de las comparaciones entre dos productos o dosis, y con ANOVA de datos pareados y prueba complementaria de Tukey, para las comparaciones entre más de dos productos o dosis. Se calcularon los intervalos del 95% de confianza ( $IC_{95\%}$ ) de los valores de sensibilidad, especificidad y eficiencia diagnóstica empleando la expresión:

$$IC_{95\%} = \pm 1,96 [V(1-V)/n]^{1/2}$$

donde  $V$ , es el valor correspondiente de cada parámetro. La comparación de la sensibilidad y la especificidad entre diferentes productos o dosis se realizó mediante la prueba de  $\chi^2$ . El procesamiento de los datos se realizó empleando Microsoft Excel XP y STATISTICA v6.0. El análisis de la curva ROC se realizó con el programa Graphpad Prism v4.0.

### **III.7 DISEÑO DE ENSAYOS CLÍNICOS DE INMUNOTERAPIA**

Se realizaron seis ensayos clínicos de inmunoterapia, dos para cada vacuna, con vistas a evaluar su eficacia y seguridad para el tratamiento del asma en pacientes alérgicos. La primera serie de tres ensayos se realizó en el Hospital “Calixto García” y la segunda en el Hospital “Joaquín Albarrán”. Todos los estudios fueron prospectivos, a doble ciegas controlados por placebo, siguiendo un diseño similar, con la diferencia de que en la primera serie se realizaron determinaciones de la función pulmonar; y en la segunda, de anticuerpos alérgeno-específicos. Los protocolos fueron aprobados por los Comités de Ética de los respectivos hospitales y por el CECMED y fueron inscritos en el Registro Público Cubano de Ensayos Clínicos (RPCEC).<sup>154</sup> Para identificar los diferentes ensayos en nuestro trabajo empleamos las abreviaturas descritas en la Tabla 4. Los estudios se realizaron de acuerdo a



los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki y en conformidad con las Buenas Prácticas Clínicas. Se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente.

### **Pacientes**

Cada grupo (Activo y Placebo) contó con 20 pacientes (con excepción del ensayo BT.1, que contó con 18 pacientes en el Activo y 17 en el Placebo). Los pacientes incluidos en el estudio fueron adultos entre 16 y 50 años, diagnosticados clínicamente como asmáticos persistentes leves o moderados<sup>155</sup> sensibilizados a DP, DS o BT, demostrado por prueba de punción cutánea positiva ( $d > 3$  mm) con los extractos alérgicos VALERGEN-DP, DS o BT, respectivamente, a 20 000 UB/mL. Se seleccionaron pacientes preferentemente mono-sensibilizados o con una respuesta cutánea preponderante hacia el alérgeno correspondiente a la vacuna. Se excluyeron los pacientes tratados previamente con IT en los dos años anteriores; los que presentaran eccema severo o estuvieran bajo tratamiento con beta-bloqueadores. También, los pacientes con enfermedad autoinmune o tumoral o que hubieran recibido tratamiento reciente con inmunoestimulantes, inmunosupresores o inmunomoduladores. Por último, se excluyeron las mujeres embarazadas y los pacientes donde el uso de la adrenalina estaba contraindicado.

### **Aleatorización**

La asignación del tratamiento fue aleatorizada con la ayuda del programa Glaxo Wellcome C4-SDP v1.1 módulo MAS, opción asignación aleatoria simple. La mitad de los pacientes en cada ensayo fueron asignados al tratamiento placebo.

### **Administración de la inmunoterapia**

Las vacunas se suministraron en un esquema de incremento de dosis, con inyecciones semanales durante las primeras 13 semanas y una fase de mantenimiento a la dosis máxima tolerada, con inyecciones mensuales, con una duración total de 12 meses (Tabla 5, Fig. 5). A los grupos Activo se les administraron las respectivas vacunas VALERGEN, vía subcutánea en la región deltoidea del brazo. A los grupos controles se les aplicó, de la misma forma, el placebo, consistente en Solución Diluyente para Extractos Alérgicos VALERGEN, indistinguible a simple vista del activo. La administración de la inyección se posponía si se presentaban síntomas de infección respiratoria o asma en los últimos tres días, o cualquier manifestación alérgica en el momento de la inyección.

Tabla 4. Identificación de los ensayos clínicos de inmunoterapia.

Ensa- yo	Producto	Hospital	N	Código CECMED	Código RPCEC
DP.1	VALERGEN-DP	"Calixto García"	40	045/40-251	RPCEC00000027
DS.1	VALERGEN-DS	"Calixto García"	40	044/40-261	RPCEC00000028
BT.1	VALERGEN-BT	"Calixto García"	35	043/40-271	RPCEC00000026
DP.2	VALERGEN-DP	"Joaquín Albarrán"	40	468/05-047-05B	RPCEC00000037
DS.2	VALERGEN-DS	"Joaquín Albarrán"	40	467/05-046-05B	RPCEC00000032
BT.2	VALERGEN-BT	"Joaquín Albarrán"	40	469/05-045-05B	RPCEC00000033

Tabla 5. Esquema de dosis durante la fase de incremento.

Semana	Concentración de la dilución (UB/mL)	Volumen inyectado (mL)	Dosis (UB)
1	20	0,2	4
2		0,5	10
3		1	20
4	200	0,2	40
5		0,5	100
6		1	200
7	2 000	0,2	400
8		0,4	800
9		0,6	1 200
10		0,8	1 600
11	20 000	0,1	2 000
12		0,2	4 000
13		0,3	6 000

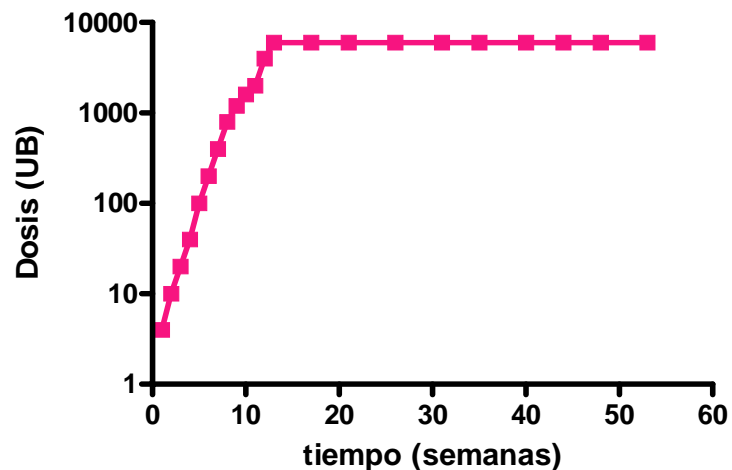


Fig. 5. Gráfico del esquema de dosis durante la inmunoterapia.

### **Tratamiento concomitante**

Los pacientes de ambos grupos utilizaron tratamiento farmacológico concomitante para el manejo de los síntomas alérgicos. Se podían emplear  $\beta$ -2 agonistas (Salbutamol inhalado), metilxantinas (Teofilina oral), Efedrina, Adrenalina, y esteroides (Prednisona). El consumo de tratamiento concomitante fue considerado una variable de eficacia.

### **Métodos para la evaluación de la eficacia**

- Puntuación de Síntomas y Medicación: Los síntomas clínicos (falta de aire, tos, expectoración, sibilancia y opresión torácica) fueron registrados diariamente por el paciente. Se asignó un punto por cada evento (frecuencia) y hasta tres puntos adicionales de acuerdo a su intensidad. El consumo de medicamentos fue también registrado por el paciente. A cada medicamento se le asignó el valor de un punto, excepto a los esteroides, con dos puntos. La puntuación de Síntomas y Medicación, es la suma de ambas puntuaciones.

- Sensibilidad cutánea: Se determinó mediante punción cutánea, realizada como se describió anteriormente. Como criterio cuantitativo se empleó el área del habón y la Reactividad Cutánea, expresada a través de la variable  $Ch_{10}$ ; que se define como la reactividad del alérgeno relativa a una solución de histamina 54,3 mmol/L. Se empleó la expresión:<sup>156</sup>

$$Ch_{10} = (A_a/A_h)^{2,5}$$

donde  $A_a$  es el área del habón del alérgeno y  $A_h$  es el área de la histamina. La prueba se realizó al inicio ( $t= 0$ ) y a los 6 y 12 meses. En la misma se determinó no sólo la reactividad al alérgeno de la vacuna, sino también, a las otras dos especies de ácaros, empleando también los respectivos extractos alérgicos VALERGEN, a 20 000 UB/mL.

- Determinación de la función respiratoria: El paciente realizó la medición diaria del Flujo Pico Espiratorio (FPE) empleando un medidor portátil (Ferraris, UK). El FPE se expresó como % del valor esperado (normal) para cada paciente.<sup>157,158</sup> Se calculó la variabilidad semanal del FPE (VFPE) según la expresión:

$$VFPE = [(FPE_{max} - FPE_{min}) / FPE_{max}] \times 100 \%$$

donde  $FPE_{min}$  y  $FPE_{max}$  son los valores mínimos y máximos, observados durante una semana. La Clasificación de la Función Respiratoria se determinó como variable categórica según la Tabla 6,<sup>158</sup> basándose en los valores promedios de FPE y VFPE en los dos últimos meses previos a cada corte.

- Criterio de eficacia general del tratamiento: Se estableció una evaluación individual de cada

paciente con respecto a los niveles pre-tratamiento, con la emisión de un Criterio General de Mejoría (CGM). Como variable principal para determinar el CGM se empleó la Puntuación de Síntomas y Medicación, teniendo en cuenta también el comportamiento de la Reactividad Cutánea y la Clasificación de la Función Respiratoria (en los estudios donde se empleó esta última) según la Tabla 7. El CGM se consideró como una variable categórica con los siguientes valores numéricos: mejor, +1; igual, 0; peor, -1.

- Determinación de anticuerpos: Se determinaron los niveles séricos de IgE total, así como de IgE e IgG4 alérgeno-específicos, mediante ELISA. Para la IgE total se usó un ELISA tipo sandwich, con el AcM anti-IgE humana (E1, CIE) fijado a la fase sólida y otro AcM anti-IgE (E2, CIE) conjugado con peroxidasa como anticuerpo revelador (dilución 1:1000). Para los anticuerpos específicos se utilizó un ELISA directo, con el antígeno fijado a la fase sólida: placas MaxiSorp (Nunc) recubiertas con los respectivos extractos alérgicos, a 4000 UB/mL para BT y a 1000 UB/mL para DP y DS. Se reveló con un AcM anti-IgG4 humano biotinilado (Pharmingen), o con el mismo AcM anti-IgE descrito anteriormente. En las tres técnicas, se empleó un suero de referencia interno del Laboratorio de Alérgenos de BIOCEN (pool de sueros liofilizado). Los niveles de anticuerpos se expresaron en unidades relativas de Densidad Óptica; o sea, el valor 1 es equivalente al suero de referencia. Las determinaciones se realizaron al inicio y a los 6 y 12 meses. En todos los casos se analizaron al menos dos réplicas y los resultados se calcularon como el promedio de ambas.

### **Métodos para la evaluación de la seguridad**

La seguridad se evaluó a través de la frecuencia y gravedad de los eventos adversos, en particular, las reacciones alérgicas, consideradas como eventos adversos esperados. Las reacciones fueron clasificadas como inmediatas si se producían en los primeros 30 min después de la inyección, y tardías, dentro de 48 h. Las reacciones alérgicas se clasificaron en locales y sistémicas, de acuerdo a la definición de la Organización Mundial de la Alergia:<sup>99</sup> Sistémicas Tipo 0: síntomas inespecíficos; Tipo I: rinitis o asma ligera, urticaria localizada; Tipo II: asma moderada, urticaria generalizada de aparición lenta; Tipo III: asma severa, angioedema, urticaria generalizada de aparición rápida; Tipo IV: shock anafiláctico. Se le asignaron puntos en una escala de 0 a 4, respectivamente.

### **Métodos estadísticos**

Se emplearon los programas Microsoft Excel XP y STATISTICA v.6.0. Se analizó la

Tabla 6. Definición de los valores de la variable Clasificación de la Función Respiratoria.

Valor nominal	Valor numérico	Condiciones
Normal	0	FPE $\geq$ 80 % y VFPE $\leq$ 20 %.
Obstrucción ligera	1	FPE $\geq$ 80 % ó 20% < VFPE $\leq$ 30%.
Obstrucción moderada	2	60 % < FPE < 80 % ó VFPE > 30%.
Obstrucción severa	3	FPE $\leq$ 60% y VFPE > 30%.

FPE: Flujo pico espiratorio

VFPE: Variabilidad del FPE

Tabla 7. Definición de la variable categórica Criterio General de Mejoría (CGM), en dependencia de las variables primarias. Los valores porcentuales son referidos a t = 0.

Variables categóricas	Valores de CGM		
	Mejor (+1)	Igual (0)	Peor (-1)
Síntomas y Medicación	< 60 %	No clasificados como mejor o peor	> 100 %
Reactividad Cutánea (Ch10)	No empeora: < 1 log		No mejora: > - 1 log
Clasificación de la Función Respiratoria	No aumenta		No disminuye

Tabla 8. Variables de eficacia e hipótesis del ensayo clínico.

Variable	Tipo	Hipótesis del ensayo clínico
Puntuación de síntomas	Cuantitativa discreta	Reducción (p= 0,05)
Puntuación de medicación		
Reactividad cutánea (Ch <sub>10</sub> )	Cuantitativa continua	Reducción en 10 veces
Flujo Pico Espiratorio (FPE)		Aumento
Variabilidad FPE		Reducción
IgE total		No incremento
IgE específica		Reducción
IgG4		Incremento
Criterio General de Mejoría (CGM)	Categórica	> 70 % pacientes mejor

distribución de cada variable, evaluando su ajuste a la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro-Wilks. A todas las variables (excepto a la Reactividad Cutánea, Ch<sub>10</sub>) se les aplicaron métodos no-paramétricos. Las comparaciones entre grupos se realizaron empleando la prueba U de Mann-Whitney, y dentro de cada grupo, mediante la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas. En el caso de Ch<sub>10</sub>, se realizó una transformación logarítmica y se aplicaron métodos paramétricos: la prueba *t* de Student para la comparación entre Activo y Placebo, y la prueba *t* de Student con datos pareados para la comparación dentro de un mismo grupo. En la Tabla 8 se describen las variables de eficacia y su relación con la hipótesis de cada ensayo clínico.

Para la determinación del tamaño muestral, se empleó el paquete estadístico Glaxo Wellcome C4-SDP. Se calculó la muestra necesaria para obtener una diferencia significativa entre la proporción de individuos con mejoría en el grupo tratado ( $p_2$ ) con respecto al grupo control ( $p_1$ ). Se tomaron como valores de referencia los descritos en el meta-análisis publicado por Abramson:<sup>90</sup>  $p_1 = 0,75$  y  $p_2 = 0,219$ . El número mínimo de sujetos necesarios ( $n$ ) en cada uno de los grupos se calculó como:

$$n = \{z_{(1-\alpha)} [(p_1 + p_2)(1 - p_1 - p_2)]^{1/2} + z_{(1-\beta)}(1 - p_1) + (p_2 (1 - p_2)^{1/2})\}^2 / (p_1 - p_2)^2$$

donde:  $z_{(1-\alpha)}$  y  $z_{(1-\beta)}$  son los valores de la desviación estándar correspondientes al riesgo  $\alpha = 0,05$  y  $\beta = 0,10$ . Se obtuvo como resultado:  $n = 14$ . Teniendo en cuenta las posibles pérdidas de sujetos durante el estudio se estableció una  $n = 20$  para cada grupo.

### **III.8 META-ANÁLISIS DE ENSAYOS CLÍNICOS DE INMUNOTERAPIA**

Se realizó un meta-análisis de los seis ensayos clínicos de IT siguiendo la metodología descrita por la Cochrane Library,<sup>159</sup> empleando las siguientes variables continuas:

- Síntomas y Medicación (SM): diferencia de promedios entre Activo y Placebo (Mean Difference, MD, siglas en inglés), relativa al placebo:  $MD [SM] = (M_p - M_a) / M_p$
- Reactividad cutánea: diferencia de promedios de Log(Ch<sub>10</sub>):  $MD [\log Ch_{10}] = M_p - M_a$
- VFPE: diferencia de promedios relativa al placebo.:  $MD [VFPE] = (M_p - M_a) / M_p$
- Niveles de anticuerpos (IgE<sub>tot</sub>, IgE<sub>esp</sub>, IgG4): diferencia de promedios:  $MD = M_p - M_a$

Se emplearon variables dicotómicas para la evaluación de la eficacia clínica (CGM), la mejoría en la función respiratoria y la evaluación de la frecuencia de eventos adversos. Con ese propósito se construyó la siguiente tabla para cada ensayo:

Grupo	Evento	No evento	Total
Activo	$a_i$	$b_i$	$n_{1i}$
Control (Placebo)	$c_i$	$d_i$	$n_{2i}$

Se empleó la Razón de Tasas (Odds Ratio, OR) para la evaluación de las variables dicotómicas de eficacia, según la expresión:

$$OR_i = a_i d_i / b_i c_i$$

Se empleó la Razón de Riesgos (Risk Ratio, RR) para la evaluación de la frecuencia de eventos adversos:

$$RR_i = (a_i/n_{1i}) / (c_i/n_{2i})$$

Los resultados de los diferentes ensayos fueron combinados empleando el método de la varianza inversa. Para cada estudio se calculó un factor de ponderación:

$$w = 1/Var$$

El efecto ponderado ( $E$ ) se calculó como: 
$$E = \frac{\sum w_i E_i}{\sum w_i}$$

Donde  $E_i$  es el efecto promedio de cada ensayo (diferencia de promedios, MD, para las variables continuas y  $\ln(OR)$  o  $\ln(RR)$  para las dicotómicas). Empleando esta misma metodología<sup>159</sup> se calculó el IC95% del efecto combinado. Para cada variable y conjunto de ensayos se realizó la prueba de heterogeneidad  $\chi^2$ ,  $p = 0,05$ . También se aplicó dicha prueba para evaluar la heterogeneidad entre ensayos, de las características iniciales y demográficas de la población.

**CAPÍTULO IV**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## IV. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.1 DEFINICIÓN DE LOS COMPONENTES ALERGÉNICOS PRINCIPALES COMO MARCADORES DE LA ACTIVIDAD ALERGÉNICA TOTAL

Las vacunas o extractos alérgicos son una mezcla compleja de biomoléculas, fundamentalmente proteínas. En el caso de los ácaros, la actividad alérgica del extracto está repartida entre varias proteínas (se han identificado 22), aunque se presume que la mayor parte se concentra en los Alérgenos Mayores. Para el género *Dermatophagoides*, éstos son los alérgenos del Grupo 1 (Der p 1, Der s 1) y del Grupo 2 (Der p 2, Der s 2). La estandarización persigue, en primer lugar, obtener un producto con una actividad biológica consistente lote a lote. En ese sentido, es esencial definir primeramente el concepto y la forma de medir la actividad biológica o potencia del producto. Los sistemas de estandarización se han basado en dos principios: (i) La determinación de la actividad alérgica total, por pruebas cutáneas en pacientes o mediante inmunoensayos IgE *in vitro* con un pool de sueros de pacientes; y (ii) la determinación del contenido de algunos Alérgenos Mayores, usualmente mediante inmunoensayos específicos, que se emplean así como marcadores de la actividad alérgica total.<sup>121</sup>

De ese modo, para el diseño de un sistema de estandarización adecuado para nuestros productos, a partir del conocimiento existente sobre los alérgenos de ácaros, fue necesario llevar a cabo experimentos específicos para determinar en nuestra población, la correlación, entre la actividad alérgica total y el contenido de Alérgenos Mayores, particularmente del Grupo 1; así como medir el aporte concreto de este alérgeno en la actividad alérgica total del producto, aspectos abordados en los dos primeros estudios de este acápite.

Por otra parte, en el caso de la especie *Blomia tropicalis* (BT), el conocimiento sobre sus alérgenos era casi inexistente al inicio de nuestro trabajo.<sup>160</sup> Solamente, en los últimos años se han logrado identificar, a partir de ADNc, 12 proteínas alérgicas provenientes de BT.<sup>72</sup> A diferencia de *Dermatophagoides*, no hay todavía una clara definición de sus Alérgenos Mayores. Blo t 5 es hasta ahora el único alérgeno que ha mostrado consistentemente alta frecuencia de unión de IgE, aunque los estudios se han realizado mayormente con la proteína en forma recombinante. Blo t 1 (Grupo 1) y Blo t 2 (Grupo 2), no presentan una importancia comparable a sus homólogos de *Dermatophagoides*.<sup>161</sup> Tampoco existen aún ensayos para

alergenos individuales de BT que puedan ser empleados confiablemente como métodos analíticos. De ese modo, para el diseño de un sistema de estandarización para BT sería esencial identificar las diferentes proteínas alergénicas de los extractos y establecer su importancia en términos de frecuencia e intensidad de unión de anticuerpos IgE, en nuestra población. Con ese objetivo se realizó el tercer estudio de este acápite.

#### **IV.1.1 Correlación entre el contenido de alergenios del Grupo 1 y la actividad alergénica total**

La potencia biológica de nueve lotes de extractos alergénicos de DP y DS, elaborados sin la aplicación del sistema de estandarización, resultó muy variable, con valores entre 2055 y 20 009 UB/mg de polvo liofilizado (CV Geométrico: 47-213%). El contenido de alergenios del Grupo 1 (Der p 1 y Der s 1) fue también bastante variable, entre 7,6 y 70,9 µg/mg (CV: 75%), representando de 2 a 11,7 % de las proteínas totales. El contenido de Der p 2 en los cuatro lotes de DP varió entre 1,2 y 10,9 µg/mg (0,3 – 1,1 % del total de proteínas). O sea, en general, los lotes mostraron una variabilidad de un factor de 10 en su actividad y contenido de Alergenios Mayores. La proporción promedio entre Der p 1 y Der p 2 fue de 7,7 a 1. Por otra parte, se obtuvo un alto grado de correlación significativa ( $r = 0,88$ ) entre el contenido de Grupo 1 y la actividad biológica (Tabla 9, Fig. 6). La equivalencia entre ambos parámetros fue de 4,0 ng de Grupo 1 por UB ( $IC_{95\%}$ : 2,9-5,7). La correlación entre el contenido de proteínas y la actividad no alcanzó a ser significativa ( $p > 0,05$ ). Los resultados indican claramente la necesidad de la estandarización del proceso para reducir la variabilidad entre lotes y sustentan la introducción del uso del contenido de Der p 1 y Der s 1 como marcador de la potencia alergénica total del extracto.

#### **IV.1.2 Aporte de Der s 1 a la actividad alergénica total**

De acuerdo al experimento anterior, el contenido de Der p 1 o Der s 1 sería determinante para la actividad alergénica total de los extractos de DP o DS, respectivamente, a pesar de la presencia de otros alergenios importantes. Con el objetivo de determinar el aporte concreto de Der s 1 a la actividad alergénica total, se llevó a cabo el presente experimento, en el cual se evaluó la actividad del Der s 1 inmunopurificado y del extracto depletado de Der s 1, en comparación con el extracto completo de DS, tanto por métodos *in-vitro* (inhibición de IgE), como *in-vivo* (pruebas cutáneas). El perfil de SDS-PAGE de los preparados se muestra en la Fig. 7.

Tabla 9. Coeficientes de correlación (Pearson) calculados entre la potencia biológica, el contenido de Der s 1/Der p 1 y el contenido de proteínas en el extracto alergénico liofilizado.

	Potencia	Der p 1/Der s 1	Proteínas
Potencia biológica [UB/mg]	-	$r = 0,88$ N= 9; p= 0,002	$r = 0,56$ N= 9; p= 0,120
Der p1/Der s1 [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ ]	$r = 0,88$ N= 9; p= 0,002	-	$r = 0,64$ N= 9; p= 0,061
Proteínas [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ ]	$r = 0,56$ N= 9; p= 0,120	$r = 0,64$ N= 9; p= 0,061	-

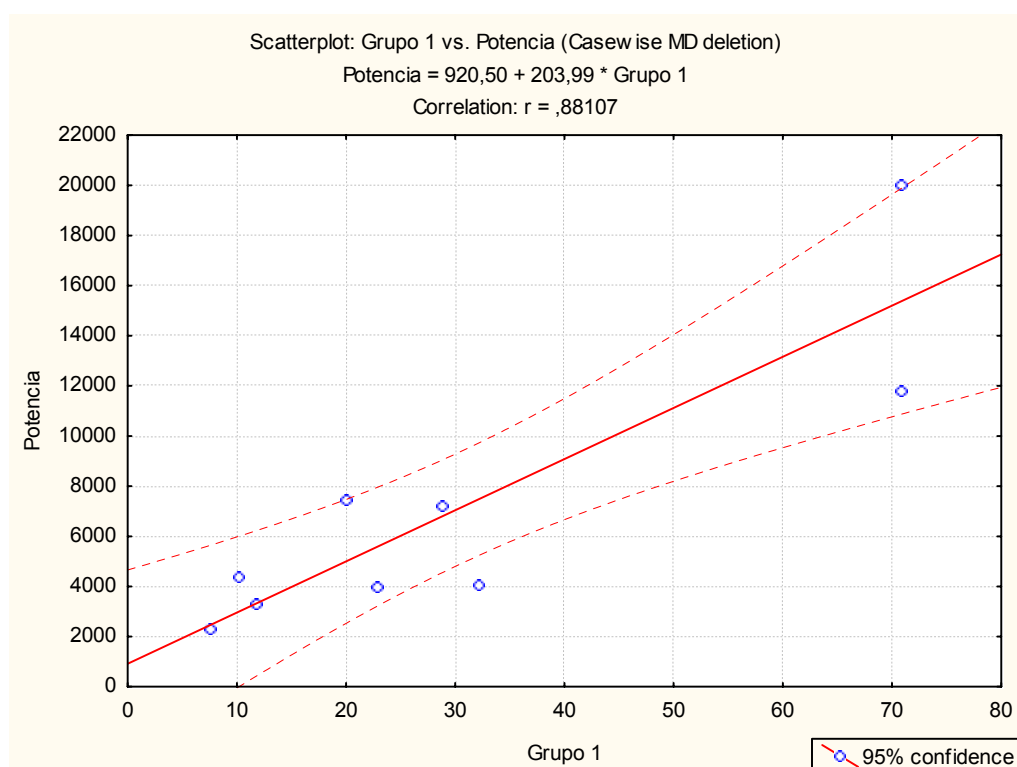


Fig. 6. Correlación entre la potencia biológica y el contenido de alergenos del Grupo 1 en diferentes lotes (n= 9) de extractos alergénicos de DP y DS (programa Statistica v6.0).

De 26 pacientes positivos en la prueba cutánea al extracto completo, solamente 15 (58%) mostraron resultados positivos a Der s 1, mientras que 96% lo fueron al extracto depletado de Der s 1. Solo un paciente (4%) resultó positivo a Der s 1 y negativo al extracto depletado. En contraste, la actividad biológica, calculada a partir del área de la reacción cutánea, resultó similar entre las dos fracciones del extracto: Der s 1 y depletado, con valores que representaron el 49 y 52%, respectivamente, de la actividad del extracto completo (Fig. 8). No obstante, las diferencias no resultaron significativas debido a la imprecisión del método biológico. Una comparación más precisa se realizó teniendo en cuenta solamente los pacientes que resultaron positivos simultáneamente a los tres preparados (n= 14), que permite emplear una prueba estadística con datos pareados. En ese caso, la actividad del depletado fue del 48 %, mientras que Der s 1, alcanzó apenas 28 % de la actividad del extracto completo y la diferencia fue significativa (ANOVA, prueba de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Por otra parte, Der s 1 fue capaz de inhibir *in-vitro* hasta el 82 % de la actividad de unión de IgE del extracto completo (Fig. 9), aunque la curva de inhibición mostró una meseta de saturación a partir de aproximadamente 70%. Este resultado indica que una parte importante de la IgE presente en el pool de sueros de pacientes alérgicos, estaba dirigida a otros alérgenos. Congruentemente, el extracto depletado de Der s 1 alcanzó un valor máximo de inhibición similar: 62.5%.

De ese modo, a pesar de la relativa baja frecuencia de reconocimiento de Der s 1, observada en este estudio, el aporte de este alérgeno a la actividad total del extracto, tanto *in-vivo* como *in-vitro*, fue de cerca de la mitad, mientras que el resto de los componentes aportó la otra mitad. Se confirma así la clasificación de Der s 1 como Alérgeno Mayor, respondiendo no solamente al criterio de más de 50% de frecuencia de reconocimiento, sino también al propuesto por expertos internacionales,<sup>39</sup> de más del 10 % de aporte a la actividad total del extracto. Por otra parte, la alta frecuencia de reconocimiento del extracto depletado evidenció la importancia del resto de los alérgenos que necesitan ser tomados en cuenta para la correcta estandarización del producto.

#### **IV.1.3 Caracterización de componentes alérgicos de *Blomia tropicalis***

En este estudio se caracterizó el perfil de componentes alérgicos del extracto de BT, en cuanto a intensidad y frecuencia de unión de IgE mediante Western Blotting. La composición de proteínas de BT, analizada mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras, evidenció al

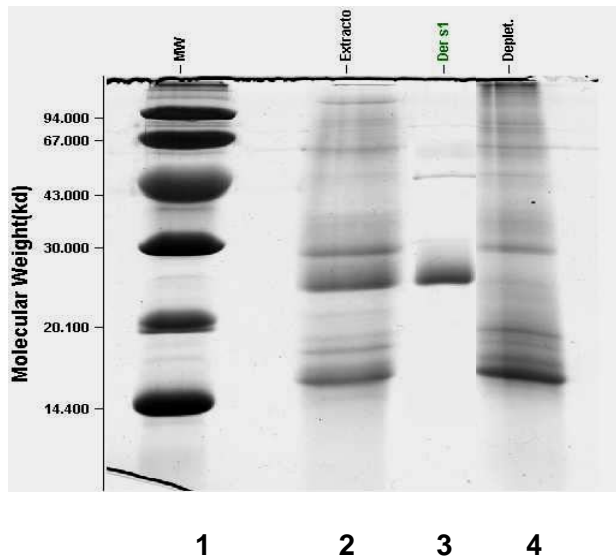


Fig. 7. SDS-PAGE de los diferentes preparados alérgicos de DS. Carril 1: patrón de peso molecular (MW). Carril 2: Extracto completo de DS. Carril 3: Der s 1 inmunopurificado. Carril 4: Extracto de DS depletado de Der s 1. La pureza de Der s 1 alcanzó 95% de acuerdo al análisis densitométrico de este gel.

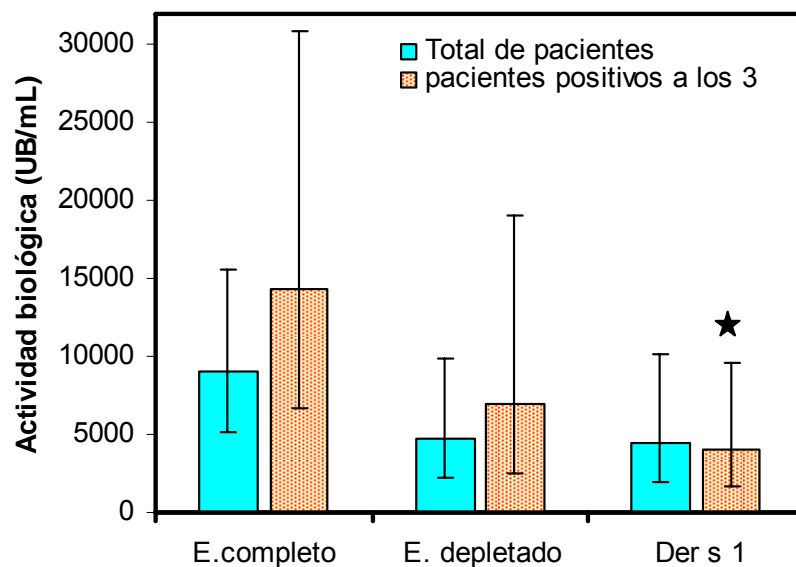


Fig. 8. Actividad biológica de Der s 1 purificado, extracto completo de DS y extracto depletado de Der s 1, determinado mediante la prueba de punción cutánea. Se muestran los resultados obtenidos en el conjunto de pacientes (n= 26), así como solamente, en los que resultaron positivos simultáneamente a los tres preparados (n= 14). Las barras verticales muestran el intervalo de confianza del 95%. (★) Diferencia significativa con respecto al extracto completo ( $p < 0,05$  ANOVA prueba de Tukey).

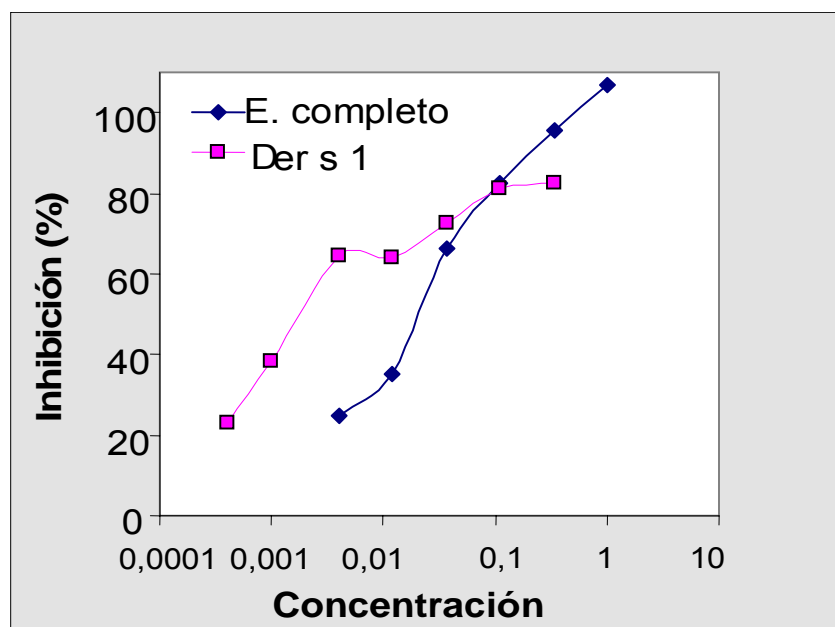


Fig. 9. Resultados del ELISA de inhibición de IgE, del Der s 1 purificado en comparación con el extracto completo de DS. Der s 1 alcanza un valor máximo de inhibición del 82% con una semi-meseta en ~70 %. Los valores de concentración son relativos a la concentración de partida empleada en el ensayo (valor de 1).

menos 15 componentes con pesos moleculares entre 10 y 90 kDa. La fracción de 12-21 kDa fue la mayoritaria (40-50%) en cuanto a contenido (Fig. 10). El perfil de unión de IgE reveló al menos 38 proteínas alergénicas mayores de 10 kDa (Fig. 11). Las bandas reconocidas con mayor frecuencia fueron las de 14 y 16 kDa; las cuales pudieran corresponderse con alguno de los alérgenos publicados: Blo t 5, Blo t 12, Blo t 13, Blo t 2 o Blo t 21. Estas bandas se desplazan en condiciones reductoras hacia 16 y 18 kDa (Fig. 12), coincidiendo aproximadamente, con el peso molecular descrito para Blo t 5 en SDS-PAGE: 17 kDa.<sup>70</sup> Otra banda importante se situó a 22 kDa en condiciones no reductoras (Fig. 11), la cual se desplaza a cerca de 30 kDa en presencia del agente reductor y se resuelve en al menos tres bandas. Las mismas, aunque con menor frecuencia de reconocimiento, suelen ser intensas en algunos pacientes, según se muestra en la Fig. 12 (donde se empleó un pool de sueros que reconoce preponderantemente dicha fracción), y se corresponden con los pesos moleculares de Blo t 1, Blo t 3, Blo t 6, Blo t 10 y los dímeros de Blo t 5 y Blo t 21.<sup>44</sup> Hasta el momento no se ha logrado una identificación más precisa que requeriría de métodos de secuenciación peptídica.

En una segunda etapa de este estudio, la fracción de peso molecular menor de 21 kDa ( $F_{<21K}$ ), purificada mediante cromatografía de exclusión molecular, demostró una positividad por ELISA IgE, del 61 % en 41 pacientes alérgicos positivos al extracto completo; y logró inhibir hasta el 69% de la IgE del pool de sueros, por ELISA de inhibición (Fig. 13). La curva de inhibición resultó claramente no paralela con respecto al extracto completo, indicando diferencias en cuanto a composición, atribuibles a la ausencia de los alérgenos de mayor peso molecular.  $F_{<21K}$  mostró dos bandas principales a 16 y 18 kDa con más de 80% de pureza, según SDS-PAGE, cuya actividad fue confirmada mediante WB-IgE. En ese mismo experimento, la positividad de los sueros a los alérgenos recombinantes rBlo t 5, rBlo t 12 y rBlo t 13, por ELISA, fue de 77, 37 y 54%, respectivamente. Los niveles de IgE a rBlo t 5, rBlo t 12 y rBlo t 13 estuvieron correlacionados significativamente con respecto a  $F_{<21K}$  ( $r_{\text{Spearman}} = 0,67; 0,56$  y  $0,47$ ; respectivamente;  $p < 0,002$ ), sugiriendo la presencia de los alérgenos nativos homólogos, y particularmente de Blo t 5, en dicha fracción.

#### **IV.1.4 Discusión del sistema de estandarización**

La definición de un método de potencia basado en la actividad biológica es una pieza clave para la estandarización de los productos. Existen dos vertientes con ventajas y desventajas cada una, los métodos que determinan actividad alérgica total (IgE) empleando pool de

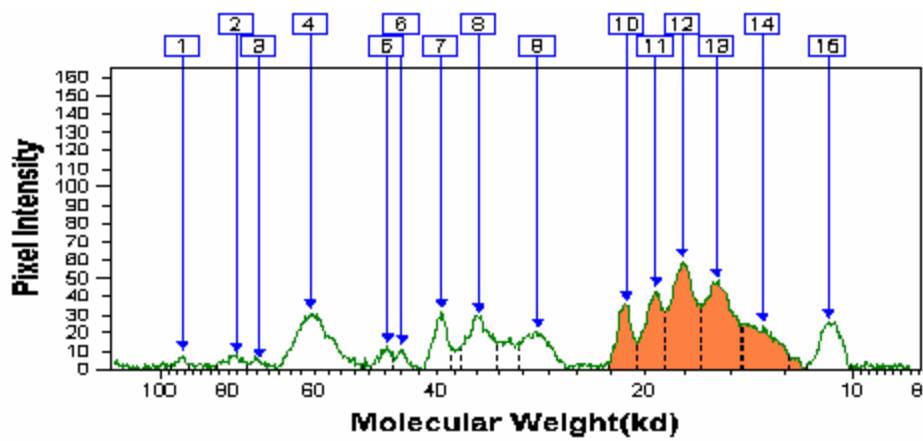


Fig. 10. Perfil de composición de proteínas (SDS-PAGE) del extracto alergénico de BT en condiciones reductoras. La fracción mayoritaria, coloreada en naranja, es la de 12 a 21 kDa (picos del 10 al 14).

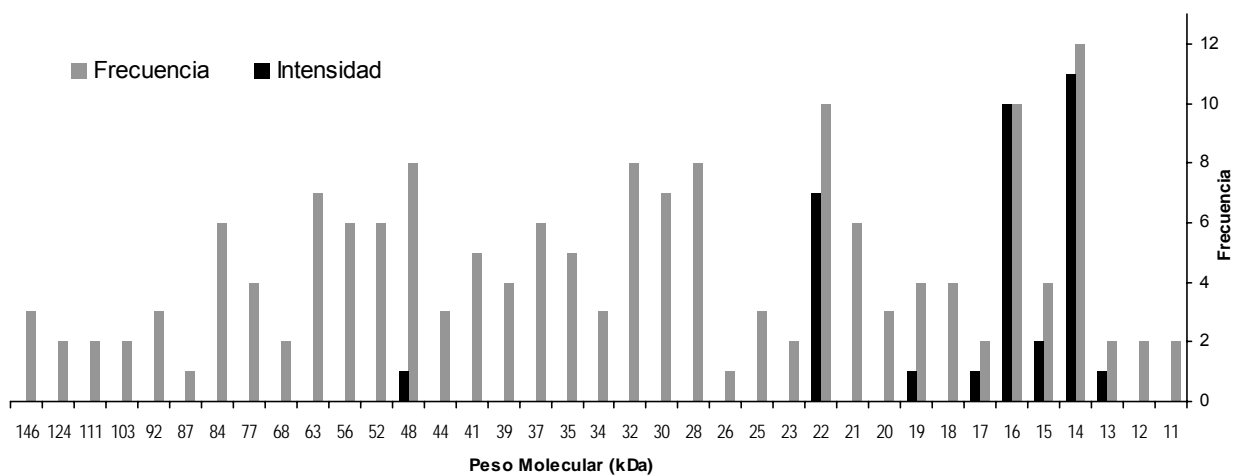


Fig. 11. Perfil de unión de IgE del extracto alergénico de BT, determinado mediante Western Blotting con sueros de 12 pacientes. Las bandas con mayor frecuencia e intensidad se encuentran en la región de 14 a 16 kDa. La técnica se realizó a partir de un SDS-PAGE en condiciones no reductoras.



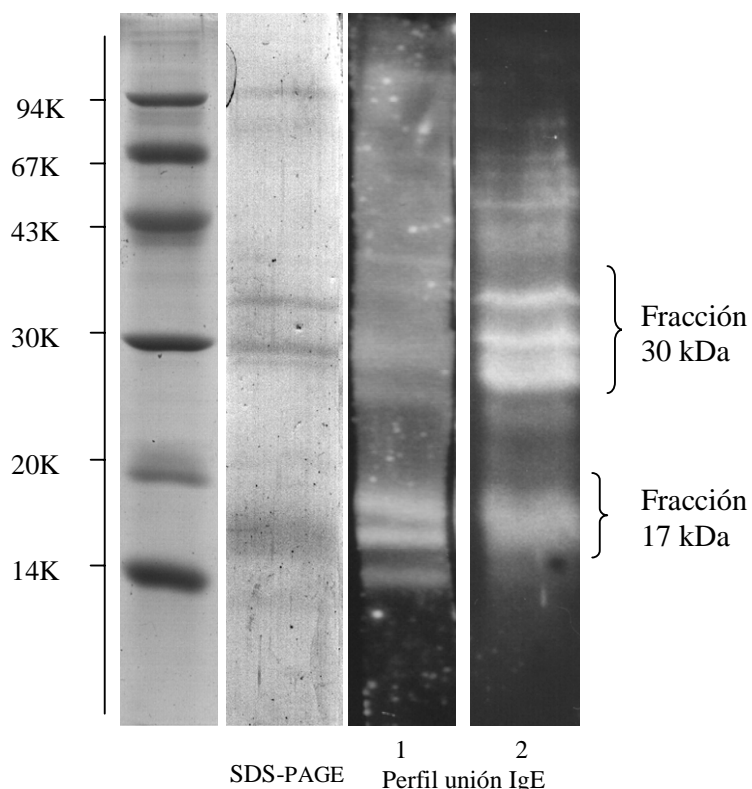


Fig. 12. Comparación del perfil de proteínas (SDS-PAGE) y de actividad alérgica IgE (WB-ECL) del extracto de BT en condiciones reductoras, empleando dos variantes de pool de sueros: (1) pool representativo de la reactividad promedio y (2) pool de pacientes seleccionados que reconocen preponderantemente a los alérgenos de la fracción de 30 kDa.

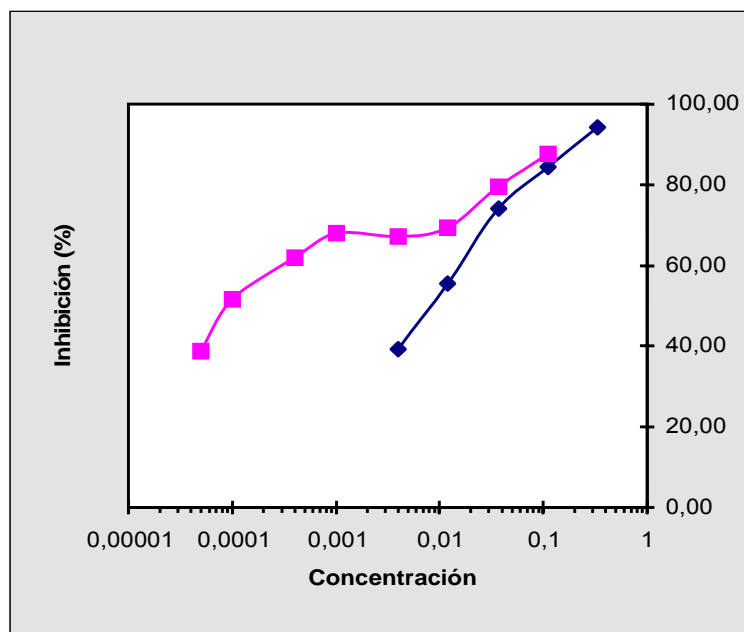


Fig. 13. Resultados del ELISA de inhibición de IgE de la fracción de peso molecular menor de 21 kDa ( $F_{<21K}</math>) (■), en comparación al extracto completo de BT (◆), mostrando una meseta en 69%. Los valores de concentración son relativos a la concentración de partida empleada en el ensayo (valor de 1).$

sueros o pruebas cutáneas en pacientes, o aquellos que determinan solamente componentes individuales, o sea, Alergenos Mayores. La determinación de los mismos se realiza usualmente empleando ELISA-AcM, método que ofrece ventajas tecnológicas y prácticas con respecto a los ensayos basados en IgE sérica. Ésta es la tendencia predominante en la actualidad, ya que también permitiría, potencialmente, comparar productos de diferentes fabricantes.<sup>122,126</sup>

En el caso de los ácaros, donde existe un amplio espectro de alergenios, la selección de un marcador individual único no es evidente. Se conoce extensamente de la bibliografía, el importante papel de Der p 1 en los extractos de DP. En particular, la correlación entre Der p 1 y la actividad total ha evidenciado valores elevados (por ej,  $r = 0,785$ ).<sup>98</sup> Los resultados del primer experimento con DS demostraron, por primera vez, la correlación entre Der s 1 y la actividad total *in-vivo*, ( $r = 0,88$ ), así como la preponderancia de este componente en nuestros extractos, en cuanto a contenido; apoyando su empleo como marcador de potencia. No obstante, los resultados del segundo experimento evidenciaron también el aporte del resto de los alergenios, en cerca de la mitad de la actividad total, de modo que no pueden dejar de ser considerados. Estos datos están en correspondencia con estudios similares realizados con Der p 1 o Der f 1, en los cuales se demostró que estos alergenios responden por el 30-70% de la actividad total del extracto.<sup>45,57,58,162,163</sup>

De esa forma, la estrategia óptima sería la combinación de ambos métodos analíticos, en particular, el empleo de la determinación de Der p 1 o Der s 1 en etapas intermedias del proceso que permitan los ajustes necesarios para garantizar la consistencia del producto final y el uso de los ensayos basados en IgE solamente como métodos de control de calidad del producto final. Este enfoque es permitido por la guía ICH para el desarrollo de métodos analíticos de productos biológicos y biotecnológicos.<sup>164</sup>

Para la determinación de la actividad biológica se empleó la definición de UB de las Guías Nórdicas,<sup>127</sup> método adoptado también por una gran parte de las empresas europeas. Una de las ventajas del mismo radica en el uso del patrón de histamina en la prueba cutánea, que lo hace más reproducible.<sup>165</sup> No obstante, su dependencia de la selección de pacientes<sup>166,167</sup> y la ausencia de patrones internacionales hacen todavía difícil la comparación entre fabricantes. También, por definición, el sistema de estandarización biológica es dependiente del grado de sensibilización a un alergeno dado en una población determinada, o sea, no necesariamente

las UB determinadas en Europa tienen que corresponderse con las nuestras. De acuerdo a nuestros resultados, 1 UB equivaldría a 4 ng de Der p 1 o Der s 1, valor algo superior, aunque no lejano, a lo informado en otros estudios en poblaciones europeas: entre 0,3 y 3,8 ng.<sup>128,168</sup> No obstante, los datos en ese sentido escasean y no son muy confiables.<sup>169</sup> Se necesitarían experimentos diseñados al efecto con una mayor muestra poblacional y lotes correctamente estandarizados para arribar a conclusiones.

La aplicación del método de actividad total (IgE) es obvia para el caso de BT, donde no se cuenta con ensayos adecuados para alergenios individuales. Los métodos que determinan la composición alérgica de forma cualitativa o semi-cuantitativa, a partir de un perfil de pesos moleculares aportan información complementaria al ensayo de potencia y son necesarios para la estandarización del producto.<sup>127,131</sup> En el caso de *Dermatophagoides*, el perfil alérgico y su correspondencia con los Alergenios Mayores son conocidos.<sup>78,80</sup> Para BT, el presente trabajo permitió definir el perfil de unión de IgE en nuestra población, el cual mostró una preponderancia de los alergenios de bajo peso molecular (12-21 kDa), similar a lo descrito en otras zonas tropicales<sup>170</sup> y particularmente, en una población étnica y geográficamente similar en Cartagena, Colombia.<sup>40</sup> Nuestros resultados sugieren la presencia en esa fracción de Blo t 5, Blo t 12 y Blo t 13. Un estudio posterior, realizado con AcM contra rBlo t 13, generados por nuestro grupo, permitió confirmar la presencia de Blo t 13 en la misma.<sup>82</sup>

De modo general, se demostró la relevancia de los componentes de 16-18 kDa en el contexto general del extracto de BT, a pesar de la presencia de otros componentes alérgicos de cierta importancia alrededor de 30 kDa. De esa forma, sería recomendable la implementación de criterios de calidad que se basen en la determinación de F<sub><21K</sub> y de las bandas de 16-18 kDa. La selección de condiciones reductoras para el SDS-PAGE y el WB-IgE favoreció la obtención de un perfil característico para BT, diferente a DP o DS, lo cual sería una ventaja para la identificación del producto mediante estas técnicas como ensayos de control de calidad.

#### **IV.1.5 Elementos de salida de los experimentos para definir marcadores alérgicos**

En resumen, se estableció que el contenido de Der s 1 y Der p 1, determinado mediante ELISA-AcM, constituye un parámetro adecuado para estimar la potencia alérgica total de los extractos de DS y DP, pero que no sustituye completamente el empleo de ensayos basados en IgE, que deben ser aplicados preferentemente al producto final. Asimismo, se definió la

importancia de los componentes alergénicos de bajo peso molecular de BT y se recomienda la determinación semi-cuantitativa de la fracción de 12-21 kDa en el SDS-PAGE y de las bandas de 16-18 kDa en el WB-IgE, como criterio de estandarización de los productos, en adición al ensayo de potencia alergénica.

#### **IV.2 DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS Y REFERENCIAS**

El desarrollo de métodos analíticos apropiados para la estandarización de las vacunas alergénicas constituye, quizá, la tarea científico-tecnológica de mayor complejidad en el desarrollo de estos productos; en primer lugar, debido a su compleja composición, en la cual los componentes activos, propiamente los alérgenos, constituyen solamente una fracción de las proteínas presentes, e incluso, el mismo concepto de actividad es dependiente de la respuesta IgE del paciente. Por lo tanto, resulta obvio el empleo de los anticuerpos IgE provenientes de pacientes alérgicos, para el desarrollo de inmunoensayos dirigidos a determinar actividad alergénica. No obstante, la detección de IgE, requiere de métodos de alta sensibilidad, ya que sus niveles séricos, aún en individuos muy alérgicos, son varios órdenes menores que los de otras inmunoglobulinas. Históricamente, el primer método de detección usado fue el RAST (Radio-Allergo-Sorbent Test). Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado sistemas no radioactivos, con suficiente sensibilidad, los cuales han sido aplicados en este trabajo.

Los ensayos basados en la IgE se emplean para la determinación de dos parámetros básicos: (i) la potencia alergénica total y (ii) la composición alergénica, entendida como la determinación del perfil cualitativo de unión de IgE, mediante Western Blotting. Para la potencia alergénica, se desarrolló un ELISA de inhibición, el cual permite comparar la capacidad del extracto en estudio, de inhibir la unión de IgE al alérgeno fijado a la fase sólida, con la capacidad análoga del extracto de referencia. Por otra parte, el desarrollo del WB-IgE persiguió no sólo la identificación de la presencia de alérgenos importantes, sino también, con la ayuda del análisis densitométrico, la instrumentación de parámetros cuantitativos o “metámetros” en dichos perfiles, que fueran de utilidad para el control de calidad. En ambos métodos se empleó como reactivo clave, un pool de sueros de pacientes alérgicos representativos, común para DP y DS, aprovechando su elevada reactividad cruzada, y otro

diferente para BT.

Otra de las tendencias actuales para la estandarización de productos alergénicos es la cuantificación de Alergenos Mayores, empleando ensayos ELISA basados en AcM. En los experimentos iniciales se usaron los estuches comerciales de la firma INDOOR (UK) para Der p1, Der f 1 y Der p 2. Para Der s 1, se empleó el ELISA anti-Der f 1, explotando la reactividad cruzada existente entre DS y DF.<sup>79</sup> Dicho ensayo fue sustituido posteriormente por el ELISA basado en los AcM anti-Der s 1 obtenidos por nuestro grupo.<sup>81</sup> Para sustituir el ELISA comercial anti-Der p 1, se desarrolló un ensayo basado en anticuerpos policlonales (AcP), obtenidos en conejos inmunizados con Der s 1. Estos AcP reconocen tanto Der s 1 como Der p 1, en virtud de la reactividad cruzada interespecie.

La meta final en el desarrollo de los métodos analíticos fue su validación, estableciendo su precisión, exactitud, rango y límite de cuantificación o detección, con vistas a evaluar su aplicabilidad como ensayos de control de calidad. Particularmente, la determinación de la precisión es necesaria para fijar la cantidad de ensayos y/o réplicas en cada ensayo requeridos, para lograr ajustarse a la tolerancia establecida en regulaciones internacionales para la potencia alergénica o el contenido de alergenos individuales. El límite de cuantificación es importante para establecer la aplicabilidad de los métodos, no sólo al producto final, sino también a las diluciones empleadas en inmunoterapia. Atendiendo a la similitud entre los tres productos, en este capítulo se han combinado los resultados de los estudios de validación de los tres, de acuerdo al principio de agrupación de alergenos homólogos establecido por la guía europea y la regulación nacional sobre productos alergénicos.<sup>131.136</sup>

Además de los métodos analíticos, las referencias constituyen otro de los componentes imprescindibles del sistema de estandarización. En virtud de que no existe aún un sistema internacional de referencias para los productos alergénicos, se requiere la creación de Referencias Internas (RI) por cada fabricante. En nuestro trabajo, las RI fueron seleccionadas a partir de lotes representativos y su caracterización incluyó la determinación de su actividad biológica mediante pruebas cutáneas (sub-acápite IV.2.4).

#### **IV.2.1 Desarrollo y validación de ELISA IgE para la potencia alergénica total**

Este estudio tuvo como objetivo determinar la precisión, exactitud, rango y límite de cuantificación del ELISA de Inhibición de IgE, como ensayo de potencia alergénica total, y por

lo tanto, establecer su aplicabilidad como método de control de calidad de los productos. Consistió en el análisis de los resultados de 65 ensayos consecutivos realizados en un período de 18 meses que cumplieron con los criterios de validez establecidos. De acuerdo a los resultados, la media geométrica de la potencia relativa ( $P_R$ ) del control de la RI, no fue significativamente diferente a 1,00 ( $p= 0,05$ ); según lo esperado (Tabla 10).

El límite de cuantificación (LC) del método se expresa a través de la concentración necesaria para obtener el 50% de inhibición, a la cual se denomina  $C_{50}$ . Los valores promedios de  $C_{50}$  para DS y DP resultaron similares y la combinación de ambos exhibió un valor de 20 UB/mL (Tabla 10), igual a la concentración mínima empleada en la inmunoterapia. Sin embargo, para BT se obtuvo un valor mucho mayor, de modo que el ensayo para este producto solo es aplicable para concentraciones a partir de 200 UB/mL. El rango lineal de la curva, que es el empleado para la regresión lineal, según el método estadístico de las rectas paralelas,<sup>139,140</sup> se observó típicamente entre los valores 20-80 % de Inhibición (Fig. 14). Los coeficientes de correlación obtenidos en ese rango; los cuales indican el grado de linealidad, fueron superiores a 0,95 (Tabla 10); límite que se considera aceptable para un inmunoensayo.<sup>138</sup> Otra característica fundamental de la curva, que influye sobre la precisión de los resultados, es la pendiente, la cual es una medida de la fortaleza de la interacción anticuerpo-antígeno. Los valores promedios de la pendiente de la curva de referencia, fueron similares para los tres productos y permanecieron estables durante los 18 meses del estudio, evidenciando la consistencia en el funcionamiento del ensayo (Fig. 15).

La Tabla 11 muestra los resultados de la variabilidad interensayo e intraensayo expresada en términos de desviación estándar ( $\sigma$ ) de  $\log(P_R)$ . La precisión calculada para un ensayo ( $n =1$ ), a partir de  $\sigma_{\log P_R}$  interensayo, fue de  $IC_{95\%} = 0,601-1,663$ ; para la combinación de los tres productos. Este error es menor que la tolerancia establecida para la potencia alergénica en las regulaciones internacionales (0,5 - 2,0); por lo tanto, en principio, sería suficiente un solo ensayo para aceptar o rechazar un lote con un riesgo de error inferior al 5 %. Para mayor precisión, se pueden realizar dos ensayos adicionales y promediar los tres resultados; en ese caso la precisión se elevaría a 0,746-1,341 (Tabla 11).

La exactitud de este tipo de bioensayo es difícil de determinar, puesto que no existen valores de referencia del parámetro ensayado. Un primer juicio sobre la exactitud del ensayo se puede hacer a partir del resultado promedio de la  $P_R$  del control de la RI con respecto a la misma RI

Tabla 10. Resultados de los ensayos en cuanto a potencia relativa (media geométrica,  $\langle P_R \rangle$ ), límite de cuantificación (media geométrica,  $\langle C_{50} \rangle$ ), rango lineal y linealidad ( $r$ ) de la función de respuesta, para los diferentes extractos alergénicos: DS, DP y BT.

Producto	$n$	$\langle P_R \rangle$	$(IC_{95\%})$	$\langle C_{50} \rangle$ ( $IC_{95\%}$ )		$\langle \text{Rango lineal} \rangle$	
				[UB/mL]	[UB/mL]	[UB/mL]	$r \pm IC_{95\%}$
DP	20	1,07	(1,13 - 0,92)	16,5	(23,8-11,4)	6,07 - 173	0,974 $\pm$ 0,006
DS	23	1,02	(1,21 - 0,95)	24,4	(37,9-15,7)	4,70 - 130	0,982 $\pm$ 0,004
BT	22	1,10	(1,22 - 0,99)	170	(215-134)	27,2 - 751	0,979 $\pm$ 0,005

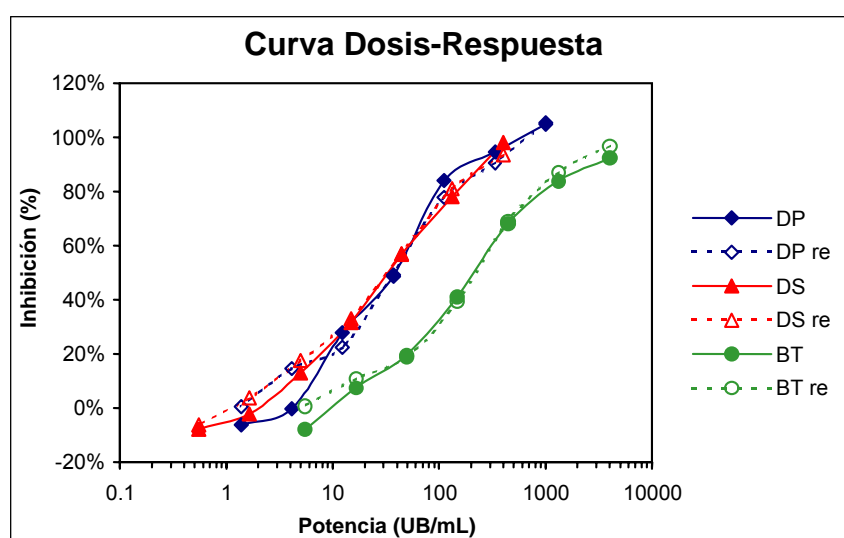


Fig. 14. Curva típica de dosis-respuesta del ELISA de Inhibición para las RI de DS, DP y BT; “re” indica la curva réplica del control de la RI, en el mismo ensayo.

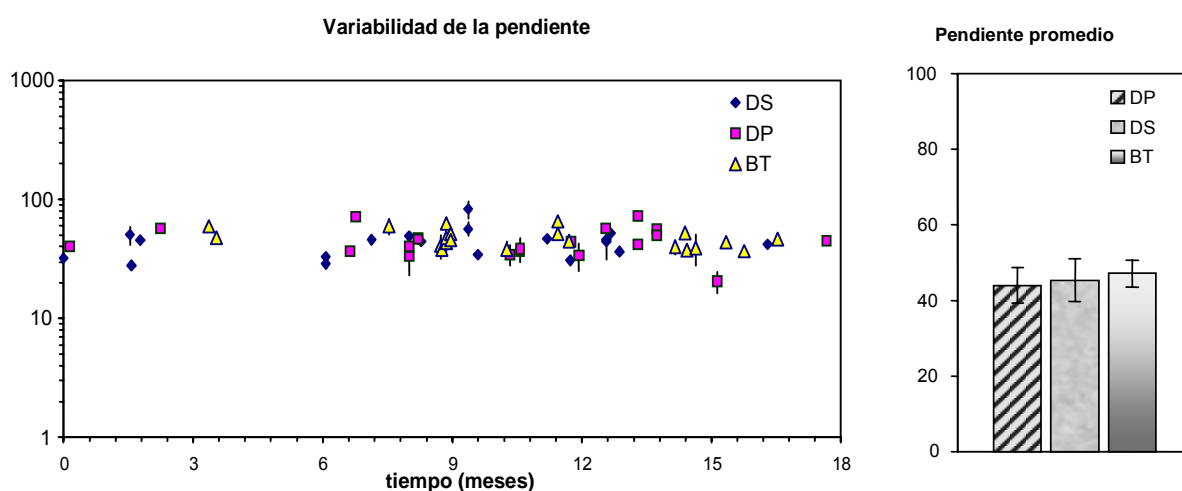


Fig. 15. Valores promedios de la pendiente de la curva de referencia (derecha) y comportamiento de este parámetro en el tiempo (izquierda). Cada símbolo es un ensayo. El número de ensayos analizados fue de 23 para DS, 20 para DP y 22 para BT.

Tabla 11. Variabilidad de la potencia relativa, intra e interensayo ( $\sigma$ ), y precisión calculada según la expresión:  $IC_{95\%} = t_{0,05,n} \sigma_{\log PR}$ , para  $n$  ensayos de los productos respectivos y su combinación.

Producto	$n$	Variabilidad		Precisión ( $IC_{95\%}$ )	
		Intraensayo < $\sigma_{\log PR}$ >	Interensayo $\sigma_{\log PR}$	$n = 1$	$n = 3$
DP	20	0,079	0,123	1,746 - 0,573	1,380 - 0,725
DS	23	0,057	0,106	1,613- 0,620	1,318 - 0,759
BT	22	0,070	0,109	1,638- 0,611	1,330 - 0,752
DS+DP+BT	65	0,069	0,113	1,663 - 0,601	1,341 - 0,746

Tabla 12. Exactitud del ELISA de inhibición de IgE, determinada con diluciones preparadas a partir del producto concentrado. Valores combinados de los tres productos (DP+DS+BT) o de los productos DS y DP, en el; caso de la dilución de 20 UB/mL.

Productos	Concentración (UB/mL)	$n$	<Recobrado log(P)>, %	( $IC_{95\%}$ )
DS+DP+BT	20 000	8	104,1	(100-108)
	2 000	8	98,0	(95,2-101)
	200	8	98,2	(92-104)
DS+DP	20	5	109,6	(80,6-139)



en 65 ensayos, que aparece en la Tabla 10. El valor obtenido para cada producto no fue estadísticamente diferente del esperado:  $P_R = 1,00$ ; o sea, identidad entre ambas. En otro experimento, se determinó la exactitud usando diluciones preparadas a partir del producto concentrado. Para BT no fue posible probar la última dilución (20 UB/mL) ya que está por debajo del límite de cuantificación. Los valores de recobrado en todas las diluciones fueron cercanos al 100 % y el  $IC_{95\%}$  en todos los casos incluyó dicho valor (Tabla 12), de modo que el ensayo ofrece resultados exactos con una probabilidad mayor o igual al 95 %.

En conclusión, el método desarrollado es apropiado como ensayo para el control de la calidad de los extractos alergénicos liofilizados, así como de sus diluciones, y su precisión es suficiente para, con un solo ensayo, definir la aceptabilidad o rechazo del producto de acuerdo a los valores de tolerancia establecidos internacionalmente.

#### **IV.2.2 Desarrollo y validación de Western Blotting IgE para la composición alergénica**

El empleo de un método cualitativo para la determinación de la composición alergénica, es recomendado por diferentes guías regulatorias<sup>127,131</sup> y requerido por la Farmacopea Europea.<sup>132</sup> El Western Blotting IgE (WB-IgE), empleando sueros de pacientes alérgicos, es el método preferido. El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un método analítico basado en el WB-IgE que permitiera, no solamente la determinación cualitativa de la composición alergénica (número de bandas e intensidad aparente de éstas), sino también, el establecimiento de parámetros cuantitativos o metámetros, asociados a los componentes principales de los productos; lo cual permitiría mayor objetividad en sus resultados. Con ese fin, se introdujo el análisis densitométrico del patrón de bandas registradas en un filme o membrana. Por último, el estudio persiguió validar el método desarrollado, determinando la precisión, linealidad, rango y límite de detección y establecer su aplicabilidad como método de control de la calidad del producto final.

##### **Establecimiento de metámetros**

El término metámetro denota una variable de respuesta apropiada para los propósitos de la estandarización.<sup>171</sup> Uno de los factores principales a considerar para seleccionar metámetros es su reproducibilidad. En el caso de los perfiles densitométricos, el problema se reduce a seleccionar los picos a medir y decidir cómo medirlos. La selección de los picos se basó en la importancia de los diferentes componentes alergénicos previamente caracterizados, en cuanto a frecuencia e intensidad de unión de IgE. Las bandas seleccionadas fueron las de 15 y

25 kDa para DS y DP y la banda doble de 16-18 kDa para BT. El análisis densitométrico permite caracterizar las bandas con dos variables fundamentales: la intensidad máxima (altura del pico) y el área bajo la curva. La precisión de estos dos métodos fue comparada experimentalmente, empleando los dos métodos de detección: quimioluminiscente (ECL) y el revelado cromogénico tradicional. Los resultados mostraron que el método ECL tuvo una mayor sensibilidad analítica, al detectar un mayor número de picos, y una menor variabilidad, con CV menores para ambas variables (Tabla 13). La variable Intensidad mostró la menor dispersión, de modo que se decidió seleccionar la misma como método, empleando para el control de calidad, la Intensidad Relativa, calculada con respecto a la banda correspondiente de la RI.

### **Resultados de la validación**

La linealidad de la función dosis-respuesta del método seleccionado, en el rango de 0,2 a 5,0 unidades relativas con respecto a la RI (equivalente a 400-10 000 UB para DP/DS, y a 2000-50 000 UB para BT) fue satisfactoria con coeficientes de correlación superiores a 0,95 (Tabla 14). El rango lineal incluyó el intervalo requerido de 0,5 - 2,0 RI que se corresponde con los límites de aceptación descritos en la Farmacopea Europea, para los ensayos de alérgenos individuales.<sup>132</sup> La pendiente de las rectas de regresión fue mayor para las bandas de 25 y 16-18 kDa con respecto a la de 15 kDa. Los límites de detección (LD), calculados a partir de la regresión, fueron inferiores para DP/DS, con respecto a BT (Tabla 14), lo cual indica un contenido diferente de IgE específica en los sueros respectivos; no obstante, todos los valores fueron menores al límite inferior del rango de tolerancia establecido (0,5 RI; equivalente a 1000 UB para DP/DS y a 5 000 UB para BT).

Los resultados del análisis de la precisión mostraron valores similares de variabilidad intra e interensayo (Tablas 15 y 16, Fig. 16), sin diferencias significativas entre productos. La precisión calculada como el IC<sub>95%</sub> para un ensayo ( $n=1$ ), a partir de  $\sigma_{DP+DS+BT}$  interensayo, fue de  $\pm 0,240$  (Tabla 15), valor que resulta menor que la tolerancia establecida para el contenido de alérgenos individuales o para la potencia alérgica (0,5-2,0); de modo que, sería suficiente un solo ensayo para definir con suficiente precisión, la aceptación o rechazo del producto. La precisión del método resultó, incluso, mejor que la del ELISA de Inhibición.

En resumen, con el método de WB-IgE desarrollado, empleando como método la intensidad de las bandas principales; es posible realizar una comparación semicuantitativa de

Tabla 13. Variabilidad de los métodos de detección en el WB-IgE y metámetros del análisis densitométrico. Resultados del análisis de tres lotes de DP y DS en ensayos independientes.

Método	Número de picos detectados	Dispersión (CV %)	
		Área bajo la curva	Altura del pico
Quimioluminiscente, ECL	10 - 16	10,9	6,2
Cromogénico, DAB	5 - 7	16,6	15,7

Tabla 14. Linealidad de la función de respuesta (intensidad relativa de las bandas vs. concentración) en el rango de 0,2 a 5,0 RI, evaluada mediante el análisis de regresión; y límites de detección (LD) calculados a partir del mismo.

Producto	Banda (kDa)	Regresión lineal			LD (UB)
		Pendiente	Intercepto	<i>r</i>	
DS+DP	25	2,35E-06	8,15E-02	0,975	270
	15	8,43E-07	5,48E-02	0,992	968
BT	16-18	5,36E-06	-0,133	0,987	4940

Tabla 15. Resultados de la variabilidad interensayo de la intensidad relativa de las bandas de 25 y 15 kDa (para DP y DS) y 16-18 kDa (para BT), y precisión calculada, según la expresión:

$IC_{95\%} = t_{0,05,n} \sigma$ ; para *n* ensayos de los productos respectivos y su combinación.

	DP	DS	BT	DP+DS+BT
<b><i>n</i></b>	8	8	5	21
Int. relativa promedio	0,938	1,013	1,051	0,993
Desviación estándar ( $\sigma$ )	0,085	0,056	0,209	0,122
CV (%)	9,08	5,49	19,9	12,3
Precisión ( $IC_{95\%}$ ) para <i>n</i> = 1	±0,167	±0,110	±0,390	±0,240
Precisión ( $IC_{95\%}$ ) para <i>n</i> = 3	±0,096	±0,063	±0,225	±0,139

Tabla 16. Variabilidad intraensayo de la intensidad de los picos de 15 y 25 kDa (para DP y DS,  $I_{15}$  e  $I_{25}$ , respectivamente) y 16-18 kDa (para BT,  $I_{16-18}$ ), en unidades de absorbancia.  $\langle I_{15} + I_{25} \rangle$  y  $\langle I_{15} + I_{25} + I_{16-18} \rangle$ : resultados combinados normalizados.

	DS + DP			BT	DS+DP+BT
	$I_{15}$	$I_{25}$	$\langle I_{15} + I_{25} \rangle$	$I_{16-18}$	$\langle I_{15} + I_{25} + I_{16-18} \rangle$
<b><i>n</i></b>	8	8	16	6	22
Promedio	0,096	0,211	-	0,448	-
Desviación estándar	0,015	0,025	-	0,049	-
CV (%)	15,8	12,0	13,9	10,9	11,4

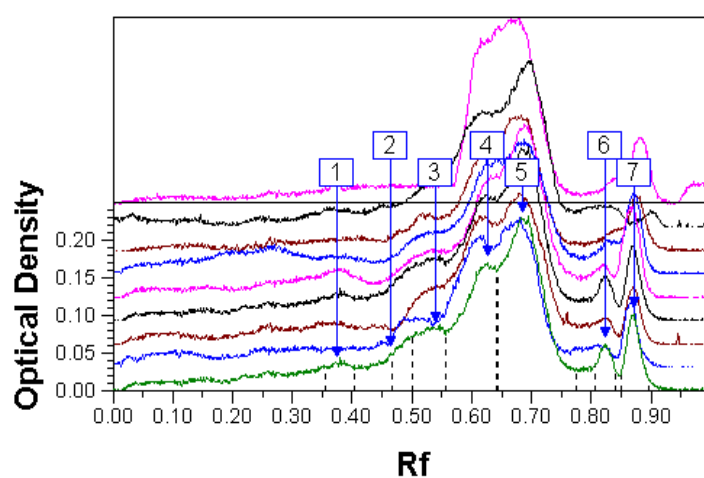


Fig. 16. Densitogramas superpuestos del Western Blotting IgE de 8 réplicas de la RI de DS en un mismo ensayo. Los picos de 25 y 15 kDa son los indicados con las cifras 5 y 7, respectivamente.

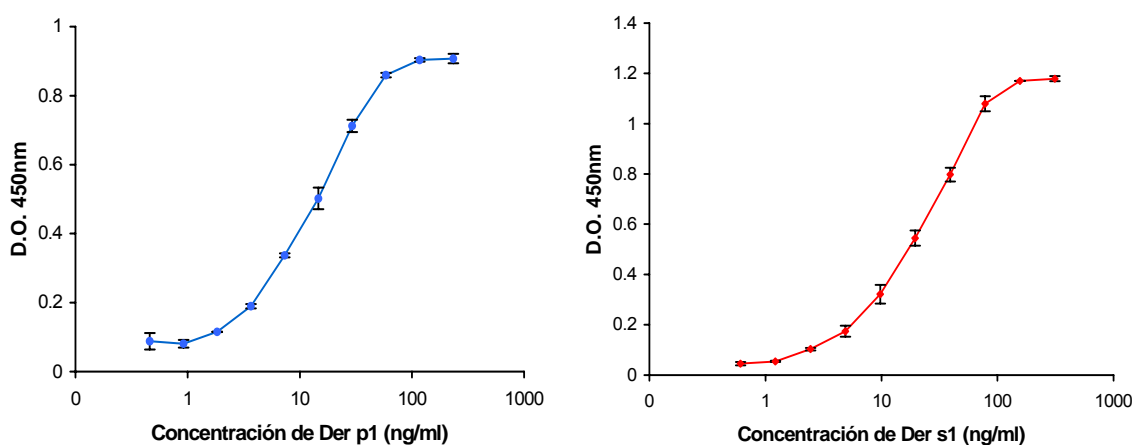


Fig. 17. Curva de dosis-respuesta para los alérgenos de Der p 1 y Der s 1, respectivamente, en el ELISA con anticuerpos policlonales anti-Grupo 1.

la composición alergénica de los productos con respecto a la RI. La precisión, límite de detección y rango lineal del ensayo responden a lo requerido, de modo que el método es apropiado para su uso como ensayo de control de la calidad del producto final.

#### **IV.2.3 ELISA para la cuantificación de Der s 1 y Der p 1**

Además de los ensayos basados en IgE, se utilizaron también en el control de calidad, ensayos ELISA para la cuantificación de los alérgenos del Grupo 1, en los extractos de DS y DP. El contenido de Der s 1 o Der p 1 demostró estar estrechamente asociado a la potencia alergénica total, y como tal, fue empleado como subrogado de ésta en las etapas intermedias de la producción.

Se desarrolló primeramente un ELISA tipo sandwich, específico para Der s 1, basado en los AcM 5F7 y 4E10 y posteriormente, otro ELISA, basado en anticuerpos policlonales en conejo, el cual se emplea tanto para la determinación de Der s 1 como de Der p 1. Los resultados del estudio de validación de ambos ensayos evidenciaron su precisión, exactitud, especificidad y linealidad de la función de respuesta en el rango del ensayo. Se demostró la especificidad al no detectarse diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las muestras de productos y las muestras construidas con posibles contaminantes del proceso productivo, tales como ingredientes del medio de cultivo de ácaros, y diferentes concentraciones de sales de las soluciones empleadas en el proceso. Estas evidencias se adicionan a la especificidad de los anticuerpos demostrada mediante Western Blotting. El rango lineal del ELISA-AcM anti Der s 1 fue de 1,56 a 25 ng/mL tras someter los datos, a una transformación semilogarítmica. El límite inferior del rango corresponde al límite de cuantificación del ensayo. El rango lineal del ELISA-AcP fue de 5 a 80 ng/mL para Der s 1 y de 2 a 60 ng/mL para Der p 1, con una mayor pendiente para Der s 1: 0,77; en comparación con Der p 1: 0,46 (Fig. 17). El coeficiente de correlación  $r$  fue mayor de 0,95 en todos los ensayos e igual a 0,99; como promedio. La exactitud quedó demostrada al no detectarse diferencias significativas ( $p = 0,05$ ) entre el valor de concentración esperado, de acuerdo a los ensayos comerciales (INDOOR, UK) y el determinado con nuestros ensayos.

La precisión intraensayo, medida a través del CV en la zona media del rango de concentraciones ( $CV_m$ ) resultó igual a 7,8 % para el ELISA-AcM y entre 6,4 y 7,6% para Der s 1 y Der p 1, respectivamente, en el ELISA-AcP. La precisión interensayo, medida a través del  $CV_m$  resultó 16,3 % para el ELISA-AcM y entre 6,5 y 8,8 % para el ELISA-AcP. El CV fue

menor que el 20 % prefijado como aceptable incluso en las regiones alta y baja de la curva. La precisión calculada para un solo ensayo, expresada en términos de  $IC_{95\%}$  fue de  $\pm 31\%$  para el ELISA-AcM y de  $\pm 13$  y  $\pm 17\%$  para Der s 1 y Der p1, respectivamente, en el ELISA-AcP,

En conclusión, los métodos ELISA desarrollados, para la cuantificación de Der p 1 y Der s 1, son adecuados para el control de la calidad de los extractos alergénicos o las Materias Primas Alergénicas y cumplen con los requisitos exigidos para este tipo de ensayo.

#### **IV.2.4 Creación y caracterización de Referencias Internas**

En los métodos analíticos anteriores, los parámetros de potencia y composición alergénicas se determinaron en unidades relativas con respecto a las Referencias Internas (RI). Las RI de cada producto, se seleccionaron de lotes representativos, atendiendo fundamentalmente a un comportamiento promedio de los parámetros de calidad, así como a las propiedades del producto liofilizado (aparición de la pastilla, humedad residual) de modo que se garantizara al máximo su estabilidad, y fueron caracterizadas empleando los métodos analíticos descritos para los productos. Adicionalmente, se determinó su actividad biológica en pacientes, asignándosele un valor de potencia expresado en Unidades Biológicas (UB). De esa forma, los valores de potencia relativa, determinados a los lotes de producción mediante el método *in-vitro*, se traducen a valores de potencia biológica, mediante la multiplicación por el valor de potencia de la RI.

La caracterización de las RI, en cuanto a composición alergénica, se expone en la Tabla 17. Para DP y DS, los componentes proteicos principales, según SDS-PAGE, fueron los de 15-17, 25-26 y 32 kDa (Fig. 18). La actividad alergénica de las bandas de 15-17 y 25-26 kDa, que se corresponden con los pesos moleculares de los alérgenos del Grupo 2 y 1, respectivamente, fue comprobada mediante WB-IgE (Fig. 19). La presencia de ambos alérgenos fue probada mediante los ELISA-AcM (Tabla 17). En el caso de DP se comparó nuestra RI con el patrón internacional existente<sup>172</sup> mediante ELISA de Inhibición de IgE. La equivalencia obtenida fue de 1UB = 19,7 UI ( $IC_{95}$ : 13,1-28,4). En cuanto a BT, los componentes proteicos principales fueron los de la fracción entre 12 y 21 kDa y la fracción entre 30 y 40 kDa. La fracción de bajo peso molecular (12-21 kDa) que se corresponde con varios alérgenos, entre ellos Blo t 5, Blo t 12 y Blo t 13, alcanzó más de la mitad del contenido de proteínas (Tabla 17) y su peso relativo en la unión de IgE fue el mayor (66%). Adicionalmente, la caracterización de la RI incluyó los ensayos de esterilidad, homogeneidad del contenido ( $CV < 6\%$ ), humedad residual

(<5 %), tiempo de reconstitución (<1 min) e inocuidad inespecífica, de acuerdo a lo descrito en las Farmacopeas.

### **Estabilidad de la RI**

La RI liofilizada se almacena a -70°C con el objetivo de garantizar su estabilidad. Para estimar la misma en esas condiciones, se llevó a cabo un estudio de estabilidad acelerada a tres temperaturas: -70°C, 4°C y 37°C. Al finalizar los 12 meses del estudio, no se detectaron cambios en la composición alérgica y proteica, aún en las muestras conservadas a 37°C. La potencia alérgica decreció ligeramente a esa temperatura en todos los productos, aunque la tendencia no fue significativa (análisis de regresión,  $p > 0,05$ ). No obstante, empleando la pendiente estimada máxima (correspondiente a la mayor velocidad de degradación probable) y el modelo de Arrhenius, se determinaron los estimados de tiempo de vida media de las RI, que aparecen en la Tabla 18. Para los tres productos los estimados fueron superiores a los 10 años. Las determinaciones a tiempo real confirmaron su estabilidad durante al menos 10 años (1997-2007) a -70°C.

### **Determinación de la actividad biológica *in vivo***

La potencia biológica se determinó mediante punción cutánea en 20 pacientes adultos con síntomas de alergia respiratoria. En la Fig. 20 se exponen los resultados obtenidos, los cuales fueron similares para los tres productos (sin diferencias significativas, ANOVA, prueba de Tukey,  $p > 0,05$ ) e igual como promedio a 15 000 UB/mL. De acuerdo a estos resultados, 1 UB se correspondería con 2 ng de Der p 1, 4 ng de Der s 1 o aproximadamente 10 ng de la fracción de 12-21 kDa de BT (en este último caso combinando los resultados de la determinación de proteínas totales y el análisis densitométrico del SDS-PAGE).

En conclusión, se crearon y caracterizaron las RI de los tres productos, y se determinó su estabilidad y potencia alérgica *in-vivo*, expresada en UB, estableciéndose la equivalencia entre estas unidades y el contenido de los componentes alérgicos principales.

## **IV.2.5 Discusión del desarrollo de métodos analíticos y referencias**

### **Precisión y reproducibilidad de los ensayos basados en IgE**

El empleo de un ensayo de composición alérgica, particularmente el WB-IgE, es recomendado por la Guía Europea para Productos Alérgicos.<sup>131</sup> También la FDA tiene un ensayo similar entre sus métodos de laboratorio<sup>138</sup> aunque como método de identidad y sin carácter obligatorio para los fabricantes. No obstante, a diferencia del ELISA de inhibición, no

Tabla 17. Características de la composición de las RI de los tres productos.

Producto	Perfil de proteínas y alérgenos			Proteínas (mg)	Der p 1/ Der s 1 (mg)	Der p 2 (mg)
	Bandas principales, kDa	% SDS-PAGE	% WB IgE			
DP	15-17, 25-26	44	79	5,46	0,30	0,081
DS	15-17, 25-26	31	66	4,57	0,70	-
BT	12-21	55	66	1,8	-	-

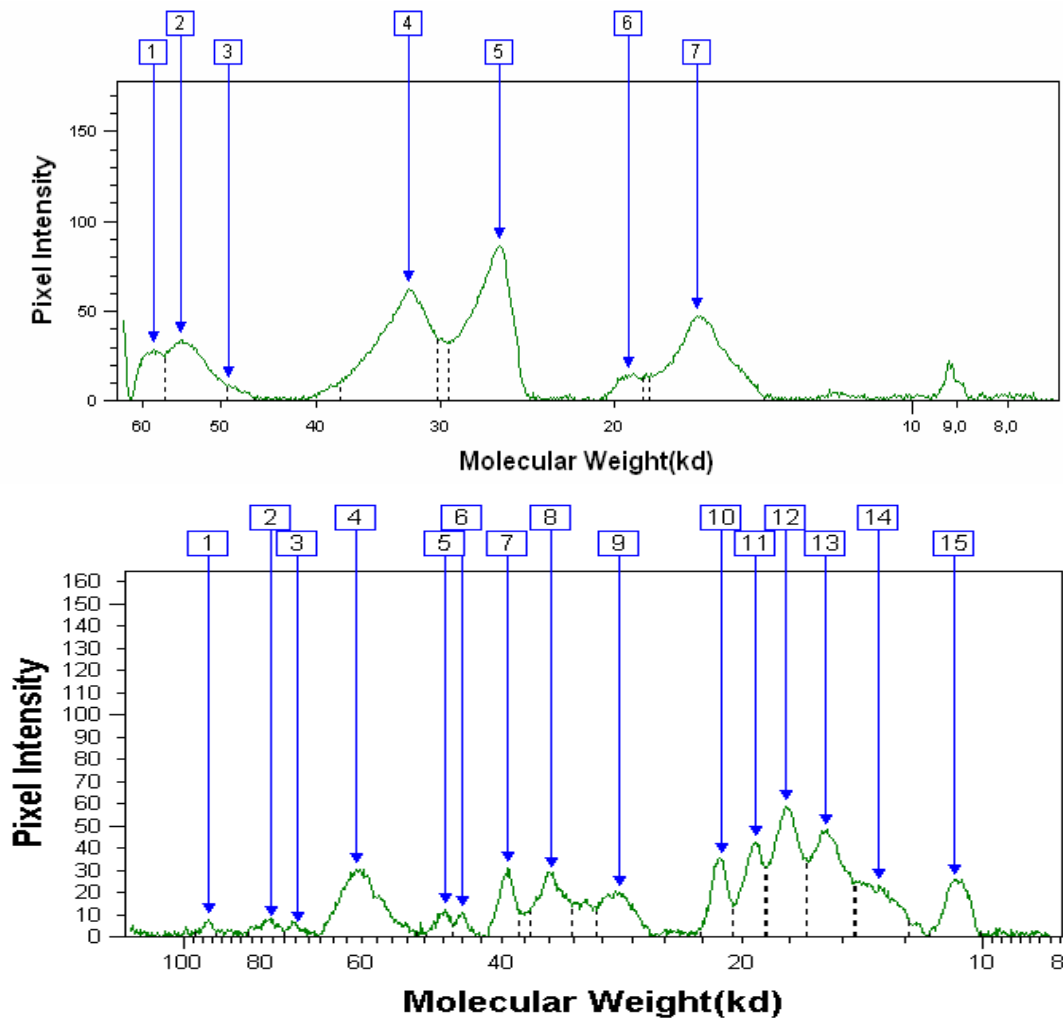


Fig. 18. Perfil densitométrico del SDS-PAGE de las RI de DP (arriba) y de BT (abajo). Los picos 7 y 5 de DP se corresponden con los componentes de 15-17 y 25-26 kDa, respectivamente. Los picos 10-14 de BT se corresponden con la fracción de 12-21 kDa.



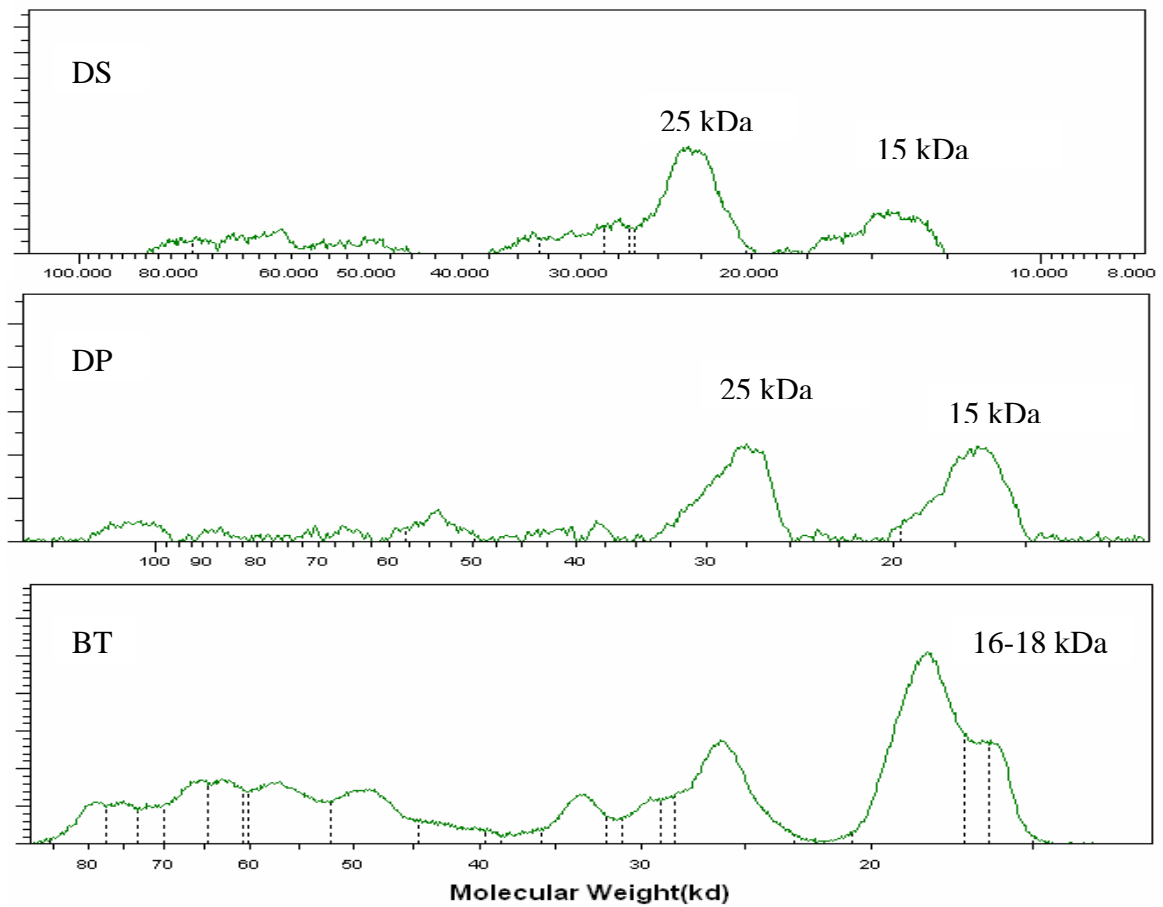
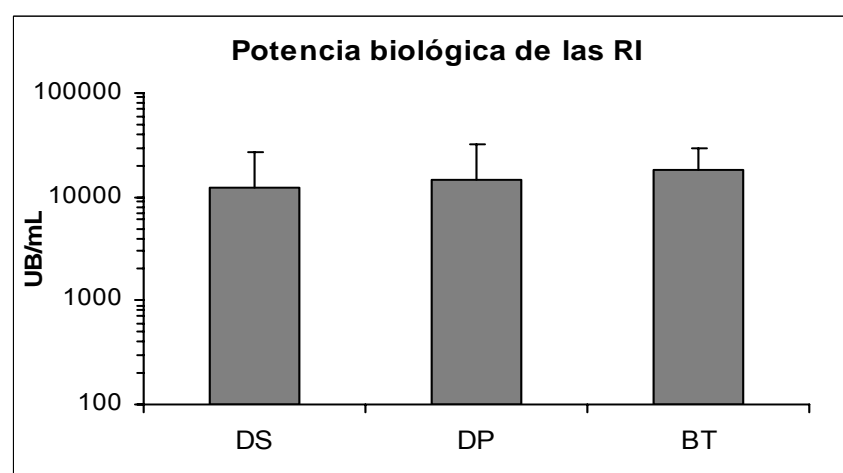


Tabla 18. Estimados del tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) de las RI, conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , según el estudio de estabilidad acelerada, empleando la ecuación de Arrhenius  $\ln(k) = a \cdot (1/T) + b$ .

RI	k	$t_{1/2}$ (meses)
DP	-2,6E-06	114 034
DS	-1,05E-06	286 088
BT	-2,34E-03	128,8



existe aún un procedimiento de referencia oficial, para el empleo del WB-IgE como método de control de calidad, menos aún, en lo que se refiere a la incorporación del análisis densitométrico y al empleo de parámetros cuantitativos.

Es conocido que en el análisis densitométrico de geles de electroforesis, el área bajo la curva es el metámetro que está directamente relacionado con el contenido de un componente dado. No obstante, en el caso de patrones complicados con picos superpuestos, como los obtenidos mediante el WB de extractos alérgicos, el área bajo la curva puede no ser suficientemente reproducible, ya que es muy dependiente de la resolución lograda en cada experimento, así como de los parámetros de detección de picos del densitómetro. Por ello, en nuestro trabajo seleccionamos como índices cuantitativos, la intensidad de las bandas principales. Los resultados de la validación demostraron la precisión, linealidad y sensibilidad analítica de dichos metámetros y su utilidad para el control de calidad. La precisión del WB resultó, incluso, mayor que la del ELISA de Inhibición y comparable con los ELISA para Alérgenos Mayores.

Por otra parte, la precisión del ELISA de inhibición de IgE desarrollado en este trabajo, resultó similar al método de referencia de la FDA (Tabla 19), a pesar del empleo de sueros, alérgenos y reactivos diferentes, y superior al método de referencia histórico, el RAST. La dispersión fue inferior al límite establecido por la FDA para la evaluación de los fabricantes en el dominio de este ensayo ( $n= 20$ ,  $\sigma= 0,1898$ ).<sup>138</sup>

### **ELISA para Alérgenos Mayores**

Los ELISA basados en AcM poseen evidentes ventajas en cuanto a disponibilidad y homogeneidad de sus reactivos, así como, mayor sencillez para su ejecución. Esta variante de estandarización continúa ganando terreno en la medida en que ha estado disponible una mayor cantidad de AcM contra alérgenos.<sup>122</sup> No obstante, aún no hay ensayos adecuados para muchos alérgenos importantes, incluyendo los ácaros y particularmente, para la especie BT, de importancia en los trópicos. Por otra parte, no todos los ensayos desarrollados han demostrado utilidad en la estandarización, ya sea por una pobre correlación entre el alérgeno y la actividad total del extracto o por una especificidad demasiado exquisita de los AcM, que reconocen sólo determinadas isoformas de los alérgenos.<sup>125</sup> Por ejemplo, el ELISA disponible comercialmente para Blo t 5 (INDOOR, UK), generado usando el alérgeno recombinante,<sup>66</sup> no fue capaz de detectar niveles significativos de Blo t 5 en nuestros extractos, lo cual, probablemente, está relacionado con diferencias entre la forma recombinante y las isoformas

Tabla 19. Comparación de la precisión de diferentes ensayos de potencia alérgica.

Ensayo	IC 95 %
ELISA de Inhibición de IgE BIOCEN	60-166 % (n = 1), 75-134 % (n = 3)
ELISA de Inhibición de IgE CBER-FDA	54-186 % (n = 1), 70-143 % (n = 3)
RAST-Inhibición CBER-FDA	47-213 % (n = 3)

nativas, descritas recientemente.<sup>70</sup> Otro ELISA publicado en fecha reciente contra rBlo t 1 determinó niveles muy bajos de este alergeno en extractos de BT: entre 0,01 y 0,03 % del contenido de proteínas.<sup>173</sup> También, nuestro grupo obtuvo AcM contra un alergeno de BT: rBlo t 13 y desarrolló un ELISA que tampoco fue de utilidad para la estandarización de los productos.<sup>82</sup>

Tanto el ELISA-AcM para Der s 1 como el basado en AcP, demostraron claras ventajas con respecto a los inmunoensayos que emplean IgE humana, en cuanto a mayor precisión y sensibilidad (aproximadamente 100 veces más). El ELISA-AcP, a pesar de perder la especificidad de especie del primero, demostró parámetros de validación similares, con más sencillez en su ejecución (sólo un paso de detección) y la mayor precisión entre todos los métodos (IC<sub>95%</sub> entre 13 y 17 %). Otros autores han llamado la atención sobre este tipo de ensayo basado en AcP generados contra alergenos inmunopurificados con AcM, por su mayor robustez y reconocimiento de todas las isoformas.<sup>98,174</sup>

A pesar de la proliferación de ELISAs para Alergenos Mayores, escasean los estudios de validación de los mismos, y de hecho, se ha cuestionado su reproducibilidad debido a la ausencia de patrones internacionales.<sup>126,128,169</sup> Solamente existen dos métodos para alergenos individuales, validados oficialmente por la FDA y ambos son ensayos de inmunodifusión radial con AcP, para alergenos de polen de Ambrosia y de gato.<sup>124</sup> De acuerdo a nuestros resultados, los ensayos desarrollados tienen niveles de sensibilidad similares a los comerciales anti Der p 1 y anti Der f 1 de INDOOR (~1 ng/mL) y valores de precisión satisfactorios: CV<20%, lo cual se considera aceptable para un inmunoensayo.<sup>143</sup> La precisión fue mejor que lo informado por Grier y col. en un estudio similar con un ELISA anti Der f 1 (26%),<sup>169</sup> y que otros resultados con ELISAs para diferentes alergenos.<sup>175</sup>

### **Referencias Internas**

La estandarización en UB según el estándar de las Guías Nórdicas<sup>127</sup> permitiría la comparación de nuestros productos con otros fabricantes que emplean sistemas compatibles, entre ellos, el líder mundial ALK-Abelló. Para la comparación con terceros, pudiera ser de utilidad la equivalencia entre UB y contenido de Alergeno Mayor. En particular, la relación de 2 ng de Der p 1 ó 4 de Der s 1 por UB no es muy diferente de lo obtenido en los experimentos iniciales con lotes no estandarizados (4 ng/UB) y tampoco lejano a lo descrito por otros autores (entre 0,3 y 3,8 ng/UB<sup>128,168</sup>), aunque exista aún alta heterogeneidad entre esos resultados, debido a la falta de referencias internacionales tanto de UB como de alergenos purificados,<sup>128</sup>

así como a la imprecisión del método biológico, dependiente de la selección de pacientes.<sup>167</sup>

En la actualidad existe solamente un patrón internacional de DP calibrado en Unidades Internacionales (UI) arbitrarias, pero su uso no ha sido adoptado por autoridades regulatorias nacionales o internacionales.<sup>172</sup> La correspondencia entre nuestra RI y el patrón internacional (1UB = 19,7 UI) equivaldría a 2,5 ng/UB (IC<sub>95</sub>: 1,7-3,6) de Der p 1 de acuerdo a lo referido para dicho patrón, valor que se encuentra en concordancia con nuestros resultados. Aunque para BT no fue posible la determinación de Alergenos Mayores, la relación de 10 ng/UB de la fracción de 12-21 kDa (que contiene Blo t 5, Blo t 13 y Blo t 12 y posiblemente Blo t 2 y Blo t 21), es coherente con los resultados para DP y DS.

#### **IV.2.6 Elementos de salida del desarrollo analítico y de referencias**

En conclusión, se desarrollaron los métodos analíticos para la determinación de la potencia y la composición alergénicas, basados en IgE de pacientes alérgicos, y se validó su aplicación en el control de calidad de los productos finales. Asimismo, se desarrollaron y validaron sendos ensayos para la cuantificación de alergenos del Grupo 1 (Der s 1 y Der p 1), basados en anticuerpos monoclonales o policlonales, los cuales demostraron mayor sensibilidad y precisión que los ensayos basados en IgE, con ventajas prácticas que permiten su empleo en etapas intermedias del proceso. Por último, se crearon RI de los tres productos para ser empleadas en los métodos analíticos para la estandarización de los lotes de producción. Se determinó su actividad biológica en pacientes, expresada en UB, así como la relación entre UB y contenido de Alergenos Mayores del Grupo 1 en dichas referencias.

#### **IV.3 ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE FABRICACIÓN**

La producción de vacunas alergénicas de ácaros, parte del cultivo o propagación de los mismos en condiciones compatibles con los requisitos farmacéuticos y consiste de pasos de extracción, clarificación, semipurificación, filtración esterilizante, formulación y llenado aséptico, y en nuestro caso, también, liofilización. La estandarización del proceso de fabricación tiene como objetivo la minimización de la variabilidad entre lotes, particularmente, en cuanto a potencia y composición del producto. Para alcanzar este fin, en nuestro trabajo se diseñaron e implementaron diferentes medidas de control durante los procesos y fijaron parámetros de calidad con sus respectivos límites, así como se establecieron parámetros

tecnológicos óptimos, haciendo uso del desarrollo anterior de los métodos analíticos y del sistema de estandarización, en general. En el presente capítulo se describen los resultados principales del proceso de fabricación que evidencian la eficacia de las medidas aplicadas, a través del análisis de la consistencia de los parámetros de calidad, tanto del producto final como del cultivo de ácaros, como etapa de partida en el proceso. Algunos de los desarrollos tecnológicos concretos de especial trascendencia en la calidad del producto se relacionan en Anexos (procesos de diafiltración y liofilización).

#### **IV.3.1 Estandarización de métodos para el cultivo y propagación de ácaros**

Se desarrolló un método original para el cultivo de ácaros de acuerdo a los requerimientos de la industria farmacéutica, registrado como invención en Cuba, mediante el cual los cultivos se propagan a partir de un pie de cría aislado del polvo doméstico, durante un período de tiempo cercano a su ciclo de vida. El método permitió alcanzar una alta eficiencia en cuanto a densidad de ácaros y acumulación de material alergénico, así como satisfacer los requerimientos en cuanto a pureza de los cultivos. Además de las medidas para controlar la densidad del cultivo mediante inspección microscópica, la introducción de las determinaciones de alérgenos Der s 1 y Der p 1 o de actividad alergénica total (para BT) permitieron la definición de la fase estacionaria entre 12-16 semanas para DP y DS (Fig. 21) y 6-8 semanas, para BT, y por lo tanto, el establecimiento del límite inferior de tiempo para la cosecha.

Las especificaciones de calidad del cultivo cosechado, que constituye un producto intermedio denominado Materia Prima Alergénica (MPA), comprenden requisitos obligatorios desde el punto de vista regulatorio, como la identidad y pureza.<sup>131,135</sup> Para evaluar la introducción adicional de indicadores de contenido alergénico como parámetros de calidad de la MPA y establecer sus límites de aceptación, se analizaron 55 lotes experimentales de cultivo (23 de DS, 12 de DP y 20 de BT). Los resultados evidenciaron que estos parámetros siguen una distribución lognormal (Kolmogorov-Smirnov,  $p < 0,05$ ), y por consiguiente, se establecieron límites a partir de la media geométrica como valor nominal (Anexo 3. Especificaciones de Calidad de la MPA), los cuales se corresponden con una probabilidad de más del 95% de aceptación. El contenido promedio de Der p 1 fue 501  $\mu\text{g/g}$  ( $\text{IC}_{95\%}$ : 355-707), y de Der s 1: 758  $\mu\text{g/g}$  ( $\text{IC}_{95\%}$ : 472-1217). Para BT, el contenido promedio de proteínas fue 98  $\text{mg/g}$  ( $\text{IC}_{95\%}$ : 77-124) y la actividad alergénica específica, 27 300 UB/mg de proteínas ( $\text{IC}_{95\%}$ : 17200-43200).

A partir de estos resultados se incluyeron las determinaciones de Der s 1, Der p 1 y proteínas

totales, no solamente como criterios de liberación de la MPA, sino también como controles de proceso en la fase estacionaria del cultivo, antes de su cosecha. Otra medida indispensable para el cumplimiento de las BPF y que contribuye a una mayor estandarización del proceso, fue la determinación de la estabilidad de la MPA. De acuerdo al resultado del estudio de estabilidad a tiempo real, se demostró un período de validez de al menos tres años a -20 °C.

### **Consistencia del proceso de propagación de ácaros**

La eficacia de las medidas de estandarización instrumentadas, fue determinada a través del estudio de la consistencia de lotes de producción en serie, fabricados consecutivamente entre 2003 y 2006 (n= 65, Tabla 20). Se tomaron en cuenta los parámetros de calidad establecidos en las especificaciones de la MPA, así como, el rendimiento, expresado en masa de cultivo. Solamente un lote resultó rechazado (de BT), particularmente, por baja actividad específica. Ninguno resultó fuera del intervalo de  $\pm 3 \sigma$  del promedio, en los índices analizados (Fig. 22). La probabilidad de fallos, según el análisis de capacidad de proceso (o sea, el número de lotes no conformes esperados) osciló entre 0,1 y 0,3 %, para los índices de contenido de Alergenos Mayores o proteínas, y fue algo mayor para la actividad específica en BT: 5,3 %. El comportamiento observado en cuanto a rechazo (máximo 3,7%) se correspondió, en general, con lo esperado de acuerdo a la capacidad del proceso. En general, se considera que se demostró una consistencia satisfactoria, teniendo en cuenta que se trata de un proceso esencialmente biológico.

### **IV.3.2 Estandarización de procesos para la fabricación del extracto alérgico**

Uno de los problemas fundamentales en el desarrollo de extractos alérgicos, es obtener resultados consistentes entre diferentes lotes de producto. En ese sentido, los procedimientos de fabricación deben implementar controles intermedios y prever acciones que permitan contrarrestar la variabilidad intrínseca de los procesos biológicos, de modo que el producto final satisfaga los criterios de aceptación requeridos, así como establecer parámetros normalizados en las operaciones fundamentales que deciden la calidad del producto. La Tabla 21 muestra un resumen, tanto de los desarrollos tecnológicos realizados, como de otras medidas de estandarización y control de productos intermedios.

En primer lugar, se establecieron los parámetros normalizados del proceso de extracción, los cuales garantizaron recobrados satisfactorios de las proteínas alérgicas provenientes de la MPA (Der p 1 y Der s 1), así como de la actividad alérgica total (Tabla 22). Las condiciones

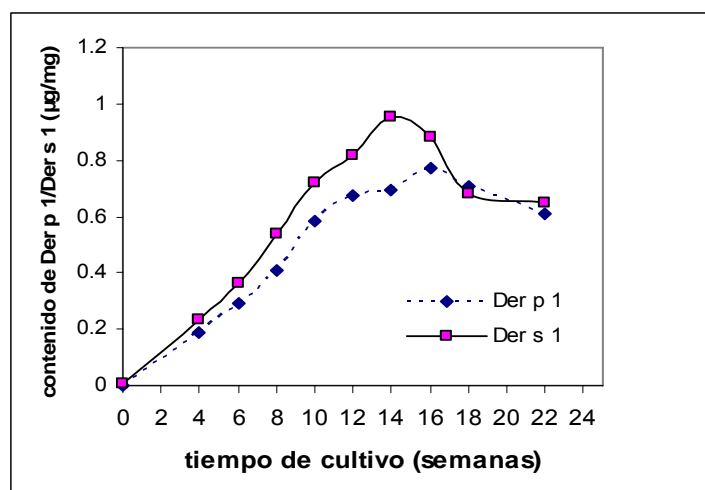


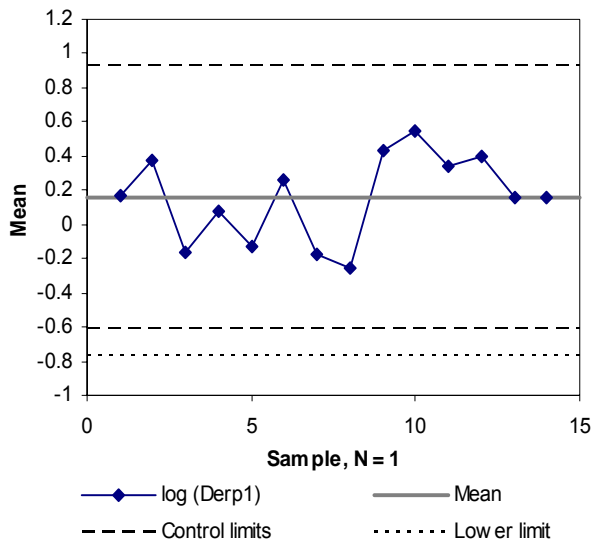
Fig. 21. Comportamiento típico del contenido del Alergeno Mayor del Grupo 1 (expresado en µg/mg de cultivo), en dependencia del tiempo de cultivo de los ácaros DP y DS.

Tabla 20. Análisis de la variabilidad y capacidad de proceso de la producción de Materia Prima Alergénica de las tres especies de ácaros.

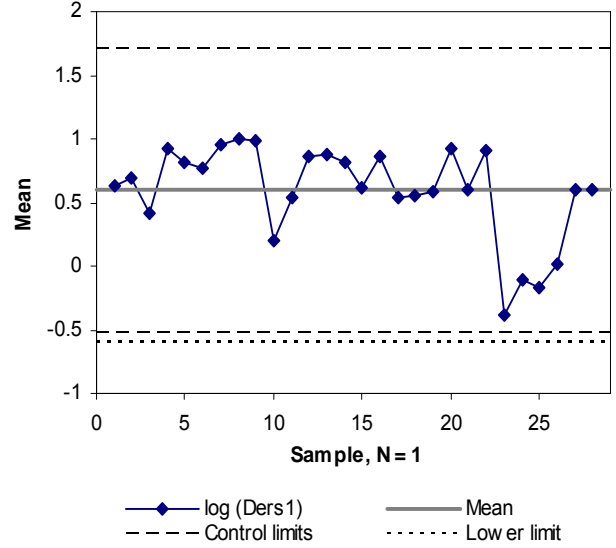
	DS, $n = 26$		DP, $n = 12$		BT, $n = 27$		
	Masa g	Log(Der s1) mg/g	Masa g	Log(Der p1) mg/g	Masa g	Proteínas mg/g	Log( $A_{esp}$ ) UB/mg
Promedio	198,1	0,593	180,9	0,16	192,5	123,0	4,11
Desv. estándar ( $\sigma$ )	18,4	0,384	18,3	0,28	19,7	28,8	0,35
N lotes fuera de $\pm 3\sigma$	0	0	0	0	0	0	0
Lotes rechazados, %	-	0	-	0	-	0	3,7
Capacidad de proceso: $Cpk$	-	1,03	-	1,11	-	0,962	0,538
Probabilidad de fallos (lotes no conformes), %	-	0,19	-	0,08	-	0,33	5,3

$A_{esp}$ : Actividad alérgica específica

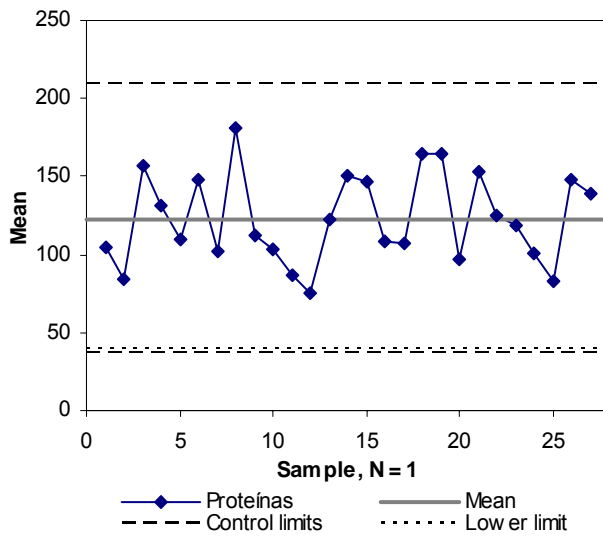




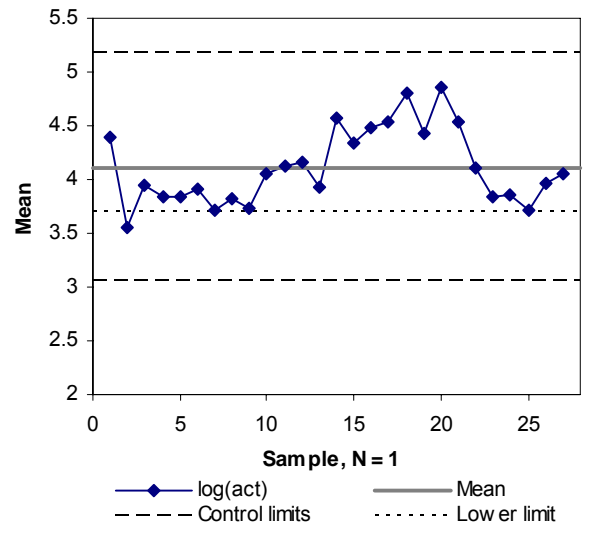
**A**



**B**



**C**



**D**

Fig. 22. Gráfico de control (X-bar, WinStat) del comportamiento de los parámetros de calidad del cultivo de ácaros: A: contenido de Der s 1; B: Der p 1, C y D: proteínas y actividad específica ["log(act)"], para BT. Leyenda: "Control limits":  $\pm 3$  sigma; "Lower limit": límite de la Especificación de Calidad.

Tabla 21. Medidas de control y desarrollos tecnológicos en las diferentes etapas del proceso de fabricación, con especial impacto en la estandarización del producto final.

Etapas del proceso	Desarrollos tecnológicos	Acciones de estandarización o control
Extracción/ Clarificación	Parámetros de extracción, tiempo, temperatura, solución tampón	Mezcla de lotes de MPA. Límites de rendimiento para Grupo 1 y proteínas
Semipurificación	Parámetros de la diafiltración/concentración. Volumen óptimo de la solución de diafiltración.	Monitoreo de eficacia de la diafiltración mediante conductividad. Límites de recobrado para Grupo 1 y proteínas
Formulación del extracto granel estéril (IFA)		Ajuste de concentración por contenido de Grupo 1 o proteínas. Límite de tiempo de procesamiento desde la extracción. Período de validez en conservación del IFA.
Liofilización	Parámetros óptimos de liofilización	

MPA: Materia Prima Alergénica

Tabla 22. Recobrados mínimos en cuanto a contenido de alérgenos y de proteínas por etapas y del proceso en su totalidad, para los lotes de Introducción de los tres extractos alérgenos.

Etapas	Recobrado de alérgenos del Grupo 1 ó actividad alérgica total	Recobrado de proteínas totales
Extracción	> 90 %	> 95 %
Diafiltración	> 90 %	30 - 40 %*
Filtración esterilizante	> 98 %	> 98 %
Liofilización	> 95 %	> 90 %
TOTAL (de todo el proceso)	> 80 %	> 30 %

(\*) Nota: Durante la diafiltración se eliminan parte de las proteínas (la fracción de bajo peso molecular) que no tiene actividad alérgica.

del proceso (concentración de sales, pH, agitación y tiempo) favorecen la extracción preferente de las proteínas solubles en medio acuoso, minimizando la contaminación del producto con el resto de las biomoléculas presentes en la MPA. Los remanentes de componentes insolubles, como restos de cuerpos de ácaros y componentes del medio de cultivo, son eliminados a continuación, mediante centrifugación y filtración.

El extracto crudo clarificado contiene aún pigmentos y otros componentes de bajo peso molecular que no poseen actividad alergénica y que deben ser eliminados. Con ese propósito, se introdujo el proceso de ultrafiltración, que consiste en una operación inicial de diafiltración, destinada a eliminar los componentes de peso molecular inferior a 10 kDa, y una operación final de concentración. En este último paso se reduce el volumen del producto, lo cual permite posteriormente su formulación a la concentración deseada. Los estudios realizados en esta etapa, permitieron definir los parámetros críticos de operación para lograr la eliminación de forma eficiente, de no menos del 99% de los componentes por debajo de 5 kDa (entre ellos, la relación óptima de solución de diafiltración con respecto al volumen de producto,  $V_D$ , Anexo 1). Otro de los estudios tecnológicos importantes fue el desarrollo de una formulación liofilizada del producto final y el ajuste del proceso de liofilización a partir de la determinación experimental de la temperatura de fusión incipiente (Anexo 2). En general el proceso de fabricación desarrollado mostró altos valores de eficiencia con un recobrado general superior al 80 % de contenido de alérgenos del Grupo 1, presente en la MPA (Tabla 22).

Además del desarrollo de procesos, se implementaron otras acciones de control que permitieron la estandarización del producto final en cuanto a composición y potencia (Tabla 21). La primera de ellas fue la mezcla de diferentes lotes de MPA. Se definieron los criterios de mezcla de entre 3 y 5 lotes de MPA para lograr un valor nominal promedio de contenido de Grupo 1 (para DS o DP) o proteínas y actividad específica para BT, con el fin de reducir la variabilidad propia de los cultivos. También se implementaron controles de procesos de alérgenos y proteínas totales en las etapas intermedias con sus respectivos límites de tolerancia, así como la formulación del producto estéril en las unidades equivalentes de Der p 1, Der s 1 o proteínas para BT que se corresponden con una potencia final de 100 000 UB por bulbo (Tabla 23). Otro elemento de estandarización, consistió en la determinación del tiempo de vida del extracto estéril a granel, como producto intermedio, mediante estudios de estabilidad en tiempo real, demostrándose su estabilidad por 15 días a

temperatura de 4°C.

Por último, determinado impacto en la estandarización tuvieron también la instrumentación de medidas generales para el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF). Entre ellas, las condiciones requeridas de las instalaciones y materia primas, estudios de validación de procesos y en particular, las destinadas a evitar la contaminación microbiana de los productos, como los límites de tiempo y el empleo de temperaturas a 4°C en las operaciones iniciales con productos no estériles.

### **Introducción a escala industrial**

Las evidencias de que el proceso productivo brinda resultados consistentes son necesarias para obtener la autorización para ensayos clínicos y el Registro.<sup>176</sup> También, el sistema de aseguramiento de la calidad según las normas ISO-9001, prevé la necesidad de la demostración de la consistencia de la calidad de los productos. Con ese propósito se ha concebido en nuestro centro el proceso de “Introducción” a escala industrial, mediante el cual se demuestra la consistencia, con al menos tres lotes consecutivos, fabricados en instalaciones industriales en condiciones de BPF. Como resultado también de la Introducción se aprobaron las Especificaciones de Calidad del producto final (Anexo 3). Se definió la presentación del producto liofilizado a 100 000 UB acompañado de un bulbo con 5 mL de Solución Diluyente, lo cual provee, una vez reconstituido, una concentración de 20 000 UB/mL.

Los tres lotes introductorios, producidos para cada extracto alergénico, cumplieron con los parámetros especificados. La variabilidad observada en los índices de calidad más relevantes (potencia y composición alergénica) fue mucho menor que el intervalo de aceptación establecido para estos parámetros (Tabla 24). También, se desarrolló un proceso paralelo de Introducción para la Solución Diluyente de Extractos Alergénicos VALERGEN. Fueron fabricados tres lotes consecutivos en instalaciones industriales de BIOCEN, los cuales cumplieron con los parámetros especificados (Anexo 3). Los lotes introductorios fueron usados para los estudios de estabilidad, toxicidad y ensayos clínicos de diagnóstico.

### **IV.3.3 Consistencia del proceso de fabricación en serie**

Con vistas a evaluar el comportamiento de los parámetros de calidad, una vez establecida la producción en serie posterior a la Introducción, se realizó un análisis estadístico de una serie de lotes consecutivos. Se tomaron en cuenta los índices de potencia alergénica total, composición alergénica y composición de proteínas, atendiendo a que son los indicadores de

Tabla 23. Formulación de los productos finales de acuerdo a su potencia alergénica y contenido de Alergenos Mayores o proteínas, por bulbo.

Producto	Contenido de alergenos o proteínas	Potencia
DP	200 µg Der p 1	100 000 UB
DS	400 µg Der s 1	100 000 UB
BT	2500 µg de proteínas	100 000 UB

Tabla 24. Resultados de los parámetros de composición y potencia alergénica de los lotes de introducción.

	Potencia alergénica total	Cont. específico de Alergeno Mayor (Der p 1/Der s 1)	Composición alergénica (Int. picos principales)
<i>n</i> lotes	9	6	18
Promedio	1,00	-	1,00
Desviación estándar	0,17	17,1%	0,08
IC95%	±0,11	±13,6%	±0,04
Límites Especificación	0,5 – 2,0	50 – 200 %	0,5 – 2,0

calidad intrínseca del producto, vinculados en mayor medida a su efectividad y seguridad clínica y los más susceptibles a la variabilidad biológica. Del total de los 28 lotes analizados (13 de DS, 5 de DP y 10 de BT, producidos entre 2004 y 2007), ninguno estuvo fuera de los límites de aceptación de la especificación y el promedio de los parámetros de calidad estuvo muy cerca de sus valores nominales (Tabla 25). Los gráficos de control (Fig. 23) muestran que tampoco, ningún lote resultó fuera del intervalo de  $\pm 3\sigma$  del valor nominal en los índices analizados. De acuerdo al análisis de capacidad del proceso, la probabilidad de fallos fue mayor para la potencia alergénica: 6,2 %; algo menor para los indicadores de composición alergénica: 5,1 % y mucho menor para la composición de proteínas. En general, esto arroja una probabilidad de éxito del proceso cercana al 94 %.

En términos generales, la desviación estándar de la potencia y la composición alergénicas, mostró valores cercanos al error de los métodos analíticos (ELISA de inhibición y WB-IgE). Para estimar el aporte del proceso en sí a la variabilidad observada ( $\sigma_{\text{obs}}$ ), partimos de que la misma se compone de la siguiente forma:

$$(\sigma_{\text{obs}})^2 = (\sigma_{\text{ensayo}})^2 + (\sigma_{\text{proceso}})^2$$

Entonces, empleando el valor de la variabilidad del ensayo de potencia tomado de los estudios de validación ( $\sigma_{\text{ensayo}} = 0,113$ ), calculamos que la variabilidad atribuible al proceso es de  $\sigma_{\text{proceso}} = 0,099$ .

#### **IV.3.4 Discusión de los resultados de la estandarización del proceso de fabricación**

##### **Estandarización del proceso de cultivo**

Los métodos descritos originariamente para el cultivo de ácaros *Dermatophagoides* empleaban como medio, fórmulas con decamaciones humanas (que constituye su alimento natural) mezcladas con proteínas de origen animal o vegetal.<sup>177 - 180</sup> Sin embargo, los requerimientos de la industria farmacéutica moderna limitan el empleo de ingredientes de origen humano debido a la posible transmisión de agentes infecciosos. Por otra parte, el medio de cultivo no debe aportar componentes alergénicos propios al producto final. El medio introducido en nuestro proceso satisface esos requerimientos, pues emplea una fórmula hipoalergénica de aminoácidos sintéticos como dieta, así como proteínas insolubles desnaturalizadas por calor y liofilizadas, como sustrato.<sup>148</sup> Más adelante, durante el procesamiento del extracto, las proteínas insolubles son eliminadas mediante centrifugación y filtración, y los aminoácidos solubles se excluyen mediante la diafiltración. De esa manera se

Tabla 25. Análisis de capacidad de proceso para los indicadores de potencia alergénica, composición de proteínas (SDS-PAGE) y composición alergénica (WB-IgE).

	Potencia Log(P)	Composición alergénica Log(intensidad relativa)				SDS- PAGE %
		15 kDa	25 kDa	16-18 kDa	Combinado	
<i>n</i> lotes	28	18	18	10	28	28
Valor nominal	5,00	0	0	0	0	-
Promedio	5,05	-0.04	0.02	-0.05	-0.03	56.2
Desviación estándar ( $\sigma$ )	0,15	0.12	0.15	0.11	0.15	12.6
lotes fuera de $\pm 3 \sigma$	0	0	0	0	0	0
Capacidad de proceso: <i>Cpk</i>	0,545					0,595
Probabilidad de fallos (lotes no conformes), %	6,2					5,1

“Combinado”: se refiere a la combinación de los indicadores de intensidad de las bandas de 15 y 25 kDa de DS y DP, calculada como la desviación máxima del valor nominal, entre ambos.

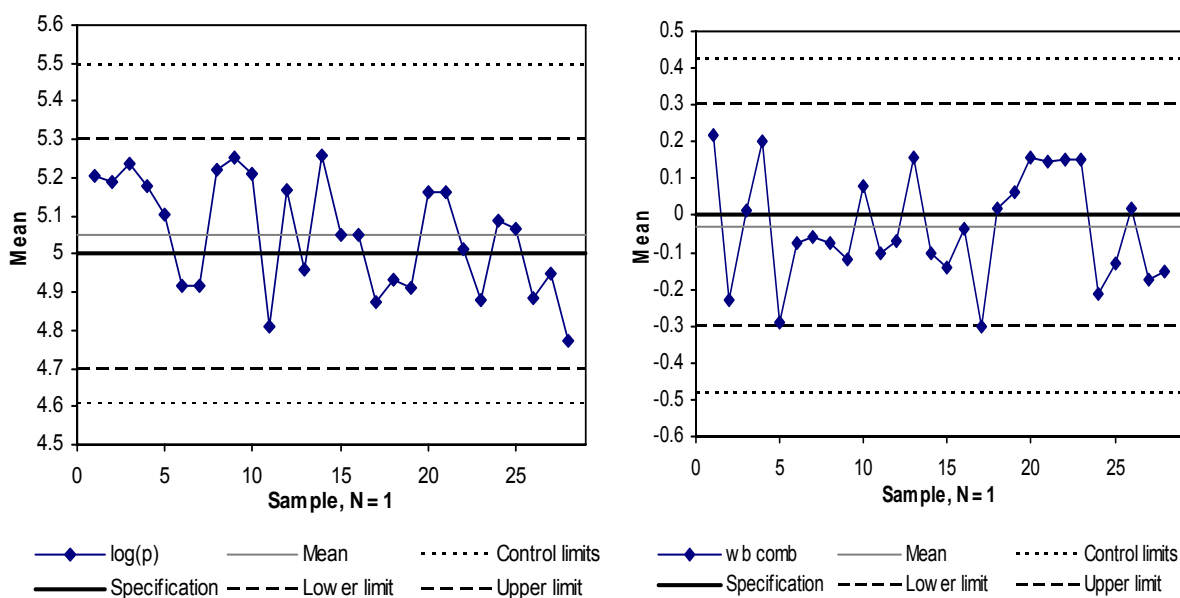


Fig. 23. Gráfico de control (X-bar, WinStat) de los valores de potencia alergénica total: Log(P), (izquierda); y del indicador de composición alergénica (derecha): intensidad combinada de las bandas de 15 y 25 kDa para DP y DS y de 16-18 kDa para BT del Western Blotting IgE (“wb comb”), transformado logarítmicamente. Leyenda: “Control limits”:  $\pm 3$  sigma; “Specification”: valor nominal de la especificación; “Lower limit”: límite inferior de la especificación; “Upper limit”: límite superior de la especificación.

garantiza la no presencia de restos del medio de cultivo en el producto final.

En adición, el proceso de cultivo desarrollado alcanza niveles altos de densidad de ácaros, estimados en 25 000 – 50 000 ácaros por gramo de cultivo, lo que equivale a 5-10 millones de ácaros y 0,1-0,2 g de alérgenos del Grupo 1 por cada lote de cultivo. Por ejemplo, en una instalación de cultivo relativamente pequeña se han alcanzado producciones anuales de hasta 2-4 g de Der p 1 o Der s 1.

Existen dos variantes de extractos alérgicos de ácaros, los preparados a partir del cultivo completo o de ácaros aislados del cultivo, los cuales se diferencian en composición. Como los alérgenos del Grupo 1 se encuentran en gran abundancia en las partículas fecales que se acumulan durante el cultivo,<sup>46</sup> los extractos de cultivo completo son muy ricos en Grupo 1 con una relación entre Grupo 1 y 2 de entre 5-10 a 1. En cambio, en los extractos de ácaros aislados, esta relación suele ser más equilibrada, de cerca de 2:1. Se ha alegado que esta última variante es más fácil de estandarizar.<sup>181</sup> No obstante, la variante seleccionada por nosotros parte del cultivo completo, aunque, la relación entre Grupo 1 y 2 no alcanza valores extremos, oscilando alrededor de 4:1 (ver Tabla 17), en lo que influyen las medidas implementadas para la estandarización del cultivo. Por otra parte, el empleo del cultivo completo es más eficiente en términos de recobrado de alérgenos y además refleja mejor la composición natural a la que está expuesto el paciente en nuestro medio tropical. Por ejemplo, en un estudio piloto realizado por nuestro grupo, el contenido de Der p 1 en el polvo colectado de la cama de pacientes alérgicos, fue de 66,7 µg/g por solo 5,4 µg/g de Der p 2, para una relación de 12:1.<sup>182</sup>

### **Proceso de fabricación del extracto**

Los extractos deben, idealmente, reflejar la complejidad natural de los alérgenos presentes en la fuente alérgica. En ese sentido el proceso de extracción juega un papel importante. El mismo debe diseñarse para reproducir en gran escala lo que ocurre en las mucosas humanas cuando las partículas alérgicas se depositan en las vías respiratorias y liberan los alérgenos que se caracterizan por su alta solubilidad. El proceso debe también minimizar la contaminación microbiana y la degradación enzimática del producto, aspectos que se alcanzan en nuestro trabajo mediante la implementación de límites de tiempo y la ejecución del proceso de extracción a 4°C.

La purificación de los extractos alérgicos es un asunto polémico y complejo desde el punto



de vista tecnológico. Actualmente, se reconoce la necesidad de eliminar los componentes de bajo peso molecular, irrelevantes desde el punto de vista alérgico y con posible efecto irritante inespecífico.<sup>181</sup> También, en nuestro caso, la implementación de un paso de purificación permite eliminar aminoácidos solubles provenientes del medio de cultivo. Con ese fin se estableció el proceso de diafiltración (ultrafiltración) que mostró grandes ventajas con respecto al empleo de la diálisis o de la cromatografía de exclusión molecular, en términos de eficiencia, facilidad para el cumplimiento de las BPF y flexibilidad en el manejo de diferentes volúmenes. El empleo de esta tecnología se encuentra acorde con el estado del arte internacional en las empresas de avanzada.<sup>181</sup> Otra de las tecnologías de avanzada en este campo fue la liofilización, la cual contribuye sustancialmente a prolongar el tiempo de vida del producto final.

### **Consistencia y estandarización**

De la eficacia de las medidas de estandarización implementadas, se puede juzgar por los resultados de los estudios de consistencia y capacidad de proceso. La variabilidad del proceso decrece monótonamente, desde la fase de cultivo (CV= 2,18) hasta el producto final (CV= 1,42) (Fig. 24), a medida que se suma el efecto de las acciones de estandarización (mezcla de MPA, controles de proceso, ajuste de concentración del formulado). La variabilidad del cultivo es superior al rango 0,5-2,0, establecido como tolerancia para el producto final, sin embargo, ya para el producto intermedio diafiltrado, como para el final, se alcanza una variabilidad menor que ese rango. La variabilidad intrínseca del proceso resultó menor, incluso, que la aportada por el error de los métodos analíticos, y comparable a la de un estudio de la FDA con 91 lotes de extractos estandarizados de DP y DF, provenientes de 11 fabricantes licenciados, que reportó una  $\sigma$  atribuible al proceso de 0,061.<sup>183</sup> En nuestro estudio con solo 28 lotes de tres productos, el valor resultó no lejano:  $\sigma = 0,099$ . En ese mismo estudio la proporción de lotes aceptados (dentro de los límites de aceptación de la FDA) fue de 93,3 %, valor similar a la probabilidad de éxito de nuestro proceso (94%) de acuerdo al análisis de capacidad de proceso. De modo, que concluimos que el proceso de fabricación desarrollado muestra una consistencia comparable a lo alcanzado por fabricantes de los países industrializados y una probabilidad de éxito razonablemente aceptable para un proceso biológico.

### **Límites**

Los límites establecidos en la Especificación de Calidad en cuanto a potencia y composición

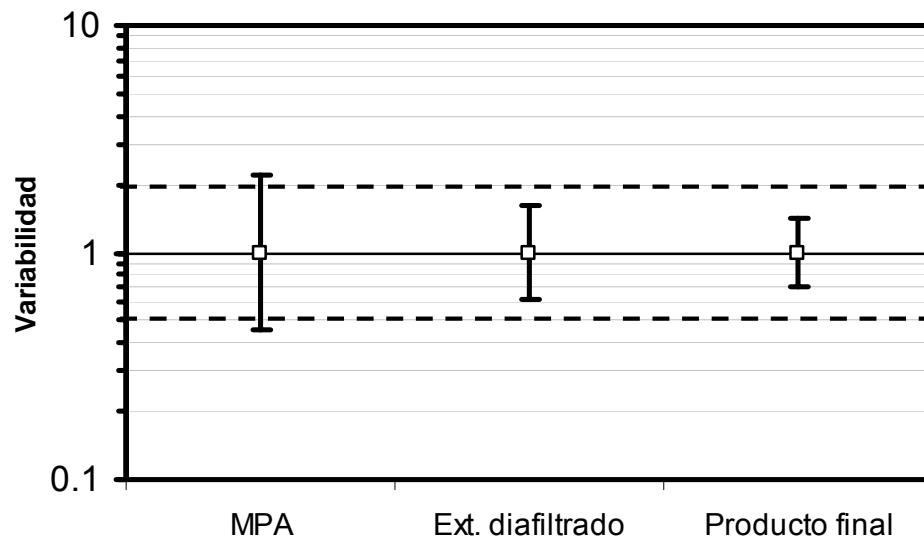


Fig. 24. Variabilidad (CV geométrico) del proceso de fabricación de vacunas alergénicas desde la Materia Prima Alergénica (MPA) hasta el producto final, en cuanto a actividad alergénica (producto final) o contenido de alérgeno del Grupo 1 (en las etapas intermedias). La línea discontinua indica los límites de aceptación para el producto final.

alergénica, del 50 al 200% del valor nominal (o sea, 0,5-2,0 de la RI) se corresponden a los recomendados primeramente por las Guías Nórdicas,<sup>127</sup> e implementados posteriormente por la Guía Europea para productos alergénicos y la Farmacopea Europea.<sup>131,132</sup> Una relación de 4 veces entre el límite superior e inferior, parece a primera vista un rango muy amplio, sin embargo, el efecto biológico, por ejemplo en la prueba cutánea, tiene una dependencia exponencial de la concentración de alérgenos y su incremento en 4 veces equivale a menos de 1 mm de aumento en el diámetro del habón. Un análisis estadístico de la FDA que profundizó en el asunto<sup>183</sup> encontró un amplio rango de equivalencia terapéutica (más de 10 veces), aunque los estudios clínicos de inmunoterapia con diferentes niveles de dosis han sido muy escasos. En cambio, un incremento de 4 veces en la dosis, de acuerdo a ese análisis, pudiera causar un aumento del 5 al 10% en las reacciones adversas durante la IT, valor todavía considerado aceptable. En consecuencia, la FDA amplió ligeramente sus límites originales, ajustados estrictamente a la precisión de su ensayo de potencia, armonizándolos con los de Europa a 50-200%.<sup>135,183</sup> En concordancia con lo publicado, en nuestro estudio, la mayor limitante para la reducción del rango de tolerancia sería la precisión del método analítico para la potencia alérgica.

#### **IV.3.5 Elementos de salida de la estandarización del proceso de fabricación**

En resumen, los trabajos realizados para el desarrollo tecnológico y la implementación de medidas de estandarización en los procesos de propagación de ácaros y de fabricación de los extractos alergénicos permitieron obtener una tecnología, capaz de cumplir los requerimientos de las BPF, con adecuada eficiencia, expresada en altos valores de recobrado de los alérgenos presentes en el cultivo, y calidad consistente en cuanto a potencia y composición del producto final; lo cual fue confirmado mediante el análisis de la producción en serie. Los requisitos de calidad y la consistencia demostrada se corresponden con los resultados de los fabricantes de avanzada de países desarrollados y los requerimientos regulatorios internacionales.

#### **IV.4 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD**

La estabilidad de los productos farmacéuticos es un requisito de calidad, esencial para garantizar su eficacia y seguridad, e indispensable para lograr el Registro. Los estudios de estabilidad se diseñan para aportar evidencias sobre la conservación de los principales

parámetros de calidad del producto durante su tiempo de vida y establecer su período de validez. Los extractos alergénicos son mezclas de proteínas, y por lo tanto susceptibles a degradación al igual que otros productos biológicos. Se conoce que la estabilidad de los extractos alergénicos acuosos es sumamente limitada, con degradación significativa de la actividad alergénica en períodos inferiores a los 12 meses de almacenamiento a 4°C.<sup>54,55</sup> Una de las principales causas a la que se atribuye su degradación es la actividad enzimática proteolítica, inherente a varios alérgenos de ácaros.<sup>184,185</sup> Entre los métodos empleados para elevar la estabilidad de los extractos alergénicos, la liofilización es el más efectivo.

Con el objetivo de establecer la estabilidad y el período de validez de las tres vacunas alergénicas desarrolladas, se realizaron estudios de estabilidad a tiempo real para los productos liofilizados y reconstituidos, respectivamente, a la temperatura de conservación de 4°C. Este último estudio se realizó a cuatro concentraciones diferentes (diluciones) teniendo en cuenta, la aplicación de los productos tanto en el diagnóstico, como en la IT. Se tomaron como principales parámetros de calidad: la potencia alergénica total y la composición alergénica. Adicionalmente, se determinó la estabilidad del liofilizado a altas temperaturas (37°C), con el objetivo de estudiar su comportamiento en condiciones extremas, causadas por la ausencia o fallo de los sistemas de refrigeración.

#### **IV.4.1 Estabilidad de los liofilizados**

Los resultados del estudio de estabilidad con tres lotes consecutivos de cada producto, después de 66 meses de conservación, no denotaron degradación significativa del principal parámetro de calidad, la potencia alergénica total, tanto a 4 como a 37°C (Fig. 25). Los valores de todos los lotes, al final de ambos estudios, fueron superiores al límite establecido. En general, se apreció una tendencia ligeramente decreciente de este parámetro, más aguda para 37°C. No obstante, las rectas de regresión según el modelo semilogarítmico, que se corresponde con una cinética de primer orden, no mostraron pendientes significativamente diferentes de 0 ( $p=0,05$ ) con la sola excepción del estudio de BT a 37°C (pendiente menor que 0,  $p<0,05$ ) (Tabla 26, Fig. 26). También en el caso de BT a 4°C, el análisis de los lotes por separado, mostró que la tendencia hacia el decrecimiento fue mucho más marcada para dos lotes (2 y 3), alcanzando valores significativos ( $p=0,02$ ). Por esa razón (o sea, una creciente diferencia entre lotes) se apreció un incremento en los intervalos de confianza del valor promedio (Fig. 25), especialmente en las últimas fechas.

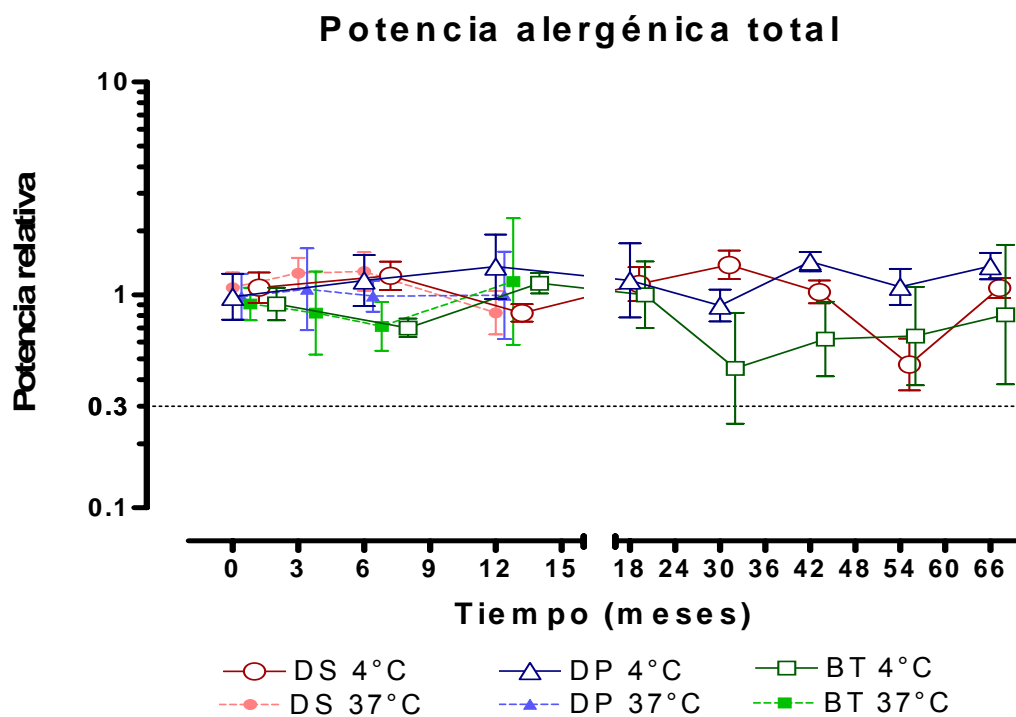


Fig. 25. Potencia alergénica, promedio de los tres lotes de cada producto a 4°C y 37°C. Las barras verticales representan el intervalo del 95 % de confianza. La línea discontinua representa el límite inferior de aceptación en el estudio de estabilidad.

Tabla 26. Resultados del análisis de regresión lineal de Log(P<sub>R</sub>) en función del tiempo (n = 12) y predicción del tiempo de vida.

Estudio	Pendiente	IC 95%	Significación estadística	Predicción mínima, años (P <sub>R</sub> = 0,3)
DS 4°C	-0,0022	[-0,0050 a 0,0005]	NS	21,6
DS 37°C	-0,0058	[-0,0154 a 0,0038]	NS	8,9
DP 4°C	-0,0012	[-0,0009 a 0,0033]	NS	52,1
DP 37°C	-0,0022	[-0,0080 a 0,0035]	NS	5,6
BT 4°C	-0,0020	[-0,0056 a 0,0015]	NS	6,9
(lotes 2 y 3)	(-0,0042)	( [-0,0076 a -0,0008] )	(p= 0,02)	(4,9)
BT 37°C	-0,0114	[-0,022 a -0,001]	p= 0,04	1,1

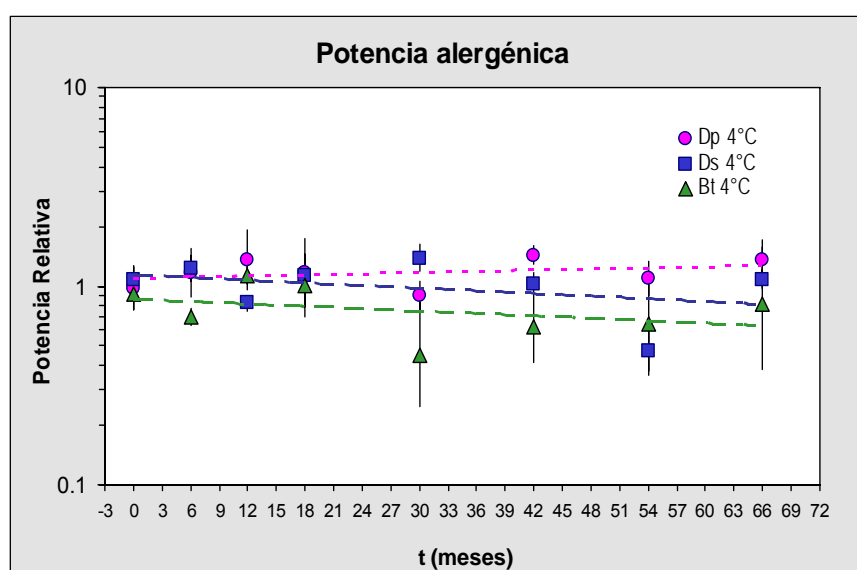


Fig. 26. Análisis de regresión de la potencia alergénica en función del tiempo, para los datos a 4°C de los tres productos. Las líneas discontinuas representan las rectas de regresión, según el modelo:  $\log(P_R) = k t + l$ .

La composición alérgica, en cuanto a patrón de unión de IgE (número de bandas e intensidad de las mismas) se mantuvo similar a las respectivas RI (Fig. 27). La intensidad de las bandas principales (15-17 y 25 kDa para DP y DS y 16-18 kDa para BT) se mantuvo dentro de los límites de aceptación para todos los lotes almacenados a 4°C, aunque en el caso de BT, mostró una tendencia ligeramente decreciente, más marcada en los lotes 2 y 3. En el estudio a 37°C, en tres ocasiones se detectaron valores de intensidad de la banda 15-17 kDa por debajo del límite de especificación, aunque no por debajo del límite del estudio (30 % del valor nominal). En general, para esta temperatura, se observó una mayor variabilidad entre lotes, reflejada en mayores valores de los IC95% de la intensidad promedio. Por otra parte, la composición de proteínas (SDS-PAGE) se mantuvo inalterable en todos los casos, conservándose el patrón característico de bandas, así como el área relativa bajo los picos de 15-17 y 25 kDa (para DP y DS) y de 12 a 21 kDa (para BT) por encima del límite establecido del 30 % del total de cada producto.

El resto de los parámetros de calidad estudiados (pH, tiempo de reconstitución, propiedades organolépticas, esterilidad), permanecieron sin cambios a ambas temperaturas. Sin embargo, en un lote de DP, en los tres de DS y en uno de BT, de los almacenados a 37°C, se produjo el colapsamiento o reducción de la estructura del taco liofilizado a los 12 meses, indicador de cambio de fase que se asocia a un incremento de la velocidad de degradación.

A partir del análisis de tendencia se calculó la predicción de vida mínima de los productos, o sea, el tiempo mínimo probable en que la potencia decrecería hasta el límite establecido (30 % del valor nominal). Los resultados para los tres productos liofilizados se muestran en la Tabla 26. La predicción de vida mínima a 4°C osciló entre 52 años para DP y 6,9 para BT, en todos los casos superior a la duración del estudio (5,5 años). Solamente en el caso del análisis separado para dos lotes de BT se observó un período inferior: 4,9 años.

#### **IV.4.2 Estabilidad de los productos reconstituidos y las diluciones**

Los estudios de estabilidad del producto en solución tienen el objetivo de determinar su tiempo de vida, una vez reconstituido con la Solución Diluyente, para su uso clínico. Como complemento a estos estudios, se realizó también el estudio de estabilidad de la Solución Diluyente que contiene seroalbúmina humana como excipiente estabilizador y fenol como agente preservante. Dicho estudio, que se realizó con muestras de tres lotes industriales consecutivos, conservadas a 4°C, demostró la estabilidad de todos los parámetros de calidad,

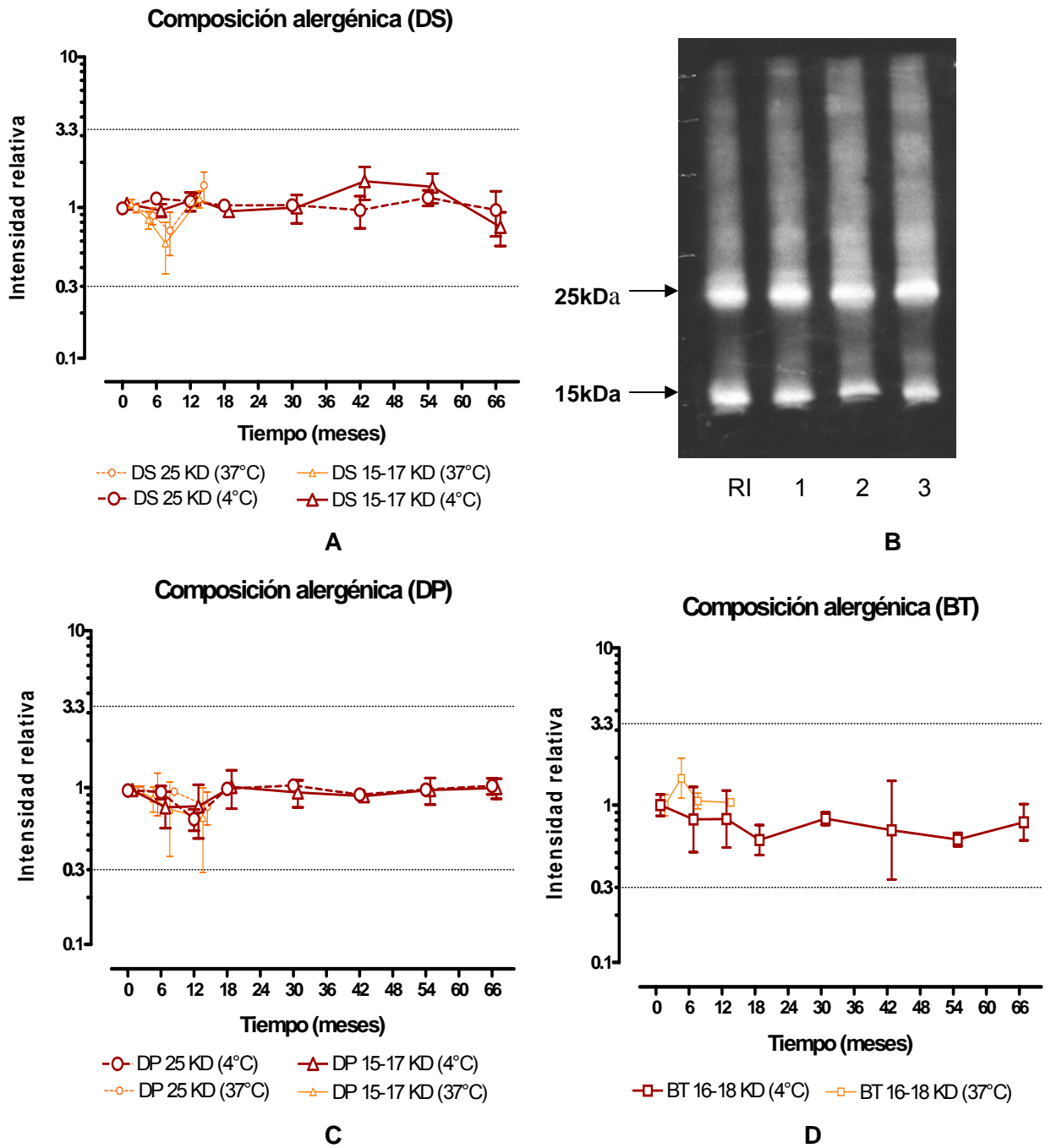


Fig. 27. Estabilidad de la composición alergénica de los extractos liofilizados de DS (A), DP (C) y BT (D) a 4 °C y 37 °C, medida a través de la intensidad relativa a la RI, de las bandas de 15-17 y 25 kDa (para DP y DS) y de 16-18 kDa (para BT) en el ensayo de Western Blotting IgE. Se muestran los valores promedios y su IC95%, calculados a partir de los tres lotes en estudio. Las líneas discontinuas indican los límites de aceptación del estudio. En B se muestra una fotografía del patrón de bandas para los tres lotes de DS ("1, 2, 3"), después de 66 meses de almacenamiento a 4°C.



particularmente del contenido de albúmina y de fenol, durante 66 meses.

Como las vacunas de alérgenos se preparan en diluciones a diferentes concentraciones, los estudios de estabilidad se llevaron a cabo, además de con el producto reconstituido (20 000 UB/mL), con otras tres diluciones seriadas 1:10, desde 2000 hasta 20 UB/mL. Como parámetro fundamental se determinó la potencia alérgica total. Los cambios en la composición alérgica fueron estimados a partir de diferencias en el paralelismo de las rectas muestra con respecto a la RI en dicho ensayo y se analizó también el contenido de Der s 1 y Der p 1, respectivamente para DS y DP.

La potencia alérgica total se mantuvo superior al límite establecido en todos los lotes de DS y DP a las concentraciones de 20, 200 y 2000 UB/mL. Sin embargo dos lotes de DS a 20 000 UB/mL mostraron valores inferiores al límite, a los 12 meses de conservación. Se observó además una tendencia significativa ( $p= 0,05$ ) hacia el decaimiento de la potencia en las dos concentraciones más altas de DS (Fig. 28) y en la más alta de DP. Este fenómeno no fue observado para BT donde todas las muestras en todas las fechas mantuvieron valores de potencia superiores al límite especificado. En todos los ensayos de potencia las rectas de la muestra y de referencia resultaron paralelas (Prueba *t* de Student,  $p= 0,05$ ), indicando que la composición cualitativa de los productos no sufrió cambios de consideración. El contenido de Der s 1 o de Der p 1 no sufrió cambios significativos. Los parámetros físico-químicos no sufrieron tampoco cambios. No se detectaron diferencias significativas ( $p= 0,05$ ) entre las posiciones normal e invertida en ninguna fecha, indicando la no influencia del tapón sobre la estabilidad del producto.

#### **IV.4.3 Discusión de los resultados de estabilidad**

A pesar del uso extensivo de extractos alérgicos desde hace casi un siglo y la existencia en el mercado de productos estandarizados y registrados, no hay apenas información sobre estudios de estabilidad. En los escasos estudios publicados se ha documentado la estabilidad de los extractos alérgicos de ácaros DP y DF en formulación glicerinada por hasta 24-36 meses y acuosa por 6-12 meses.<sup>184-187</sup> En estos estudios se han tomado como referencia extractos liofilizados, asumiendo que es la forma más estable, sin embargo no hay datos que documenten su estabilidad en tiempo real. Un artículo reciente estimó la estabilidad de Der p 1 purificado liofilizado, a partir de un estudio acelerado, determinando una degradación anual de 3,4 %;<sup>126</sup> valor similar al calculado en nuestro trabajo (3,2% para DP; 1,3 % para DS).

Los resultados de este trabajo demuestran la superioridad de la formulación liofilizada sobre la acuosa, y posiblemente, también sobre la glicerizada, en lo que respecta a estabilidad. No obstante, el producto reconstituido y las diluciones preparadas en la solución acuosa empleada, mantuvieron su estabilidad por al menos 6 meses, tiempo suficiente para su uso en diagnóstico o inmunoterapia. Entre los factores que inciden sobre la estabilidad de la formulación acuosa se han descrito, la adsorción a las paredes del frasco (sobre todo para las diluciones altas) y el efecto deletéreo del fenol sobre las proteínas; no obstante, se conoce que ambos efectos pueden contrarrestarse con la adición de albúmina humana que actuaría como estabilizante,<sup>188</sup> como se ha empleado aquí.

Por otra parte, un papel importante en la degradación de los extractos alérgicos se le atribuye a su actividad enzimática proteolítica intrínseca.<sup>184</sup> En el caso de los extractos de ácaros *Dermatophagoides* se conoce la existencia de diferentes proteínas con actividad proteolítica, particularmente los Alérgenos Mayores del Grupo 1 (Der p 1, Der s 1), que son cisteíno-proteasas,<sup>50,189</sup> así como, otros alérgenos con actividad serino-proteasa: Grupo 3, 6 y 9.<sup>44</sup> A partir del análisis matemático de la cinética de degradación observada y su dependencia de la concentración del producto, se demuestra a continuación que la misma es compatible con un mecanismo de degradación enzimática.

#### **Modelación del mecanismo de degradación del extracto alérgico en solución**

En las Figs. 28 y 29 se puede apreciar, cómo la velocidad de degradación de la potencia alérgica resultó mayor, a mayor concentración del producto, en este caso particular, DS. El orden de la reacción (n) calculado según la ecuación de Noyes,<sup>190</sup> empleando las dos rectas de regresión de las diluciones de 2000 y 20 000 UB/mL (Fig. 28), sería:

$$n = 1 + [\log(t_{1/2}) - \log(t'_{1/2})]/[\log(2000) - \log(20\ 000)] = 1,33 \approx 1$$

donde:  $t_{1/2}$ ,  $t'_{1/2}$ : son los tiempos de vida media calculados, para las diluciones de 20 000 y 2000 UB/mL, respectivamente. Este resultado confirma la asunción inicial de que el decaimiento de la potencia se describe a través de una reacción de primer orden.

Por otra parte, como es posible observar en la Fig. 29, la velocidad de degradación [pendiente de la ecuación  $\log(P)$  vs.  $t$ ], resultó proporcional a la concentración del producto ( $r = 0,97$ ). Este resultado, aunque paradójico ha sido descrito también por otros autores.<sup>191</sup> Esta dependencia podría explicarse favorablemente a través de un mecanismo de degradación enzimática. La velocidad de la reacción enzimática se describe por la ecuación de Michaelis-Menten:

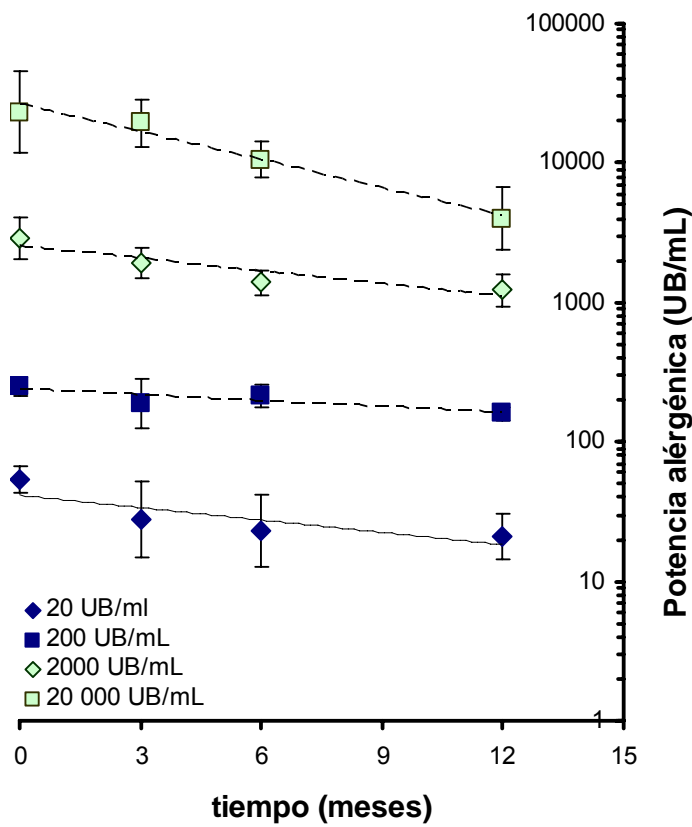


Fig. 28. Gráfico comparativo de la velocidad de degradación de las diferentes diluciones de DS. Las líneas discontinuas muestran la línea de tendencia, determinada mediante una regresión lineal de  $\log(P)$  vs.  $t$ , de acuerdo a un modelo cinético de primer orden.

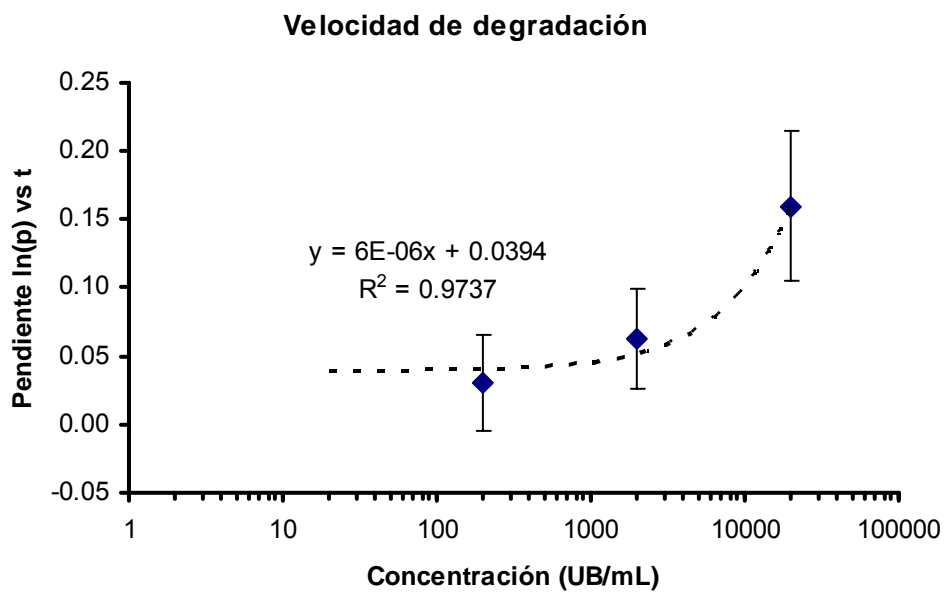


Fig. 29. Dependencia de la velocidad de degradación de la concentración del producto (DS) expresada en UB/mL. (- - -) Línea de regresión lineal para los puntos correspondientes a las tres primeras diluciones.

$$dS/dt = -V_{\max}S/(K_m + S) \quad [1]$$

donde S es la cantidad de sustrato,  $V_{\max}$  es la velocidad máxima de reacción que se alcanza cuando el sustrato está en exceso con respecto a la enzima ( $S \gg E$ ) y  $K_m$  es la cantidad de sustrato necesaria para alcanzar  $V_{\max}/2$ , También se conoce que  $V_{\max} = kE_0$ , donde  $E_0$  es la concentración inicial de enzima y  $k$  una constante de reacción.

En el caso específico de este producto se conoce que la actividad alérgica está concentrada fundamentalmente en dos componentes principales: 25 kDa (Der s 1) y 15-17 kDa. A Der s 1 se le atribuye también la mayor parte de la actividad enzimática proteolítica del producto y además es un componente mayoritario constituyendo cerca del 10 % de las proteínas. O sea, en el modelo que proponemos Der s 1 sería la enzima y la fracción de 15-17 kDa, el sustrato fundamental, lo cual concuerda con la estabilidad en el contenido de Der s 1 en las diluciones, a pesar de la reducción de la actividad alérgica total. Según este modelo, la concentración de sustrato (banda 15-17 kDa) sería mucho menor que la necesaria para alcanzar  $V_{\max}$ , o sea, sería menor que la concentración de enzima:  $[E] \geq [S]$ . De lo cual se deduce que  $[S] \ll K_m$  y la expresión [1] se reduciría a:

$$dS/dt = -V_{\max}S/K_m \quad [3]$$

Integrando [3] se obtiene:  $\ln(S) = -\mu t + \text{Const.}$

O sea, una ecuación de reacción de primer grado, donde  $\mu = E_0k/K_m$  es la velocidad de degradación, que resulta proporcional a la concentración inicial de enzima  $E_0$ . Es decir, se logra una correspondencia adecuada entre el modelo teórico basado en una reacción enzimática y los datos experimentales descritos por una cinética de primer orden.

Experimentos posteriores realizados por nuestro grupo, han confirmado la presencia de actividad enzimática proteolítica en los extractos de DP, DS y BT, y particularmente la del alérgeno purificado Der s 1, evidenciado que su actividad intrínseca, bajo condiciones apropiadas, puede contribuir a la degradación del producto.<sup>192</sup>

#### **IV.4.4 Elementos de salida de los estudios de estabilidad**

En resumen, se concluye que los extractos alérgicos liofilizados de DP, DS y BT son estables por al menos 66 meses en el caso de DP y DS, y 54 meses para BT, en condiciones de refrigeración a 4°C. Los productos además, pueden estar sometidos a temperaturas ambientales elevadas (37°C) por un máximo de 6 meses sin afectaciones. Basándose en los

resultados obtenidos, a los extractos de DP y DS les fue aprobado por el CECMED un período de validez de 60 meses, que se corresponde con el máximo permitido en el país para un producto farmacéutico. Al extracto de BT se le concedió un período de validez de 54 meses. Los productos, una vez reconstituidos y diluidos, mantienen sus parámetros de calidad por al menos 12 meses conservados a 4°C, excepto para la concentración de 20 000 UB/mL, para la cual el período de vida se reduce a 6 meses. También se concluye que estos productos son más estables a bajas concentraciones (20 - 200 UB/mL) que a altas (2000 - 20 000 UB/mL) y la cinética de degradación puede ser descrita por un mecanismo enzimático.

#### **IV.5 ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS**

Los estudios preclínicos de toxicidad son imprescindibles para evidenciar la seguridad de los productos farmacéuticos para su administración en humanos. Aunque los extractos alérgicos han sido empleados durante décadas en pruebas cutáneas y en inmunoterapia, sin haberse descrito, aparentemente, síntomas tóxicos en los pacientes; a partir de su inclusión entre los productos biofarmacéuticos sometidos a Registro, se hace obligatorio también evidenciar su seguridad desde el punto de vista toxicológico en ensayos específicos en modelos animales. Con ese objetivo se realizaron dos estudios de toxicidad: aguda (por administración única) y por dosis repetida, en dos especies de animales cada uno, de acuerdo a lo recomendado por las regulaciones internacionales.<sup>127,193</sup> Para el segundo estudio se aplicó el concepto de agrupamiento taxonómico de alérgenos homólogos, establecido en la regulación europea y la regulación del CECMED para el Registro de productos alérgicos,<sup>131</sup> que permite la extensión del alcance de los estudios clínicos y preclínicos dentro de un grupo de alérgenos similares. De ese modo, dicho estudio se realizó solamente con las vacunas de BT y DS, atendiendo a la cercanía taxonómica y alérgica de esta última especie con DP.

A continuación exponemos de forma breve los resultados de dichos estudios que han sido publicados en su mayor parte (Anexo 4). En el estudio de toxicidad aguda, los resultados para los tres productos fueron coincidentes. No se observaron síntomas de toxicidad, ni mortalidad relacionados con la administración de los productos. Ambos grupos de animales (estudio y control) incrementaron la masa corporal sin encontrarse diferencias significativas entre ellos ( $p= 0,05$ ). En las observaciones macroscópicas de las necropsias no se detectaron alteraciones relacionadas con el producto en ensayo.

En el estudio de toxicidad por dosis repetida no se encontraron alteraciones de las variables empleadas, tanto clínicas como de laboratorio, que pudieran ser interpretadas como patológicas y tóxicas. La mayor parte de las variables resultaron no significativas ( $p= 0,05$ ) con respecto al control y en los casos donde hubo alguna diferencia escasamente significativa, los valores estaban comprendidos entre los rangos normales para cada especie y sexo. Se encontraron algunas alteraciones histológicas en el sitio de inyección, compatibles con la inducción de una respuesta inmunológica, tales como reclutamiento de células presentadoras de antígenos. Determinados síntomas de toxicidad local (como hemorragias) observadas en algunos animales, fueron atribuidos al efecto tóxico del fenol, empleado como preservante del Diluyente, lo cual se demostró en los estudios donde se empleó un grupo control adicional con solución salina, solamente. No obstante, la concentración de fenol usada (0,4%) está dentro del rango de lo admitido como seguro para la administración en humanos por vía inyectable.

En general, se concluye que en ambos estudios no se observaron síntomas de toxicidad atribuibles al componente activo (extracto alergénico) demostrando la inocuidad del producto para su administración por vía inyectable subcutánea, tanto a una dosis aguda, mucho mayor que la empleada en humanos, como por efecto de su administración continuada. No obstante, debe notarse que el principal factor de riesgo para la inmunoterapia con alérgenos es la actividad alergénica intrínseca de la vacuna, que en individuos sensibilizados puede ocasionar reacciones locales y sistémicas. Este aspecto no se puede abordar adecuadamente en modelos animales, de modo que puede ser evaluado solamente en los ensayos clínicos. Para garantizar la seguridad de la inmunoterapia es esencial contar con un sistema de estandarización basado en la actividad alergénica que permita un control preciso de las dosis administradas.

#### **IV.6 ENSAYOS CLÍNICOS PARA DIAGNÓSTICO POR PRUEBAS CUTÁNEAS**

El diagnóstico alérgeno-específico es imprescindible para la correcta indicación de la inmunoterapia. La prueba de punción cutánea es el método más difundido y de mayor seguridad para el paciente, entre otras variantes de pruebas *in-vivo*.<sup>84</sup> La prueba cutánea cuantitativa constituye también una herramienta útil para evaluar cambios en la sensibilización

alérgica y la eficacia de la IT. Por estas razones, la evaluación clínica de nuestros productos para diagnóstico por punción cutánea, constituyó una etapa necesaria en su desarrollo como vacunas terapéuticas.

La prueba cutánea se emplea, en primer lugar, para identificar el alérgeno causante de la manifestación alérgica. No obstante, tiene también, potencialmente, la capacidad de diagnosticar la manifestación clínica de la enfermedad. De acuerdo a los requerimientos regulatorios, la validación clínica de los productos para diagnóstico, debe basarse en la determinación de su sensibilidad y especificidad en relación a la enfermedad,<sup>152</sup> o sea, debe emplearse un diagnóstico de referencia o “patrón oro”. Una de las dificultades básicas para alcanzar dicho objetivo es la falta de una definición precisa, universalmente aceptada, de la enfermedad alérgica, y por lo tanto de un verdadero “patrón oro”.<sup>194, 195</sup> En particular, la presencia de sensibilización (IgE, respuesta cutánea positiva) en personas asintomáticas no tiene una interpretación unívoca, ya que, más bien, se considera indicador de un estadio temprano de la enfermedad alérgica, más que una respuesta “falsa positiva”.<sup>195</sup> En el caso de los ácaros domésticos en condiciones tropicales, el criterio que define la enfermedad alérgica respiratoria sería la existencia de sintomatología perenne, asociada a la exposición al polvo casero. Por lo tanto, se parte de la premisa de que las tres especies de ácaros: DP, DS y BT, juegan un papel preponderante como alérgenos del polvo doméstico en nuestras condiciones, con respecto a otros posibles alérgenos respiratorios; premisa sustentada por investigaciones anteriores.<sup>76,77</sup>

De esa forma, el objetivo primario de los ensayos clínicos de diagnóstico fue evaluar el desempeño de los productos en la prueba de punción cutánea, tomando como indicadores principales de eficacia diagnóstica (también llamada exactitud diagnóstica) la sensibilidad y especificidad. Otro objetivo, en el caso de DP, fue comparar estos indicadores, así como el tamaño de la reacción cutánea con productos comerciales similares, registrados en el extranjero. Asimismo, se persiguió la estandarización de la prueba en cuanto a selección de dosis del producto y valor de corte, con el balance más adecuado de sensibilidad/especificidad. Con ese fin, se realizaron tres ensayos clínicos independientes en adultos, con los tres productos, respectivamente, (VALERGEN-DP, BT y DS) y un ensayo adicional en niños con los tres productos simultáneamente. En el ensayo con VALERGEN-DP en adultos, se emplearon otros dos productos comerciales de referencia de DP. En cada

ensayo participaron 50 pacientes alérgicos y 50 no alérgicos, a los cuales se les aplicó la prueba cutánea.

#### **IV.6.1 Eficacia del diagnóstico en adultos**

En el conjunto de los tres ensayos el rango de edades fue 16-50 años con una edad promedio de 29,7 y 30,6 años, en los grupos de alérgicos y no alérgicos, respectivamente. Las manifestaciones alérgicas más frecuentes fueron rinitis (82%) y asma (60%). En el grupo de alérgicos del ensayo con DP, de 50 individuos, 41 mostraron pruebas positivas a VALERGEN-DP y al extracto de Stallergenes, y 40 al de ALK; 39 pacientes fueron positivos simultáneamente a los tres productos. En el grupo de voluntarios no alérgicos, se registraron reacciones positivas en un individuo a VALERGEN-DP y ALK y en dos, al de Stallergenes. En general, se observó una alta coincidencia (99 %) en el diagnóstico entre VALERGEN-DP y ALK, algo menor en comparación con Stallergenes (97%). La diferencia entre ambos productos comerciales fue, incluso, mayor (96% de coincidencia). VALERGEN-DP provocó una media geométrica del área del habón, en los pacientes positivos, de 43,5 mm<sup>2</sup>, aparentemente mayor que los otros dos productos comerciales (Fig. 30), aunque la diferencia fue significativa sólo con respecto a ALK ( $p < 0,01$ , ANOVA de datos pareados, Prueba de Tukey). La respuesta hacia los tres productos entre los pacientes alérgicos estuvo altamente correlacionada ( $r$  entre 0,8 y 0,9; Tabla 27).

En el ensayo con VALERGEN-DS, la dosis de 20 000 UB/mL provocó una media geométrica del área del habón, en los pacientes positivos alérgicos de 24,1 mm<sup>2</sup>, significativamente mayor que para la dosis de 2000 UB/mL (Prueba  $t$  para muestras pareadas,  $p = 4e-14$ , Fig. 30). En el otro estudio en adultos, VALERGEN-BT a 20 000 UB/mL produjo un habón promedio de 31,4 mm<sup>2</sup>. También en este caso, la diferencia fue muy significativa con respecto a la dosis de 2 000 UB/mL ( $p = 3e-08$ , Fig. 30).

Los resultados de eficacia del diagnóstico se relacionan en la Tabla 28. Para VALERGEN-DP, los valores de sensibilidad y eficiencia diagnóstica fueron aparentemente algo superiores a los de ALK y Stallergenes, aunque las diferencias no alcanzaron a ser significativas (prueba  $\chi^2$ ,  $p > 0,05$ ), mientras que el valor de especificidad fue idéntico. Para VALERGEN-DS y BT, la especificidad fue independiente de la concentración empleada y cercana al 100% en ambos casos. En contraste, la sensibilidad, y por consiguiente, la eficiencia diagnóstica, fueron significativamente superiores para la concentración de 20 000 UB/mL (prueba  $\chi^2$ ,  $p = 0,001$  y



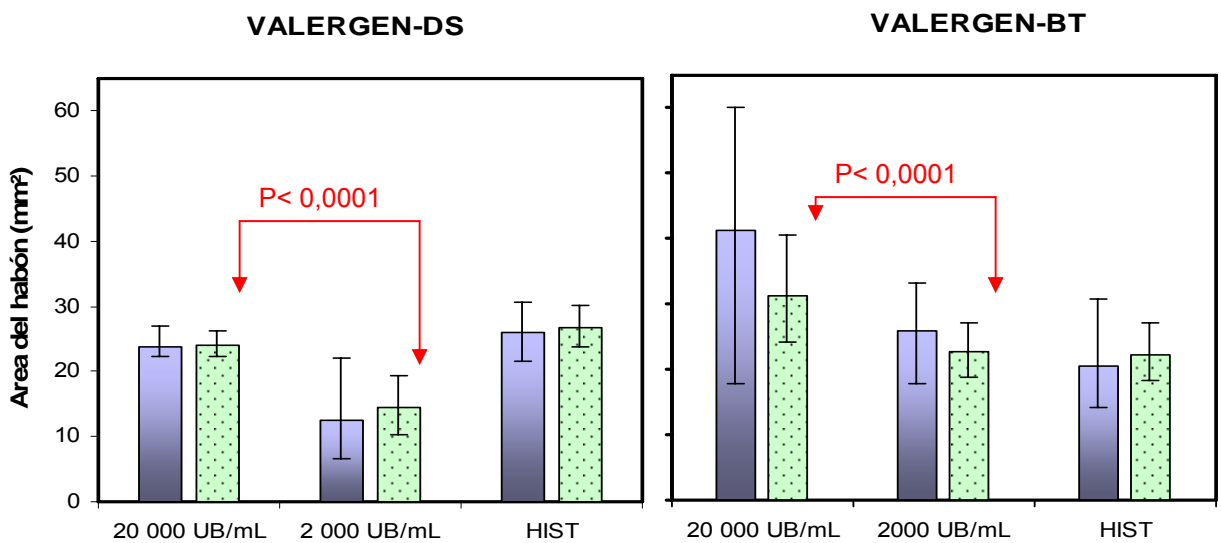
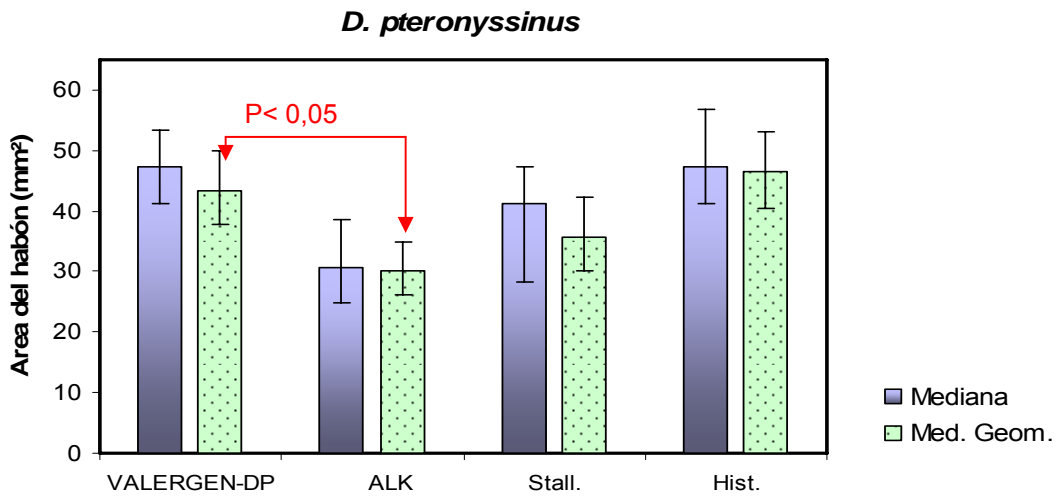


Fig. 30. Mediana y media geométrica del área del habón en los pacientes adultos positivos del grupo de alérgicos para los diferentes productos utilizados, respectivamente en el ensayo comparativo con DP (arriba) y con DS y BT (abajo). Las barras verticales muestran el IC95%. Se indica la significación estadística de acuerdo al ANOVA con prueba complementaria de Tukey (arriba) y prueba *t* de Student (abajo).

Tabla 27. Correlación entre el área de la reacción cutánea con los diferentes extractos alérgicos de DP, en los pacientes alérgicos adultos.

	VALERGEN-DP	ALK
ALK	0,814 p< 0,001	-
Stallergenes	0,817 p< 0,001	0,908 p< 0,001

$p= 0,0003$ , para DS y BT, respectivamente).

En la Fig. 31 se muestran la relación de la especificidad y la sensibilidad con respecto al límite de corte de la prueba. Como se puede apreciar, el comportamiento de la especificidad es muy parecido en todos los ensayos y productos; alcanza su valor máximo, a partir de aproximadamente 1,5 mm y permanece inalterable, independientemente del valor de corte. En contraste, la sensibilidad desciende abruptamente con el incremento del valor de corte. Su comportamiento fue muy similar entre los tres productos de DP. Para DS y BT exhibió valores sistemáticamente superiores para la dosis de 20 000 UB/mL, con una zona de meseta desde aproximadamente 1,5 mm hasta 3-5 mm. El valor de corte empleado (3 mm), estuvo situado en dicha meseta en todos los productos a 20 000 UB/mL. En cambio, para 2 000 UB/mL el límite de corte ideal estaría situado alrededor de 1,5 mm.

Otra forma de analizar la relación entre sensibilidad y especificidad es la llamada curva ROC. En la Fig. 32 se muestra una curva ROC típica, en este caso, la correspondiente a DS a 20 000 UB/ml. El área bajo la curva ROC permite evaluar la capacidad general de la prueba de discriminar entre individuos enfermos y no enfermos, independientemente del valor de corte seleccionado. La prueba perfecta tendría un área bajo la curva igual a 1,00. Los valores obtenidos de área bajo la curva ROC para 20 000 UB/mL oscilaron entre 0,87 y 0,97 y todos fueron significativamente diferentes de 0,5; valor que equivale a una prueba de capacidad diagnóstica nula (Tabla 29). Los correspondientes a VALERGEN-DP y DS fueron similares a lo obtenido para los productos comerciales de DP.

#### **IV.6.2 Eficacia del diagnóstico en niños**

En el ensayo realizado en niños con los tres productos simultáneamente, el rango de edades fue de 2 a 15 años con un promedio de 8,4 y 7,9 años, respectivamente, para los grupos de alérgicos y no alérgicos. Las manifestaciones alérgicas más frecuentes fueron rinitis (96%) y asma (74%). La dosis de 20 000 UB/mL provocó habones, desde 18,8 mm<sup>2</sup> (BT) hasta 24,2 mm<sup>2</sup> (DP), en los pacientes positivos como promedio; valores significativamente mayores que los obtenidos con 2000 UB/mL, en todos los casos ( $p<0,01$ ; ANOVA, Prueba de Tukey, Fig. 33). En general, los habones de DP y DS fueron muy similares entre ellos y ligeramente mayores que los inducidos por BT, aunque la diferencia no alcanzó ser significativa ( $p> 0,05$ ). La correlación observada entre DP y DS fue relativamente elevada ( $r= 0,60-0,71$ ), en contraste con una correlación mucho menor entre DP o DS y BT ( $r= 0,38-0,43$ ).

Tabla 28. Resultados de las variables de eficacia en adultos con VALERGEN-DP y otros dos productos comerciales de DP y con dos diferentes concentraciones de VALERGEN-DS y VALERGEN-BT, en adultos.

Variable	DP			VALERGEN-DS		VALERGEN-BT	
	VALERGEN-DP 20 000 UB/mL	ALK	Staller- genes	2 000 UB/mL	20 000 UB/mL	2 000 UB/mL	20 000 UB/mL
Sensibilidad (%)	82,0	80,0	82,0	62,0	90,0	56,0	78,0
IC95%	± 10,6	± 11,1	± 10,6	± 13,5	± 8,3	± 13,8	± 11,5
Especificidad (%)	98,0	98,0	96,0	98,0	94,0	94,0	96,0
IC95%	± 3,9	± 3,9	± 5,4	± 3,9	± 6,6	± 6,6	± 5,4
Eficiencia diagnóstica (%)	90,0	89,0	89,0	82,0	98,0	81,0	91,0
IC95%	± 9,1	± 9,5	± 9,5	± 11,6	± 4,2	± 7,7	± 5,6

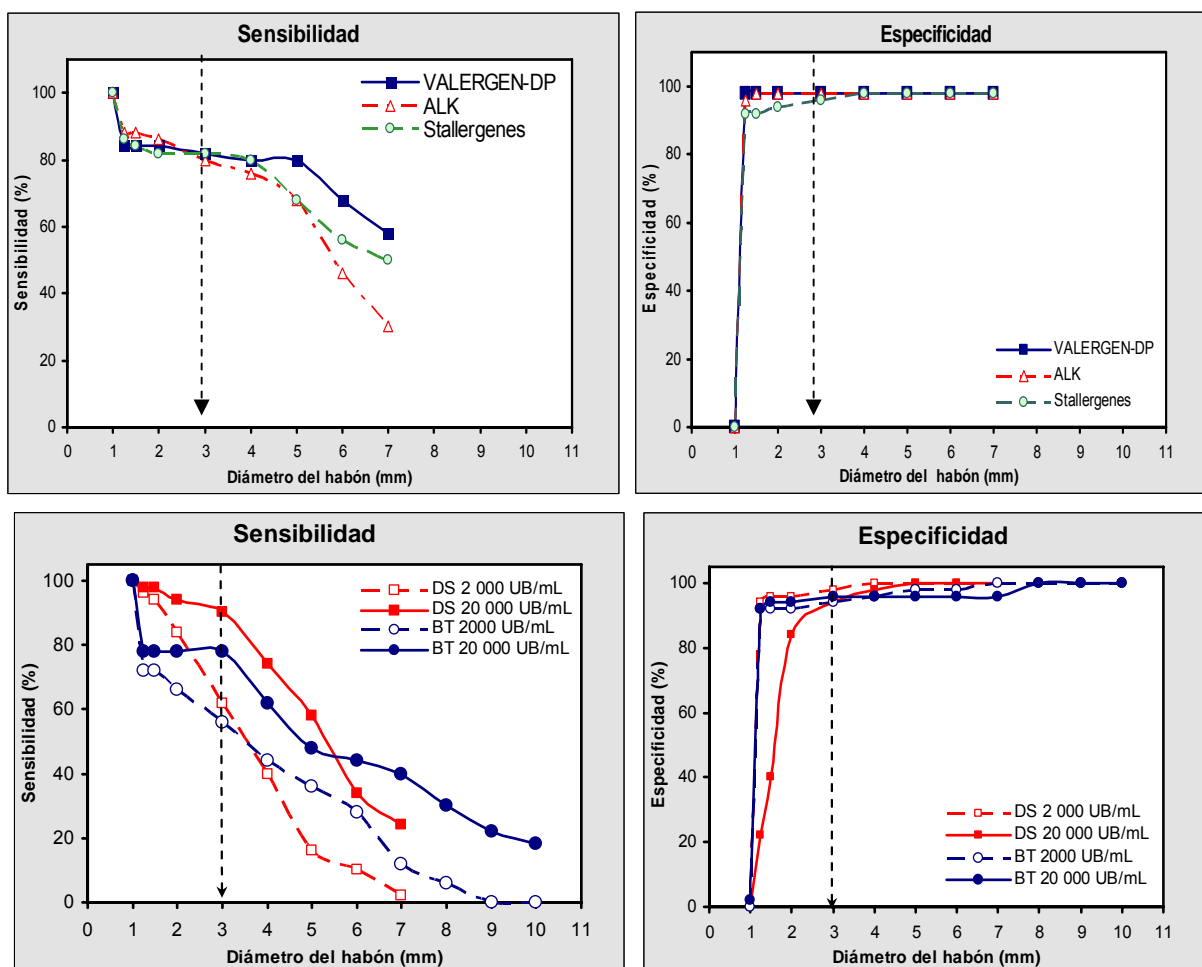


Fig. 31. Dependencia de la sensibilidad y la especificidad del valor de corte de la prueba de punción cutánea (diámetro del habón) en adultos. Arriba: ensayo comparativo de VALERGEN-DP con otros dos productos comerciales. Abajo: ensayos con dos dosis de VALERGEN-DS y VALERGEN-BT, respectivamente. La flecha indica el valor de corte establecido como óptimo (3 mm).

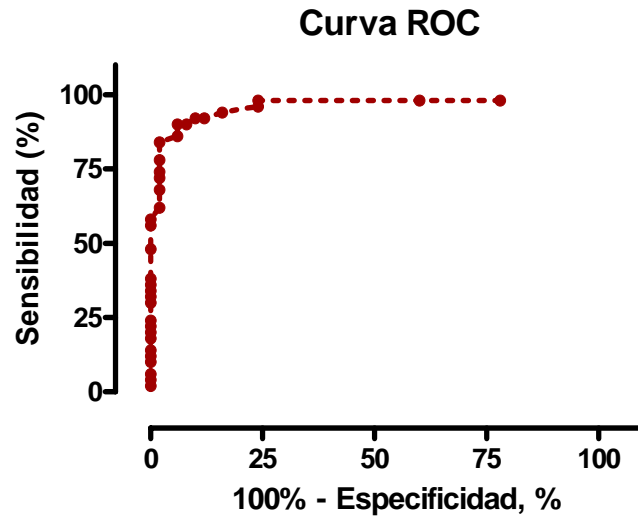


Fig. 32. Curva ROC (especificidad vs. sensibilidad) de VALERGEN-DS a 20 000 UB/mL en adultos.

Tabla 29. Análisis estadístico de las curvas ROC para cada producto y dosis empleada. P: probabilidad de que el área bajo la curva sea menor o igual que 0,5.

Ensayo	Producto	Dosis (UB/mL)	Área bajo la curva	IC95%	P
DP	VALERGEN-DP	20 000	0,906	0,839 - 0,973	< 0,0001
	ALK (DP)	10 000	0,920	0,855 - 0,985	< 0,0001
	Stallergenes (DP)		0,905	0,837 - 0,974	< 0,0001
DS	VALERGEN-DS	20 000	0,961	0,920 - 1,001	< 0,0001
		2 000	0,966	0,928 - 1,004	< 0,0001
BT	VALERGEN-BT	20 000	0,867	0,791 - 0,943	< 0,0001
		2 000	0,827	0,742 - 0,912	< 0,0001

En la Tabla 30 se muestran los resultados de los parámetros de eficacia diagnóstica. La última columna se refiere al diagnóstico combinado, es decir, en ese caso la prueba se consideró positiva cuando era positiva a alguno de los tres alérgenos: 48 de los 50 pacientes alérgicos resultaron positivos según el diagnóstico combinado. La especificidad alcanzó valores altos (> 90%) y similares entre ambas dosis. Sin embargo, la sensibilidad fue significativamente superior para la dosis de 20 000 UB/mL con relación a la de 2000 UB/mL en todos los productos (prueba  $\chi^2$ ,  $p= 0,04$  para BT y  $p< 0,01$  para DS y DP), alcanzando valores de 92 y 86 %, para DP y DS, respectivamente, los cuales se consideran satisfactorios. De ese modo, la dosis de mejores resultados fue la de 20 000 UB/mL, con alta sensibilidad, sin ceder apreciablemente en especificidad, lo cual se reflejó en mayores valores de eficiencia diagnóstica. La aparente baja sensibilidad de BT (solamente 52 %), puede estar causada por que los síntomas alérgicos en los pacientes “falsos negativos” estarían asociados, fundamentalmente, a las otras dos especies de ácaros. En efecto, si se analiza el diagnóstico combinado de los tres productos, entonces, se obtiene un valor satisfactorio de sensibilidad (96%) para la dosis de 20 000 UB/mL y una eficiencia diagnóstica (92 %) mayor que para cada producto por separado.

La dependencia de la sensibilidad y la especificidad del límite de corte de la prueba cutánea fue muy similar a lo observado para el estudio en adultos, evidenciando la ventaja del límite de 3 mm cuando se emplea la dosis de 20 000 UB/mL (Fig. 34). El análisis de la capacidad diagnóstica a través del área bajo la curva ROC (Tabla 31) mostró valores superiores para las dosis de 20 000 UB/mL. Todos los valores fueron significativamente diferentes de 0,5.

#### **IV.6.3 Seguridad del diagnóstico**

En el transcurso de los estudios, tanto en adultos como en niños, no se produjeron eventos adversos.

#### **IV.6.4 Discusión de los resultados de los ensayos clínicos de diagnóstico**

##### **Sistema de estandarización y eficacia del diagnóstico**

La estandarización de los extractos alérgicos VALERGEN y de otros productos análogos se basa en su actividad alérgica, tomando como base el área de la reacción cutánea que inducen en pacientes alérgicos. De esa forma, la implementación de un sistema de estandarización debe conducir a la elevación de la consistencia de los resultados de la prueba cutánea, e idealmente, permitir la comparabilidad de diferentes productos en cuanto a eficacia

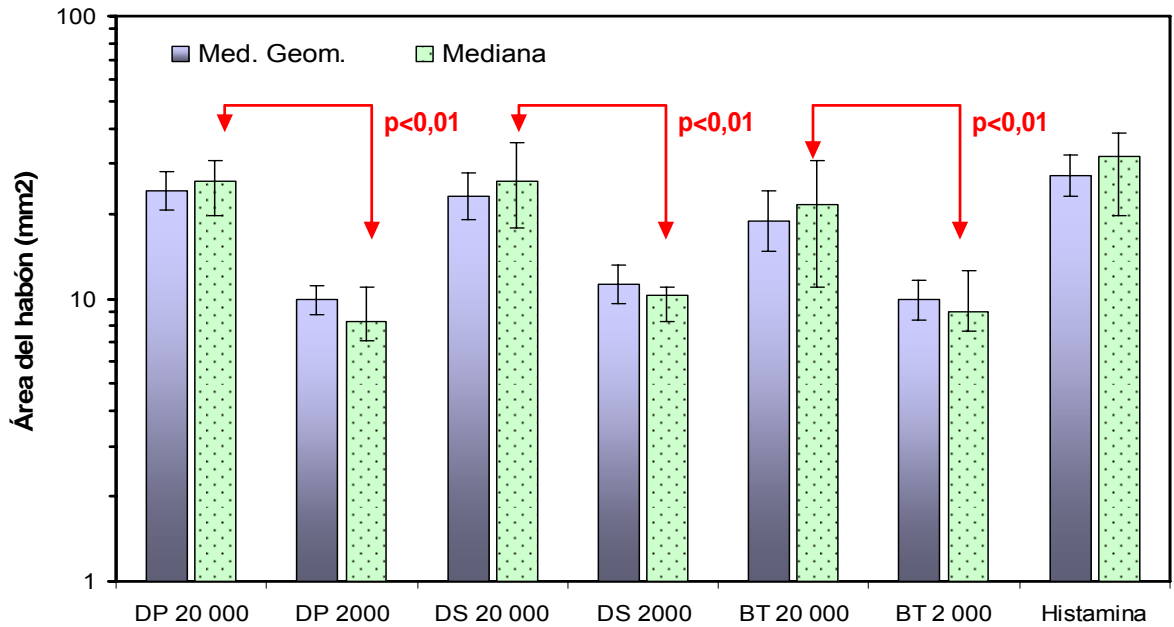


Fig. 33. Mediana y media geométrica del área del habón en los niños alérgicos positivos, para las diferentes dosis y productos investigados. Las barras verticales muestran el IC95%. Se indica la significación estadística de acuerdo al ANOVA con prueba complementaria de Tukey.

Tabla 30. Resultados de las variables de eficacia del diagnóstico en niños.

	DP		DS		BT		Diagnóstico combinado	
	20 000 UB/mL	2 000 UB/mL	20 000 UB/mL	2 000 UB/mL	20 000 UB/mL	2 000 UB/mL	20 000 UB/mL	2 000 UB/mL
Especificidad (%)	90	94	92	92	94	96	88	90
IC95%	±8,3	±6,6	±7,5	±7,5	±6,6	±5,4	±9	±8,3
Sensibilidad (%)	92	58	86	54	52	32	96	70
IC95%	±7,5	±13,7	±9,6	±13,8	±13,8	±12,9	±5,4	±12,7
Eficiencia diagnóstica (%)	91	76	89	73	73	64	92	80
IC95%	±8,6	±12,9	±9,5	±13,4	±13,4	±14,5	±8,2	±12,1

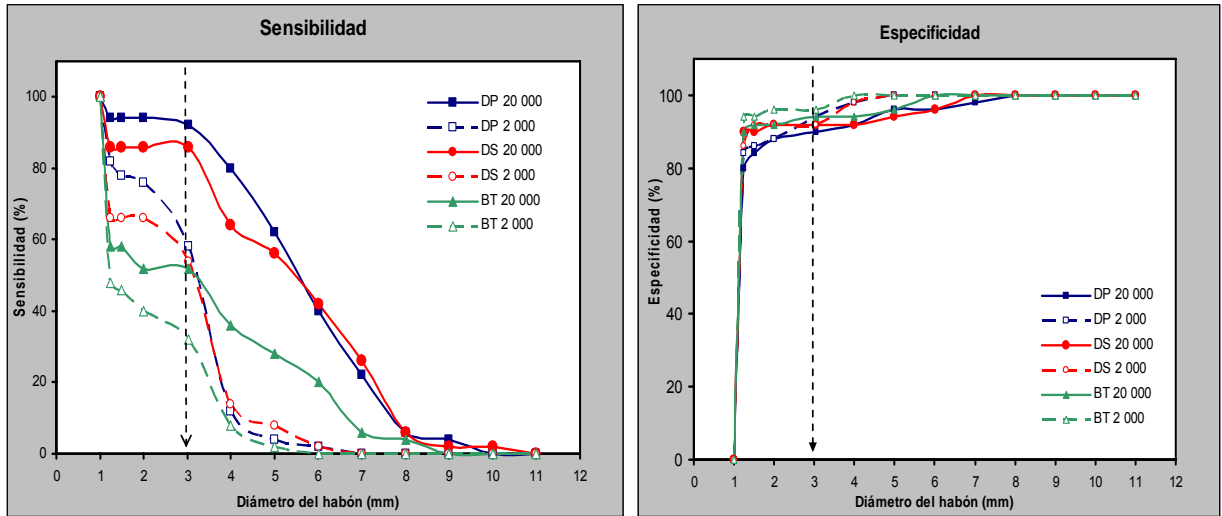


Fig. 34. Dependencia de la sensibilidad y la especificidad del valor de corte de la prueba de punción cutánea (diámetro del habón) en niños. La flecha indica el valor de corte óptimo (3 mm).

Tabla 31. Análisis estadístico de las curvas ROC para cada producto y dosis empleada, en niños. P: probabilidad de que el área bajo la curva sea menor o igual que 0,5.

Producto	Dosis (UB/mL)	Área bajo la curva	IC95%	P
VALERGEN-DP	20 000	0,925	0,865 - 0,984	< 0,0001
	2 000	0,852	0,771 - 0,933	< 0,0001
VALERGEN-DS	20 000	0,891	0,823 - 0,960	< 0,0001
	2 000	0,771	0,675 - 0,867	< 0,0001
VALERGEN-BT	20 000	0,75	0,652 - 0,848	< 0,0001
	2 000	0,711	0,608 - 0,814	0,0003

diagnóstica. En el primer ensayo realizado se comparó el producto en estudio VALERGEN-DP con otros dos productos comerciales del ácaro DP. Uno de ellos (ALK) emplea el mismo concepto de estandarización implementado en el presente trabajo, basado en las UB, según la definición de las Guías Nórdicas<sup>127</sup> con referencia a un patrón de histamina HCl 10 mg/mL. De acuerdo a los resultados obtenidos, VALERGEN-DP a 20 000 UB/mL provocó habones algo mayores en los pacientes alérgicos adultos que los otros dos productos comerciales, lo cual indica una mayor potencia alergénica. Si empleamos la expresión aproximada de Dreborg<sup>196</sup> para estimar la potencia biológica de los extractos alergénicos mediante punción cutánea:

$$P = (\text{Area}_{\text{alergeno}}/\text{Area}_{\text{histamina}})^{2,5} \cdot 10\ 000\ \text{UB/mL}$$

a partir de nuestros resultados, obtendríamos que los productos de ALK y Stallergenes tendrían una potencia relativa con respecto al nuestro, igual a 40 y 61,3 %, respectivamente. En el caso de ALK, ésta se corresponde aproximadamente a su potencia nominal, o sea, 50 % (10 000 UB/mL), de modo que las UB implementadas en BIOCEN serían compatibles con las de ALK, lo cual evidencia la utilidad de dicho sistema de estandarización, a pesar de las posibles diferencias poblacionales y de selección de pacientes que sirven de base para el establecimiento de las RI de cada productor.<sup>166,167</sup> En contraste, en el caso de Stallergenes, no es posible realizar una comparación directa ya que el producto está estandarizado usando otro tipo de unidades de actividad (IR, Index of Reactivity). No obstante, a partir de un informe reciente del contenido de Alergenos Mayores en los productos de Stallergenes,<sup>128</sup> se conoce que 100 IR/mL contiene aproximadamente 20 µg/mL de Der p 1. Por otra parte, VALERGEN-DP a 20 000 UB/mL contiene 40 µg/mL de Der p 1. De esa forma, el producto de Stallergenes contiene la mitad de Der p 1, en comparación al nuestro y congruentemente una potencia alergénica estimada del 61%.

A pesar de las diferencias en tamaño del habón, los valores de sensibilidad y especificidad no alcanzaron a ser significativamente diferentes entre los tres productos de DP. Una ventaja del sistema de estandarización basado en la respuesta cutánea, es que permite la comparación transversal no solamente entre diferentes fabricantes, sino también entre diferentes alergenos con la misma potencia nominal. En nuestro caso, los productos de los diferentes ácaros DP, DS y BT mostraron similares valores de sensibilidad y especificidad en los pacientes adultos, confirmando de esa forma el valor intrínseco de la estandarización y su utilidad en la práctica clínica. En el estudio en niños el tamaño de los habones fue algo menor que el registrado en



adultos, particularmente para BT, lo cual pudiera ser explicado por la progresión de la enfermedad alérgica con la edad, asociada al incremento de los niveles de IgE y de la reactividad cutánea. No obstante, la diferencia es apenas perceptible a simple vista y no conlleva consecuencias clínicas sustanciales (Fig. 35).

Otros autores han descrito valores de sensibilidad de la prueba de punción entre 81 y 90%<sup>198,197</sup> empleando extractos de ácaros con referencia a la historia clínica o pruebas de provocación como “patrón oro”, valores no diferentes a lo observado aquí (Por ej. 90% para DS, 82% para DP, 78% para BT, en adultos), si se tiene en cuenta los IC<sub>95%</sub>. Por otra parte, nuestros valores de especificidad resultaron altos (94-98% en adultos, 90-96% en niños) y similares o superiores a los descritos por otros autores en otras poblaciones.<sup>198</sup> Estudios posteriores al actual, realizados en adultos y niños cubanos empleando los productos VALERGEN a 20 000 UB/mL, y siguiendo la misma metodología, han referido valores de sensibilidad y especificidad muy cercanos a los nuestros.<sup>199-202</sup>

#### **Factores que afectan la sensibilidad y especificidad**

Es conocido que la sensibilidad de la prueba cutánea depende marcadamente de la potencia del extracto alérgico.<sup>85,203</sup> De hecho, el incremento de la concentración del producto de 2000 a 20 000 UB/mL, tanto en los estudios en adultos como en niños, conllevó a un incremento significativo del tamaño de la reacción y de la sensibilidad, sin afectar sustancialmente la especificidad. De esa forma, la dosis de 20 000 UB/mL fue la de mejores resultados en el balance sensibilidad/especificidad, y por consiguiente, de eficiencia diagnóstica. El Análisis ROC confirmó esta conclusión. Aunque no existe un consenso total sobre las dosis óptimas a emplearse en la prueba cutánea, debido precisamente, a la falta de un sistema internacional de estandarización, la dosis de 20 000 UB/mL se encuentra en el rango de lo recomendado por otros autores (entre 10 000 y 50 000 BU/mL, en los casos en que se ha empleado un sistema de estandarización compatible con el nuestro).<sup>156</sup>

Para explorar si una concentración aún mayor mejoraría la sensibilidad, se realizaron pruebas adicionales en los pacientes adultos considerados como “falsos negativos” a DP, con VALERGEN-DP a 100 000 UB/mL. Los resultados fueron nuevamente negativos. De manera, que la explicación de los eventuales “falsos negativos”, pudiera radicar en la poca precisión del método de referencia, o sea, del diagnóstico clínico basado en los síntomas asociados a la exposición al polvo casero, que sirve como definición de la enfermedad. Estos síntomas

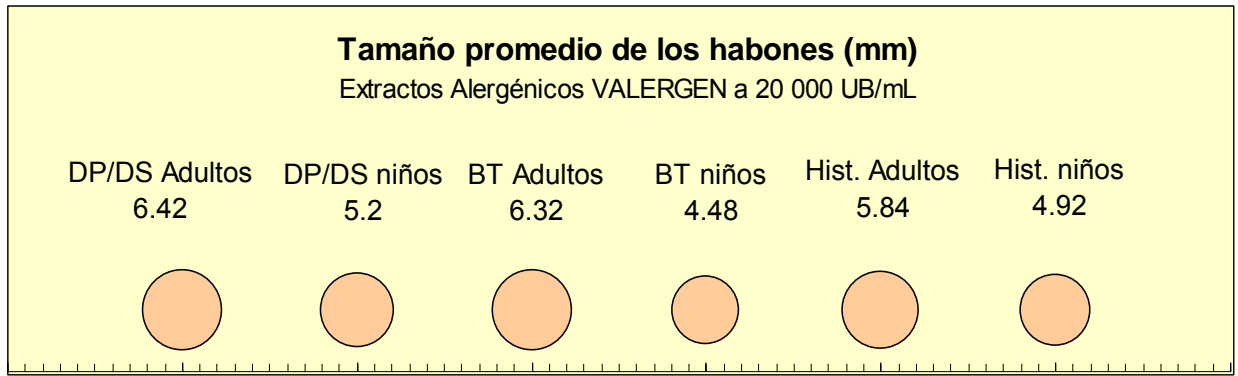


Fig. 35. Ilustración gráfica de la comparación de los habones entre niños y adultos. El diámetro de las circunferencias es proporcional al diámetro real del habón. Se muestran los resultados promediados entre DP y DS.

también pudieran ser provocados indistintamente por otros alérgenos que coexisten en el polvo, tales como ácaros de otras especies, animales domésticos, hongos y cucarachas. En climas templados, este criterio de diagnóstico pudiera ser más exacto, puesto que el crecimiento de los ácaros tiene un carácter estacional más marcado, a diferencia del clima tropical, donde los alérgenos de ácaros se mantienen relativamente constantes.<sup>204,205</sup>

En concordancia con esa conjetura, en el estudio en niños, donde se detectó una menor sensibilidad del diagnóstico a BT, todos los pacientes alérgicos negativos a BT resultaron positivos a alguno de los ácaros restantes; lo cual indica que los síntomas alérgicos probablemente estaban provocados por los otros ácaros. De esa forma, lo más certero sería tomar los valores de sensibilidad y especificidad del diagnóstico combinado del panel de los tres productos, como los parámetros que realmente reflejan la exactitud diagnóstica, particularmente en nuestra población infantil. De ese modo, los resultados de este estudio recomiendan el empleo de los tres productos simultáneamente en las pruebas cutáneas, lo cual ha sido también sugerido por otros autores para otros alérgenos inhalantes.<sup>205</sup>

En los niños, el tamaño de la reacción fue algo inferior para BT, indicando un menor grado de sensibilización a ese ácaro, lo cual coincide con la menor frecuencia de reacciones positivas al mismo. En ese sentido, los resultados contrastan con lo observado en adultos donde los tres ácaros mantienen similares frecuencias de resultados positivos, sugiriendo que la sensibilización alérgica a esa especie, progresa con la edad de forma más marcada. La correlación entre el tamaño de las reacciones fue mayor entre DS y DP y mucho menor entre esos dos ácaros y BT, sugiriendo un menor grado de reactividad cruzada entre los ácaros del género *Dermatophagoides* y *Blomia*, que el existente entre especies de *Dermatophagoides*. Esta observación concuerda con lo publicado en estudios de reactividad cruzada realizados por métodos *in-vitro* e *in-vivo*.<sup>78,206</sup>

La sensibilidad y especificidad del diagnóstico dependen también del límite de corte de la prueba de cutánea (diámetro del habón). Corrientemente, se emplea 3 mm como valor de corte "óptimo"<sup>85,86</sup> con independencia del alérgeno o la dosis empleada, atendiendo fundamentalmente a la precisión de los instrumentos de medición del habón. Los resultados obtenidos aquí, en cuanto a la dependencia de la sensibilidad/especificidad del límite de corte, confirman que para la dosis de 20 000 UB/mL, este valor de corte establecido a "priori", es también el óptimo desde el punto de vista de la eficacia del diagnóstico. El hecho de que el

límite de corte de 3 mm esté situado en la región de meseta de las curvas de sensibilidad y especificidad agrega robustez a la prueba. Otro factor que garantiza la consistencia de la prueba es el empleo de lancetas con puntas de 1 mm que limitan la profundidad de la punción. En particular, un trabajo posterior realizado con los productos VALERGEN a 20 000 UB/mL, encontró diferencias apreciables en cuanto a sensibilidad y especificidad en dependencia del empleo de diferentes tipos de lancetas.<sup>207</sup>

#### **Seguridad de los productos en la prueba cutánea**

La no ocurrencia de eventos adversos evidenció la seguridad de los productos, la cual está estrechamente relacionada con la dosis empleada y el sistema de estandarización basado en la reactividad cutánea. La frecuencia de eventos adversos durante la prueba de punción cutánea es sumamente baja, en el orden de 0,03% de los pacientes.<sup>112,208</sup> Es conocido que ésta es la prueba *in vivo* que ofrece un menor riesgo para el paciente.<sup>85,209</sup> No obstante, para evaluar con mayor precisión la frecuencia de eventos adversos se necesitaría una muestra poblacional mucho mayor, lo cual sería posible solamente en estudios post-comercialización.

#### **IV.6.5 Elementos de salida de los ensayos clínicos de diagnóstico**

En resumen, los ensayos clínicos para diagnóstico permitieron concluir que la prueba de punción cutánea empleando los extractos alergénicos estandarizados VALERGEN-DP, DS y BT, posee sensibilidad y especificidad satisfactorias. VALERGEN-DP fue similar a otros productos comerciales de referencia, en cuanto a especificidad y sensibilidad, alcanzando un 99% de coincidencia en el resultado del diagnóstico, con los mismos. La dosis de 20 000 UB/mL mostró mayor sensibilidad que la de 2 000 UB/mL y por lo tanto es la indicada para realizar la prueba, empleando 3 mm como límite de corte óptimo. Es recomendable el empleo de los tres productos simultáneamente en forma de panel, particularmente en los niños. De esa forma, se demostró la eficacia y seguridad de los extractos alergénicos VALERGEN para su aplicación en la prueba cutánea en nuestra población.

#### **IV.7 ENSAYOS CLÍNICOS COMO VACUNAS TERAPÉUTICAS**

Los ensayos clínicos de inmunoterapia (IT), tienen el propósito de demostrar la eficacia y seguridad de las vacunas alergénicas. Se conoce que la IT con alérgenos de ácaros es efectiva en el tratamiento de asma alérgica, no obstante, los estudios clínicos publicados se

han realizado solamente con ácaros de las especies DP y DF. Los ensayos clínicos descritos en este trabajo serían los primeros estudios controlados, realizados con vacunas estandarizadas de las especies tropicales DS y BT. Como se trata de productos biológicos, no se reconocen genéricos, es decir cada fabricante está obligado a demostrar la eficacia y seguridad de su producto para obtener el Registro. La evaluación clínica como vacunas terapéuticas constituye la culminación del proceso de desarrollo de los productos y se basa en los resultados alcanzados en las etapas previas que forman parte de los requerimientos para la autorización de ensayos clínicos por la autoridad nacional regulatoria.<sup>176</sup> Particularmente, la prueba cutánea estandarizada es empleada aquí para la selección correcta de los pacientes y como método de evaluación de la eficacia de la IT.

Se condujeron, en total, seis ensayos clínicos, con un diseño a doble ciegas, controlado por placebo, dos para cada producto. Cada uno con el objetivo de evaluar el tratamiento del asma leve o moderada en pacientes sensibilizados preponderantemente a los alérgenos respectivos. Para el análisis conjunto de los resultados de los seis ensayos clínicos se realizó un meta-análisis. Esta herramienta permite integrar la información brindada por los estudios individuales y elevar la precisión de las conclusiones, al incrementar el poder estadístico abarcando un mayor número de pacientes. También el meta-análisis posibilita evaluar la consistencia de los resultados obtenidos en diferentes condiciones experimentales; en nuestro caso particular, con diferentes productos y lotes, y en dos hospitales independientes. Como premisas básicas que permiten realizar confiablemente un meta-análisis, se tiene el uso de protocolos idénticos, la inclusión de pacientes con las mismas características demográficas y manifestación alérgica de igual severidad, y el empleo del mismo esquema de dosis. Las vacunas tienen similitud en su composición y reactividad cruzada, respondiendo al concepto regulatorio de alérgenos homólogos,<sup>133</sup> que permite conjugar datos clínicos de diferentes productos alérgicos agrupados en familias.

#### **IV.7.1 Cumplimiento del tratamiento**

Los grupos Activo y Placebo en cada ensayo resultaron comparables en cuanto a las variables demográficas sexo y edad, aún cuando el diseño no fue estratificado con respecto a las mismas. Las diferencias no resultaron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). En el conjunto de los seis ensayos ( $n = 235$ ), el 60 % de los pacientes fueron mujeres (53 % en el grupo Activo y 67% en el Placebo). La edad promedio fue de 32,3 años con valores muy

similares entre Activo y Placebo (Tabla 32). Tanto para el sexo como la edad, la heterogeneidad entre estudios no fue significativa (Prueba  $\chi^2$ ,  $p > 0,05$ ). Tampoco en lo relativo a la clasificación inicial de la severidad del asma, ni a los valores iniciales de las variables de eficacia, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre Activo y Placebo, en cada ensayo por separado. El resultado general de los seis ensayos (Tabla 32) confirmó que los grupos fueron similares en ese sentido. En total, el 59 % fueron clasificados al inicio como asmáticos ligeros y el 41% como moderados. Tampoco, para esta variable, la heterogeneidad entre estudios fue significativa (Prueba  $\chi^2$ ,  $p > 0,05$ ).

Todos los pacientes incluidos concluyeron el estudio. Se administraron un total de 4611 inyecciones, de un máximo previsto de 5170, para un 89,2 % de cumplimiento del tratamiento, lo cual se considera satisfactorio, teniendo en cuenta su duración. Las administraciones suspendidas se debieron principalmente a inasistencias del paciente a la consulta o a que el estado clínico del paciente no permitía la inyección, de acuerdo a lo previsto en el protocolo. Todos los pacientes alcanzaron la dosis máxima prevista de 6000 UB. No hubo diferencias de consideración entre Activo (91%) y Placebo (87,3%) en lo que respecta al cumplimiento del tratamiento (Tabla 33). El mayor valor de cumplimiento en un ensayo individual fue de 94%, mientras que el menor fue de 85%.

#### **IV.7.2 Resultados de las variables de eficacia analizados mediante meta-análisis**

##### **Reducción de Síntomas y Medicación**

La variable primaria principal para evaluar la eficacia fue la Puntuación por Síntomas y Medicación. La misma decreció apreciablemente en los grupos Activo, mientras se mantenía aproximadamente constante en los grupos Placebo. Las diferencias fueron ampliamente significativas con respecto al Placebo en todos los ensayos (prueba U de Mann-Witney,  $p < 0,001$ ) y también con respecto a los valores iniciales dentro de cada Grupo Activo (prueba Wilcoxon,  $p < 0,001$ ). El meta-análisis confirmó los resultados individuales (Fig. 36). El efecto promedio (calculado como la diferencia entre Activo y Placebo, expresada en términos porcentuales con respecto al Placebo) en cuanto a reducción de síntomas, fue del 56,4% (IC95%: 47,7-65,0). La reducción de la medicación fue del 58,4% (IC95%: 48,1-68,6), mientras que el efecto de ambas variables sumadas: Síntomas y Medicación, fue incluso algo mayor 60,3% (IC95%: 51,3-69,3). Esto significa, que al final del estudio, los síntomas y la medicación en el Grupo Activo constitúan solamente el 39,7% del valor en el grupo Placebo. El efecto fue

Tabla 32. Distribución de los pacientes de acuerdo a su edad y clasificación inicial del asma. Promedio de los seis ensayos.

	Total (n= 225)	Grupo Activo (n= 118)	Grupo Placebo (n= 117)
Edad promedio (años)	32,3	32,8	31,7
Edad mínima	19	19	19
Edad máxima	50	50	49
Asma ligera (%)	59	55	62
Asma moderada (%)	41	45	38

Tabla 33. Cumplimiento del tratamiento.

	Máx. previsto	Activo	Placebo*	Total
Inyecciones administradas	22	20,0	19,2	19,6
(% del máx. previsto)	-	91,0%	87,3%	89,2%
Dosis acumulativa promedio (UB)	70 374	58235	52995	55904
(% del máx. previsto)	-	82,75%	75,30%	79,44%

(\*) Nota: Las dosis en los grupos que recibieron Placebo son supuestas.

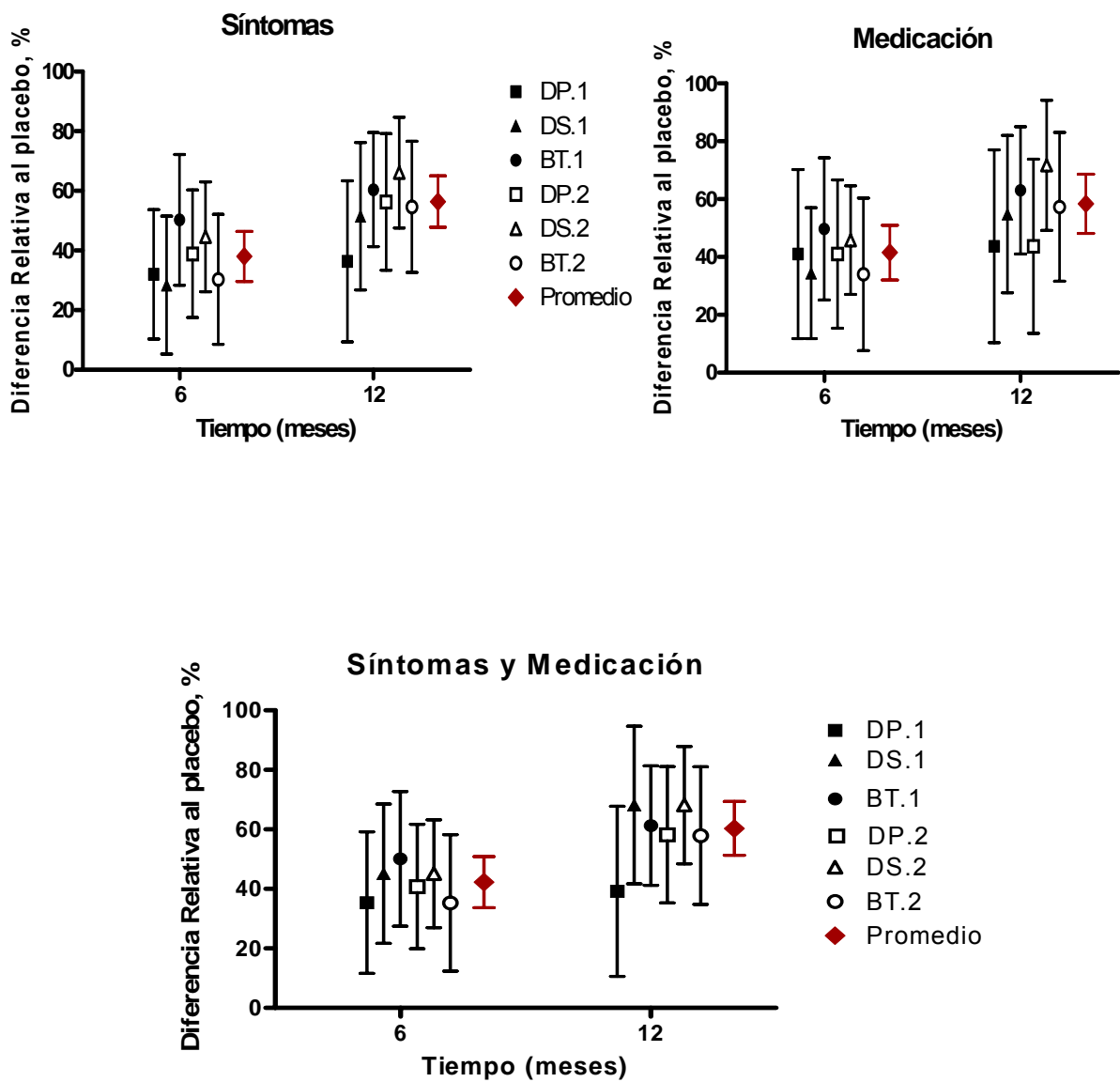


Fig. 36. Efecto de cada ensayo y promedio ponderado de los seis ensayos, en cuanto a reducción de Síntomas y Medicación, calculado como Diferencia de Promedios entre Activo y Placebo, relativa al Placebo. Las barras indican el IC95%. DP.1, DS.1 y BT.1 indican los tres ensayos clínicos de la primera serie con los productos respectivos; DP.2, DS.2 y BT.2 son los correspondientes a la segunda serie.



consistente entre los diferentes ensayos (Fig. 36, prueba de heterogeneidad,  $\chi^2$ ,  $p > 0,05$ ) y significativo, tanto a los 6 como a los 12 meses, y claramente superior en la última fecha.

### **Reducción de la Reactividad Cutánea**

La reactividad cutánea específica al alérgeno disminuyó de forma altamente significativa ( $p < 0,001$ ), tanto en comparación con el inicio del tratamiento en los grupos Activo, como con respecto al Placebo, en todos los ensayos. El meta-análisis de los seis ensayos, determinó la magnitud del efecto combinado, calculado como la diferencia de promedios entre Placebo y Activo, empleando el parámetro Log(Ch10). El valor final fue de 2,87 (IC95%: 2,51-3,16). Como el Ch10 es proporcional a la concentración de alérgeno empleada en la prueba cutánea, se puede calcular que ese valor equivale a que se necesitaría 740 (IC95%: 382-1454) veces más contenido de alérgeno para producir una reacción cutánea del mismo tamaño que la obtenida en el grupo control.

El análisis de la heterogeneidad entre los ensayos arrojó un resultado significativo (prueba  $\chi^2$ ,  $p = 0,003$ ). Una inspección de los resultados graficados (Fig. 37) permite observar que el efecto de los últimos dos estudios (DS.2 y BT.2) fue algo mayor que el resto. Mediante el análisis más detenido de los datos iniciales se identificó en estos estudios una mayor negativización de la prueba y particularmente, ausencia de habones en muchos de los pacientes de los grupos Activos al final del tratamiento. Este fenómeno introduce determinado sesgo en los cálculos, puesto que a los habones inexistentes se les asigna arbitrariamente un valor de  $d = 1$  mm. Repitiendo el meta-análisis sin tener en cuenta el último ensayo (BT.2, el de mayor efecto) se eliminó la significación estadística de la prueba de heterogeneidad ( $p > 0,05$ ). Entonces, el resultado del promedio de los primeros cinco ensayos sería: Log(Ch10) = 2,54 (IC: 2,18-2,90), equivalente a 348 veces (IC: 152-798) más alérgeno; lo que igualmente, es un valor de efecto muy elevado.

Es notorio que la IT con DS indujo no sólo la reducción de la sensibilidad a DS sino también a DP y viceversa, lo cual era de esperarse, debido al alto grado de homología entre ambas especies.<sup>79</sup> Este resultado fue significativo en los cuatro ensayos que incluyeron DS o DP a los 12 meses, en comparación con los valores basales, pero sólo en dos de los cuatro, en comparación con el Placebo. Sin embargo, el efecto combinado mediante el meta-análisis ( $n = 4$ ) resultó significativo y en una magnitud no mucho menor que el efecto específico hacia el mismo alérgeno de la vacuna: 1,80 (IC: 1,39-2,21). En contraste, el efecto combinado sobre

la reactividad hacia BT (n = 4), cuando se administró DP o DS, no fue significativo (Fig. 38). Asimismo, el efecto combinado de los dos ensayos con BT, tampoco fue significativo en la reducción de la reactividad hacia DP o DS, en concordancia con las diferencias antigénicas entre los ácaros de los géneros *Blomia* y *Dermatophagoides*.<sup>38</sup>

### **Resultados de la evaluación de la función respiratoria**

La función respiratoria se evaluó a través del Flujo Espiratorio Pico (FPE) y su variabilidad (VFPE), en la primera serie de ensayos (DP.1, DS.1 y BT.1). No se observaron cambios perceptibles en cuanto al FPE, aunque sí, una disminución ligera de VFPE, que fue significativa ( $p < 0,05$ ) en dos de los tres ensayos con respecto al Placebo y en los tres con respecto a los niveles pretratamiento. El meta-análisis en esta ocasión se limitó a VFPE (Fig. 39). El efecto, calculado como la diferencia de promedios entre Activo y Placebo, relativa al Placebo, resultó significativo solamente en uno de los tres ensayos (BT.1); sin embargo, el valor combinado de los tres, que permite elevar el poder estadístico, indicó un resultado significativo, consistente en una reducción de VFPE en 12,2% (IC: 4,1-20,2).

Los cambios observados en los valores centrales de las variables FPE y VFPE, aunque discretos, sin embargo, indujeron algunos cambios en la Clasificación de la Función Respiratoria de los pacientes. En general, al término del tratamiento se apreció una tendencia hacia el incremento de los pacientes clasificados como normales o con obstrucción ligera a expensas de la disminución de los moderados, aunque sin alcanzar significación estadística en todos los estudios. Sin embargo, el efecto combinado de los tres estudios resultó significativo: OR= 4,8 (IC:1,7-14;  $p < 0,05$ ; Fig. 40).

### **Resultados de las variables inmunológicas**

Los niveles séricos de IgE total, así como de IgE e IgG4 alergeno-específica, fueron determinados en los tres ensayos clínicos de la segunda serie (DP.2, DS.2 y BT.2). Los resultados indicaron, en primer lugar, un incremento de los anticuerpos IgG4 que resultó significativo ( $p < 0,05$ ) a los 12 meses en todos los ensayos, tanto en comparación con el Placebo, como con respecto al inicio. Asimismo, la IgE específica se redujo significativamente en los tres ensayos, aunque en el caso de DS.2, solamente con respecto a los valores iniciales dentro del grupo Activo. También, en cuanto a la IgE total, se reportó una reducción significativa en todos los ensayos, aunque de una magnitud menor que la específica.

Por último, la variable compuesta IgEesp/IgG4, resultó la de mayor modificación alcanzando

### Reactividad Cutánea

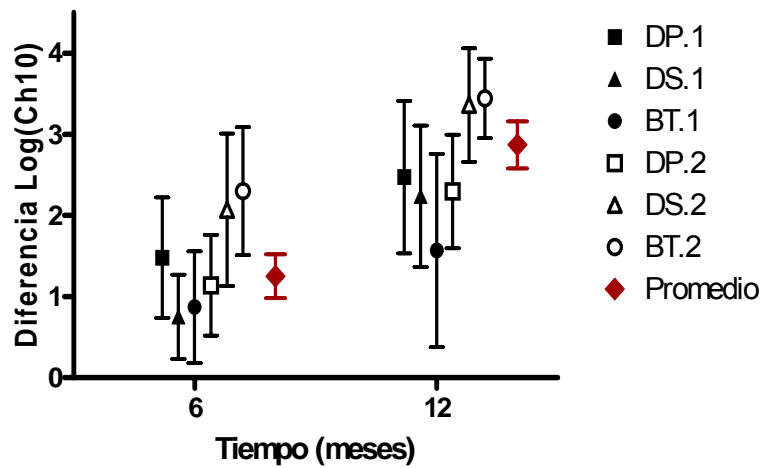


Fig. 37. Efecto de cada ensayo y promedio ponderado de los seis ensayos, en cuanto a reducción de Reactividad Cutánea [ $\text{Log}(\text{Ch}_{10})$ ], calculado como Diferencia de Promedios entre Activo y Placebo. Las barras indican el IC95%.

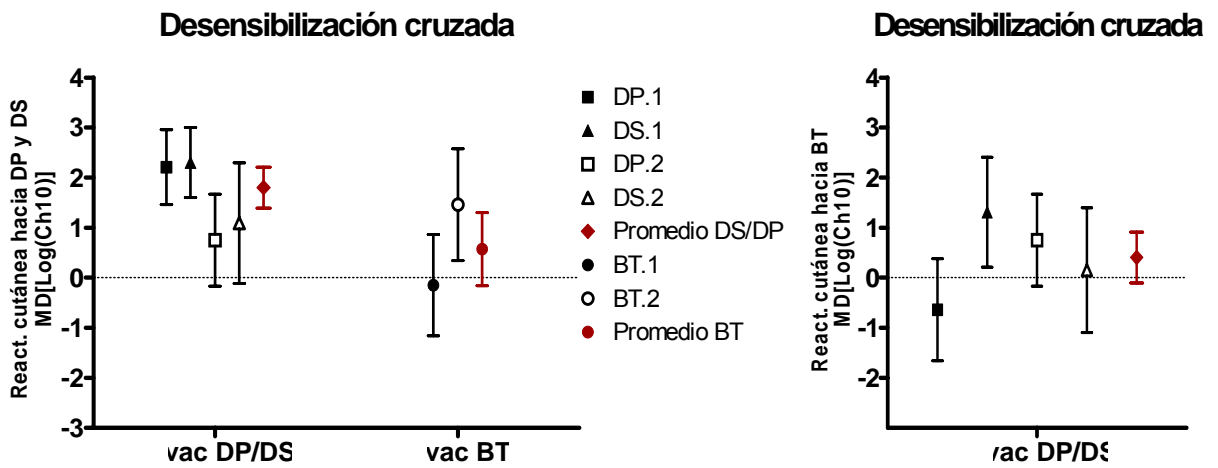


Fig. 38. Efecto cruzado en cuanto a reducción de la reactividad cutánea, calculado como Diferencia de Promedios entre Activo y Placebo:  $\text{MD}[\text{Log}(\text{Ch}_{10})]$ . Izquierda: efecto sobre la reactividad hacia DP cuando se emplea la vacuna DS o viceversa ( $n=4$ ), y efecto sobre ambos cuando se emplea la vacuna BT ( $n=2$ , se muestra el promedio entre la reactividad a DP y DS en cada ensayo). Derecha: Efecto sobre la reactividad hacia BT cuando se emplean las vacunas DS o DP ( $n=4$ ). Las barras indican el IC95%.

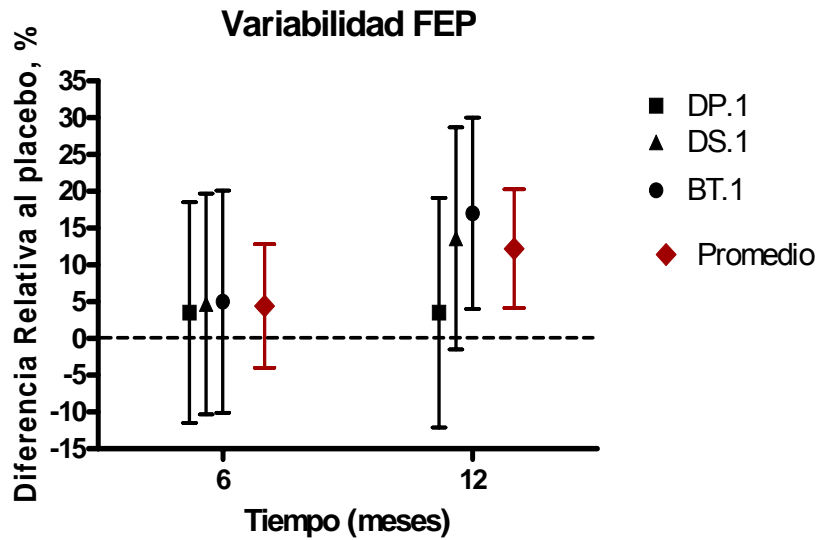


Fig. 39. Efecto de cada ensayo y promedio ponderado de los tres ensayos de la primera serie, en cuanto a reducción de la Variabilidad del Flujo Pico Espiratorio (VFPE) calculado como Diferencia de Promedios entre Activo y Placebo, relativa al Placebo. Las barras indican el IC95%.

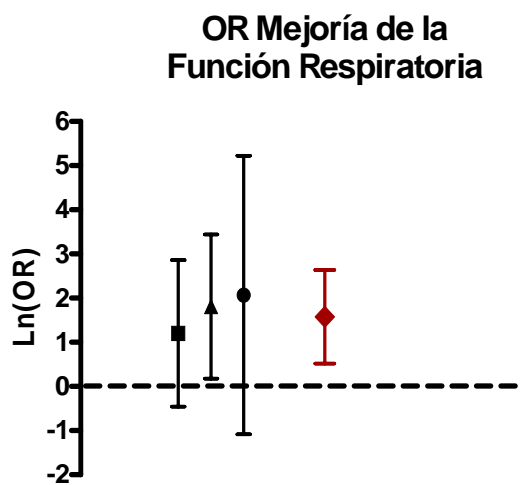


Fig. 40. Razón de Tasas (OR) para cada ensayo y promedio ponderado de los tres ensayos de la primera serie, en cuanto a mejoría de la Clasificación de la Función Respiratoria. Las barras indican el IC95%.

altos niveles de significación estadística ( $p < 0,001$ ), tanto en la comparación entre Placebo y Activo como con respecto al inicio del tratamiento, en cada ensayo por separado. Esta variable combina ambos efectos: la reducción de IgE específica y el incremento de IgG4. Los resultados del meta-análisis de los datos a 12 meses (Fig. 41) confirmaron que la magnitud del efecto fue mayor para el cociente IgEesp/IgG4, seguido del efecto sobre la IgE específica. El efecto fue consistente entre los diferentes productos (prueba de heterogeneidad  $\chi^2$  no significativa,  $p > 0,05$ ) para todas las variables y especialmente, para el cociente IgEesp/IgG4. Seleccionando un umbral del 20% de reducción de los valores iniciales pre-tratamiento, se calculó que el 83 % de los pacientes mostró reducción del cociente IgEesp/IgG4.

De especial interés, para la comprensión de los mecanismos de acción de la IT, es la cinética de los niveles de anticuerpos específicos. La Fig. 42 ilustra los resultados combinados mediante meta-análisis en cuanto a IgG4 e IgE. Aunque la magnitud del cambio de la IgE específica es mayor, el incremento de la IgG4 alcanza a ser significativo ya a los 6 meses, mientras que la reducción de la IgE solo lo es a los 12, lo cual sugiere que los cambios de la IgG4 anteceden a los de la IgE.

### **Criterio General de Mejoría**

El Criterio General de Mejoría (CGM) se empleó para evaluar la eficacia del tratamiento en cada paciente, individualmente. Es una variable categórica, dependiente en primer plano, de la variable primaria Síntomas-Medicación; y en segundo plano de la Reactividad Cutánea y la Función Respiratoria (en los ensayos donde se determinó la misma). Compilando los seis ensayos, el 76% de los pacientes mejoró bajo tratamiento activo, mientras que solamente 9,4% lo hacía con el Placebo (Fig. 43). Por otra parte, solo el 5,9% de los pacientes empeoraron en el grupo Activo, mientras el 64,1% lo hacía en el grupo Placebo.

La variable CGM, analizada como variable categórica, resultó ser estadísticamente mayor ( $p < 0,001$ ) en el grupo Activo con respecto al Placebo en ambos cortes evaluativos, e incluso significativamente mayor en el grupo Activo a los 12 meses con respecto a los 6 meses, en cada uno de los ensayos por separado. La Razón de Tasas de mejoría vs. no mejoría (igual o peor), resultado del meta-análisis de los seis ensayos, arrojó un valor de OR= 22,3 (IC: 10,7-46,2) indicando una relación muy favorable de probabilidad de mejorar bajo tratamiento activo con respecto al placebo. Esta variable fue significativa en todos los ensayos a los 12 meses, y consistente entre los diferentes ensayos (prueba de heterogeneidad  $\chi^2$  no significativa,  $p > 0,05$ )

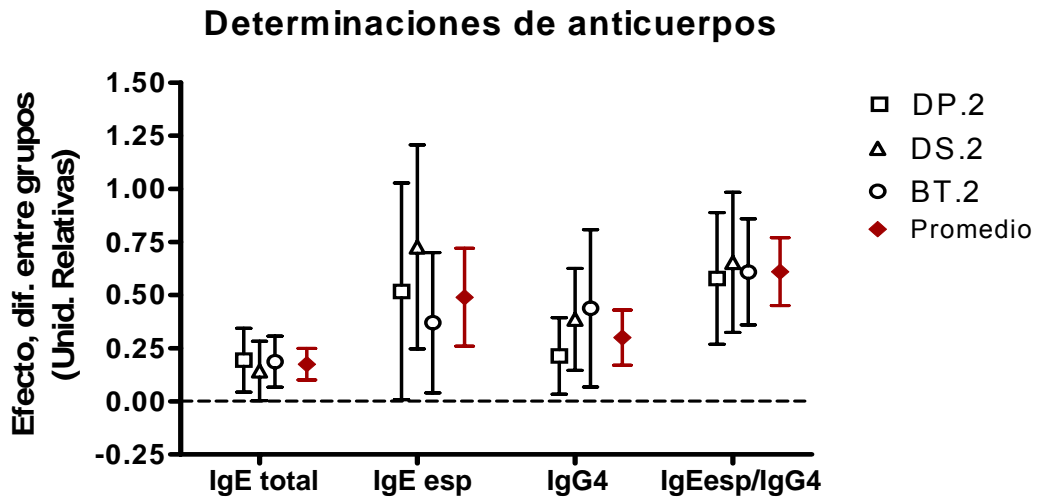


Fig. 41. Efecto de cada ensayo y promedio ponderado de los tres ensayos de la segunda serie, en cuanto a niveles de anticuerpos: IgE total, IgE e IgG4 alérgeno-específicos y cociente IgEsp/IgG4, calculado como Diferencia de Promedios entre Activo y Placebo. Valores correspondientes a 12 meses. Las barras indican el IC95%.

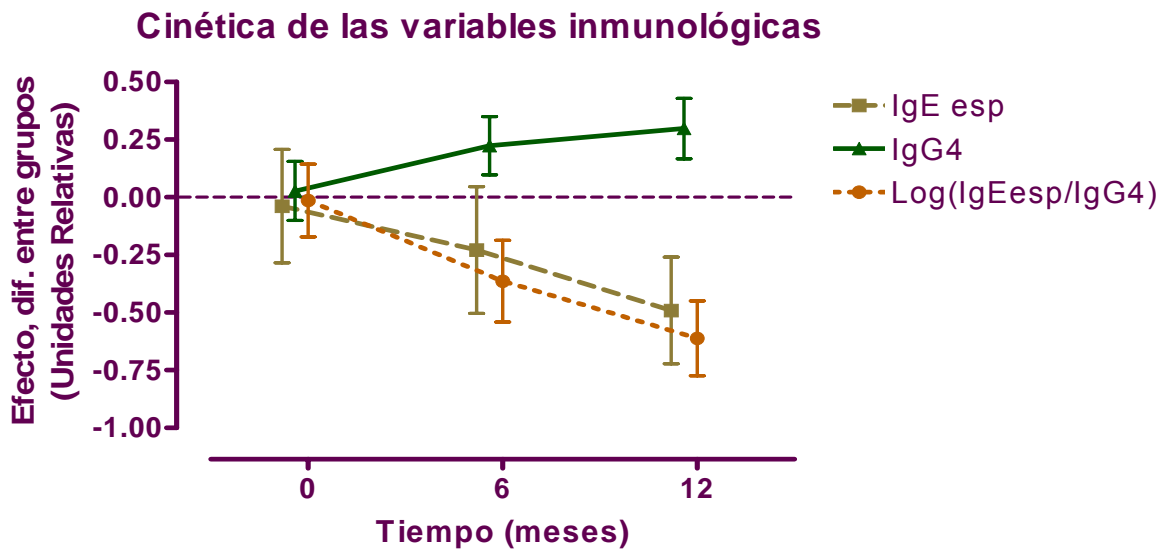


Fig. 42. Cinética de los niveles de anticuerpos IgG4 e IgE específicos, y del cociente IgEsp/IgG4. Efecto combinado de los tres ensayos de la segunda serie.

en ambos cortes evaluativos (Fig. 44).

#### **IV.7.3 Magnitud del efecto y correlación entre las variables de eficacia**

Con vistas a comparar la magnitud del efecto entre las diferentes variables estudiadas, empleamos el concepto de Diferencia Estandarizada de Promedios ("Standardised Mean Difference", SMD). La misma se calcula como la diferencia entre el promedio del grupo Activo y el del Placebo, dividido entre la desviación estándar combinada de ambos grupos.<sup>159</sup> O sea, este parámetro mide el efecto en unidades de desviación estándar de cada variable, por lo tanto, es independiente de la escala empleada. El mayor valor de SMD, o sea el mayor efecto, correspondió a la reducción de la reactividad cutánea SMD= 1,71 (IC<sub>95%</sub>: 1,37-2,05), seguido de las variables clínicas de Medicación y Síntomas (Fig. 45). Entre las variables inmunológicas la de mayor efecto fue el cociente IgEesp/IgG4, en una magnitud similar al efecto clínico.

Uno de los objetivos de los ensayos clínicos era determinar el grado de correlación entre las variables paraclínicas (reactividad cutánea, variables inmunológicas) y clínicas. En todos los estudios, por separado, se encontró una correlación significativa entre reducción de Síntomas y Medicación y reducción de la Reactividad Cutánea (LogCh10). El análisis conjunto de los seis ensayos permitió confirmar este resultado con mayor poder estadístico:  $r = 0,442$ . Concordantemente, también se encontraron valores significativos de correlación de la reducción de la Variabilidad del FPE (VFPE) con la mejoría clínica, y con la disminución de la Reactividad Cutánea (Tabla 34).

En el análisis de la segunda serie de ensayos, se encontraron valores de correlación significativos entre Síntomas-Medicación y las variables: IgE específica y el cociente IgEesp/IgG4 (Tabla 35). La correlación con la variable IgG4 estuvo muy cerca de la significación estadística para  $p = 0,05$ . El hecho de encontrar una correlación significativa entre la Reactividad Cutánea y el resto de las variables inmunológicas, con la variable clínica principal, autoregistrada por el paciente, aporta una mayor coherencia y objetividad a los resultados obtenidos y, en particular, apoya la utilidad del cociente IgEesp/IgG4 como una posible variable subrogada de eficacia clínica.

#### **IV.7.4 Resultados de las variables de seguridad analizadas mediante meta-análisis**

Es conocido que la IT con alergenos provoca frecuentemente eventos adversos (EA), en forma de reacciones alérgicas locales o sistémicas, o sea, los EA no constituyen en este caso

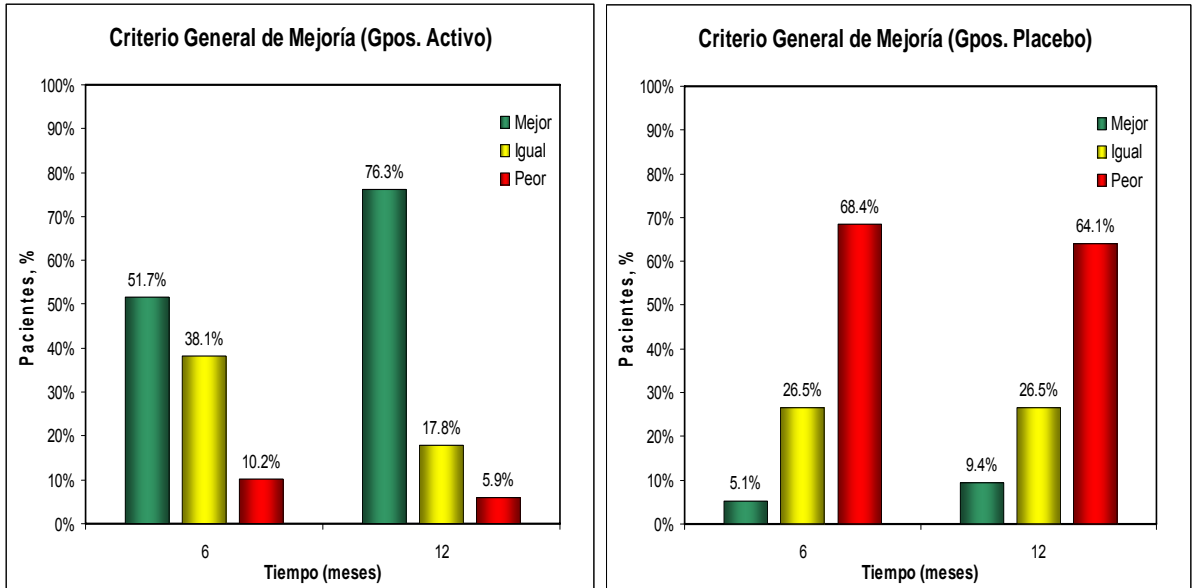


Fig. 43. Pacientes clasificados según el Criterio General de Mejoría en los grupos Activo y Placebo. Compilación de los seis ensayos clínicos.

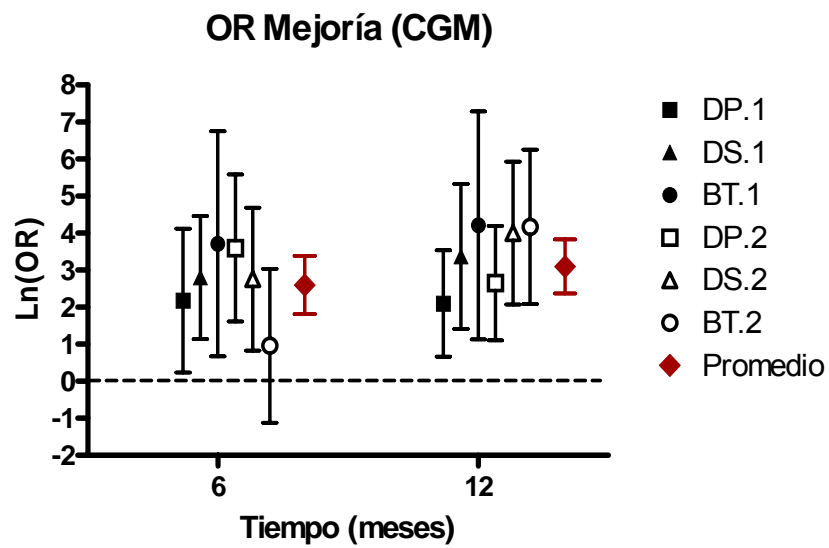


Fig. 44. Razón de Tasas (OR) para cada ensayo y promedio ponderado de los seis ensayos, en cuanto a mejoría clínica (variable categórica CGM: Criterio General de Mejoría). Las barras indican el IC95%.



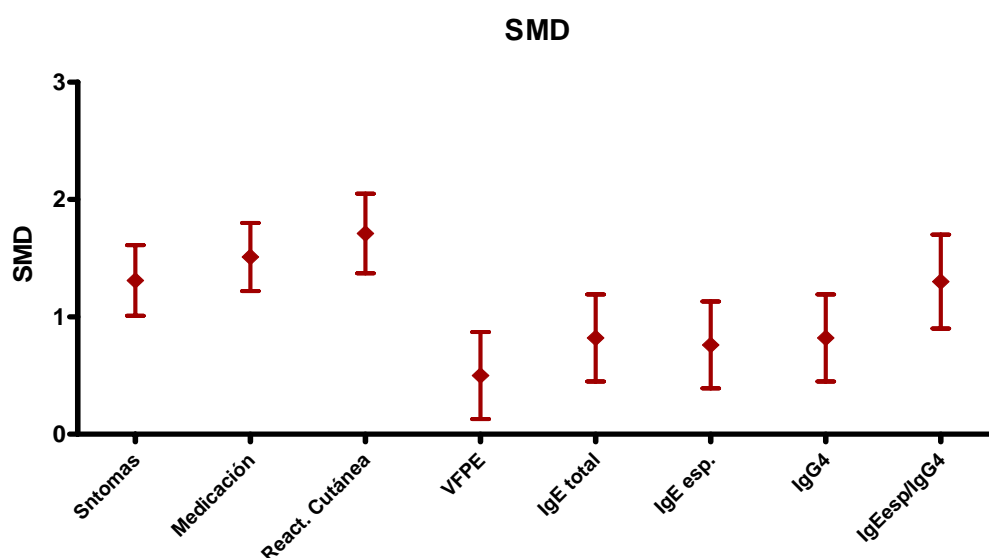


Fig. 45. Magnitud del efecto para cada variable de eficacia, determinada a través de la Diferencia Estandarizada de Promedios (SMD) entre Activo y Placebo. Se grafica el promedio ponderado de los seis ensayos (tres en los casos de VFPE y las determinaciones de anticuerpos) e IC95%.

Tabla 34. Correlación (Pearson) entre las variables primarias cuantitativas en los pacientes bajo tratamiento activo, analizando el conjunto de los seis ensayos (N=118) o de los tres primeros (DP.1, DS.1 y BT.1) para VFPE (N=58).

	Síntomas y Medicación	Log Ch10	VFPE
Síntomas y Medicación		<b>0,442</b> p<0,0001; N= 118	<b>0,583</b> p<0,0001; N= 58
Reactividad Cutánea (Log Ch10)	<b>0,442</b> p<0,0001; N= 118		<b>0,398</b> p=0,002; N= 58
Variabilidad FPE	<b>0,583</b> p<0,0001; N= 58	<b>0,398</b> p=0,002; N= 58	

Tabla 35. Correlación entre la variable clínica principal (Síntomas-Medicación) y las variables inmunológicas analizando el conjunto de los tres ensayos pertenecientes a la segunda serie (DS.2, DP.2 y BT.2).

	IgE total	IgE específica	IgG4	IgEsp/IgG4
Síntomas y Medicación	0,031 ns	<b>0,352</b> p=0,003; N=60	<b>-0,203</b> p= 0,059; N=60	<b>0,228</b> p=0,039; N=60

efectos colaterales; sino que están directamente asociados a la actividad biológica del producto. En la Tabla 36 se relaciona la compilación de los seis ensayos en cuanto a EA. No se presentaron reacciones sistémicas de grado III o IV, aunque sí se observaron en tres ensayos clínicos, reacciones sistémicas de grado I-II, consistentes en síntomas de asma ligera o moderada, probablemente relacionadas con la actividad alérgica del producto. Los EA más frecuentes asociados al tratamiento activo fueron las reacciones locales (3,89 % de las inyecciones). La mayor puntuación por EA asociados al tratamiento activo se observó durante la fase de incremento, particularmente, en el rango de dosis entre 2000 y 6000 UB y decayó abruptamente en la fase de mantenimiento (Fig. 46).

Para el meta-análisis de los seis ensayos empleamos el parámetro Razón de Riesgo (RR), que se define como la frecuencia de EA en el Grupo Activo con respecto al Placebo. Los resultados fueron homogéneos entre los diferentes ensayos (Fig. 47) (prueba  $\chi^2$  no significativa,  $p > 0,05$ ). El resultado promedio fue de  $RR = 1,86$  (IC: 1,31-2,63), es decir la proporción de EA fue casi el doble bajo tratamiento activo. Este valor fue bastante mayor para las reacciones locales:  $RR_{loc} = 4,98$  (IC<sub>95%</sub>: 2,32-10,73) y no llegó a ser significativo para las sistémicas:  $RR_{sis} = 2,17$  (IC<sub>95%</sub>: 0,82-5,75).

#### **IV.7.5 Discusión de los resultados de los ensayos clínicos de inmunoterapia**

##### **Eficacia**

La eficacia del tratamiento se determinó, básicamente, a través de la reducción de los síntomas y la medicación. La experiencia internacional considera la IT con alérgenos de ácaros, efectiva en el 60-70 % de los pacientes, alcanzando cerca del 50 % de reducción de los síntomas y la medicación, con respecto al tratamiento farmacológico.<sup>210</sup> También se reconoce su efectividad en la reducción de la reactividad hacia el alérgeno, tanto en el órgano de choque, como a nivel sistémico. No obstante su efecto sobre la función pulmonar en los pacientes asmáticos es aún cuestionable. La mayor parte de los estudios con vacunas de ácaros, se han realizado con las especies DP y DF. No se han publicado aún ensayos controlados de IT con DS y BT.

El análisis combinado de los resultados de nuestros ensayos arrojó un 60,3 % de reducción de síntomas y medicación, algo mejor, aunque no alejado de lo publicado internacionalmente. Para realizar una comparación más precisa, relacionamos en la Tabla 37 los principales resultados del meta-análisis de ensayos clínicos de IT en asma, publicado por Abramson y col,

Tabla 36. Frecuencia de los eventos adversos (EA) con respecto al número de inyecciones administradas. Compilación de los seis ensayos.

	No Pacientes	Pacientes con EA %	No de inyecciones	Frecuencia de eventos adversas, %				
				Inespecíficos	Locales	Sistémicos (I-II)	Sistémicos (III-IV)	Total
Activo	118	38%	2365	1,40%	1,99%	0,51%	0	3,89%
Placebo	117	31%	2246	1,65%	0,22%	0,13%	0	2,00%
Total	235	34%	4611	1,52%	1,13%	0,33%	0	2,97%

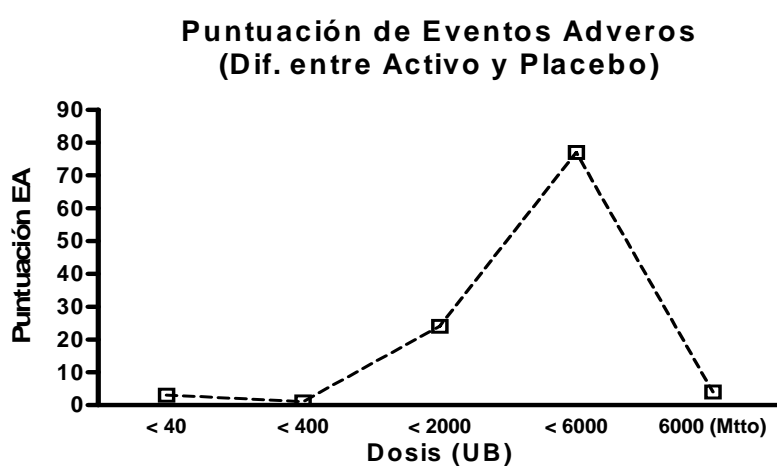


Fig. 46. Comportamiento de la puntuación por eventos adversos (EA), asociada al tratamiento activo (calculada como la diferencia entre Activo y Placebo) en dependencia de la dosis administrada.

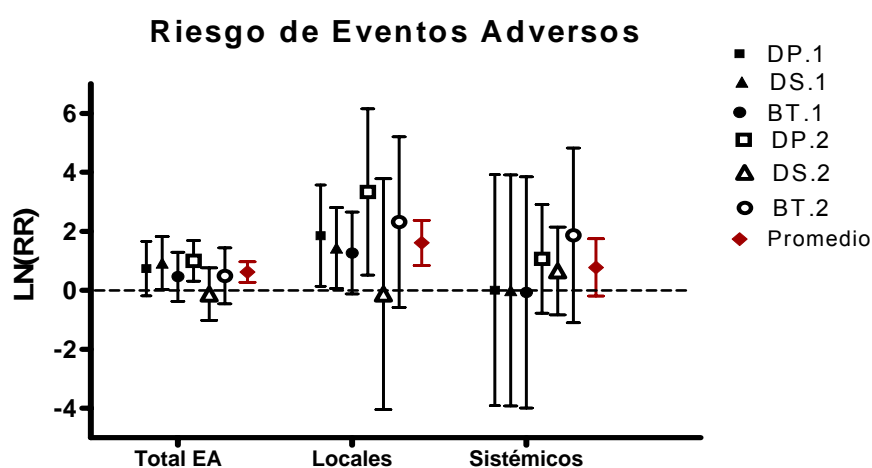


Fig. 47. Resultados del meta-análisis de los seis ensayos clínicos, en cuanto a frecuencia de eventos adversos, expresado mediante la Razón de Riesgo (RR). Las barras indican el IC95%.

Tabla 37. Magnitud del efecto de las variables continuas, expresado a través de la Diferencia Estandarizada de Promedios (SMD) y comparación con meta-análisis de Abramson.

<b>Magnitud del Efecto (SMD)</b>	<b>Resultados de meta-análisis con VALERGEN</b>	<b>Meta-análisis, Abramson 2003</b>
Síntomas	<b>-1,51</b> (-1,22 a -1,81)	<b>-1,13</b> (-1,69 a -0,58)*
Medicación	<b>-1,31</b> (-1,02 a -1,60)	<b>-0,51</b> (-0,74 a -0,28)*
Función Pulmonar	FPE: No sign. VFPE: <b>-0,50</b> (-0,31 a -0,69)	1995: FPE o VEF1: <b>0,45</b> (0,03 a 0,8)* 2003: No significativa
Hiperreactividad bronquial específica	No se determinó	<b>-1,14</b> (-1,62 a -0,65)*
Reactividad Cutánea	<b>-1,71</b> (-1,37 a -2,05)	No se reportó

(♣): Datos correspondientes a los ensayos con ácaros (n= 25)

(\*): Datos de todos los tipos de alérgenos (no solo ácaros).

en el cual se analizaron 54 ensayos controlados, incluyendo 25 con ácaros.<sup>90</sup> La magnitud del efecto promedio de nuestros ensayos en cuanto a reducción de síntomas (1,51), fue algo mayor, que el valor de Abramson (1,13), aunque sus IC<sub>95%</sub> se interceptan. En cuanto a reducción de la medicación, la ventaja de nuestros estudios fue aún mayor: 1,31 vs 0,51; aunque en este caso el dato publicado corresponde al conjunto de los diferentes alérgenos, y no solamente a ácaros. Sin embargo, no todos los ensayos referidos coinciden en el uso de los mismos medicamentos ni el mismo sistema de puntuación, de modo que es difícil asegurar que ésta sea una diferencia clínicamente relevante.

La Razón de Tasas (OR) de mejoría clínica, que refleja la probabilidad comparativa de mejorar bajo tratamiento activo con relación al control, alcanzó un valor de 22,3 (IC: 10,7-46,2), superior al valor publicado en el meta-análisis de Abramson para la variable clínica de síntomas (9,7; IC:4,4-28) e inferior para la medicación (35,6 IC:11,5-193), aunque debido a la gran heterogeneidad del referido meta-análisis, las diferencias no son significativas.

El mayor efecto provocado por la IT, según el meta-análisis de Abramson, es la reducción de la hiperreactividad bronquial específica. En nuestros ensayos no se determinó dicha variable, pues implicaría el uso de pruebas de provocación bronquial, lo cual expone al paciente a riesgos de consideración. No obstante, se estimó que la reactividad cutánea puede también reflejar la reactividad bronquial ya que ambas pruebas comparten, básicamente, el mismo mecanismo desencadenante y se ha descrito una fuerte asociación entre las mismas.<sup>197,211-213</sup> Es conocido que la IT es capaz de reducir la reactividad cutánea específica de forma sustancial.<sup>214-217</sup> En nuestro meta-análisis, esta fue precisamente la variable con mayor efecto. Su magnitud (-1,71) es comparable, o incluso mayor, que lo descrito por otros autores<sup>213,218-220</sup> y superior al efecto de reducción de la hiperreactividad bronquial en el meta-análisis de Abramson.

De modo general, nuestros resultados en cuanto a eficacia clínica, fueron similares o algo superiores a los publicados en el extranjero. Una mayor eficacia pudiera radicar en el empleo de productos estandarizados, ya que en una parte de los estudios referidos, por ejemplo en el meta-análisis de Abramson, se emplearon extractos no estandarizados. Particularmente, el papel de la estandarización, se puede reflejar en la posibilidad de alcanzar altas dosis de forma más segura, reduciendo el riesgo de reacciones sistémicas severas, y como es conocido, la efectividad de la IT depende de la dosis máxima administrada.<sup>221, 222</sup>

Coherentemente, en nuestro estudio se obtuvo un alto grado de cumplimiento del tratamiento que equivale a una dosis acumulativa elevada y todos los pacientes alcanzaron la dosis máxima de mantenimiento de 6000 UB, equivalente a 12 µg de Der p 1 que se corresponde con el rango que ha sido recomendado por otros autores (entre 5 y 20 µg).<sup>101</sup>

Por otra parte, no se puede descartar la influencia del factor poblacional y ambiental. Los datos de referencia provienen de poblaciones de Europa, Norteamérica y Australia con climas templados, donde a diferencia de los países tropicales, juega un papel importante la sensibilización polínica. Las características de la población asmática cubana, donde predomina ampliamente la sensibilización a ácaros, pudieran resultar en una mayor eficacia de la IT con estos alergenicos.

### **Variables inmunológicas y mecanismos de la IT**

Se conoce que la IT ejerce cambios inmunoreguladores en diferentes elementos de la respuesta alérgica. En primer lugar, en los mecanismos efectores de la respuesta inmediata: los anticuerpos IgE y la actividad de mastocitos y basófilos. También, la IT incrementa los anticuerpos IgG4, asociados a la inducción de IL-10 y la respuesta de células Treg.<sup>2,113-115,223</sup>

Las variables inmunológicas empleadas en nuestro estudio demostraron incrementos en IgG4 y reducción de IgE específica, de forma consistente. La magnitud del efecto observado fue para ambas variables mayor de 0,7. Es la primera ocasión en el país que se determinan variables inmunológicas de este tipo en ensayos controlados de IT; de modo que en ese sentido, no se cuenta con antecedentes en nuestra población. Los niveles de anticuerpos se determinaron en unidades relativas a un suero de referencia interna, ya que no se emplearon estuches comerciales, por lo que se hace difícil la comparación cuantitativa con otros estudios.

El incremento de los anticuerpos IgG4 inducidos por la IT, suele estar desplazado en el tiempo con respecto a la mejoría clínica.<sup>224</sup> No obstante, se ha descrito que los cambios pueden ser apreciables ya a los 60 días de iniciado el tratamiento,<sup>225</sup> lo cual concuerda con nuestros resultados a los 6 meses. En contraste, el efecto de reducción de la IgE específica se ha descrito, más bien como inconsistente o muy modesto, en varios estudios y su reducción ocurre solamente a largo plazo.<sup>114</sup> De acuerdo a nuestros resultados, tanto la reducción de IgE, como el incremento de IgG4, mostraron tener algún grado de correlación con la mejoría clínica de los pacientes. La reactividad cutánea, también puede ser considerada una variable inmunológica, ya que la misma es dependiente de IgE, aunque igualmente, del número de

mastocitos activados y de la expresión de receptores de IgE en su membrana, entre otros factores. De esa forma, la reducción de la reactividad cutánea fue coherente con el efecto observado sobre la IgE.

El cociente IgE<sub>esp</sub>/IgG4 ha sido propuesto por otros autores, como posible subrogado de eficacia clínica, mostrando poseer un valor de correlación relativamente alto con la misma.<sup>99,226,227</sup> Nuestros resultados confirmaron que dicho cociente consigue el mayor efecto en comparación con la IgE e IgG4 por separado, con una correlación significativa con la mejoría clínica. Por otra parte, los cambios en la IgG4 parecen haber antecedido a los de la IgE. En su conjunto, estos indicios sugieren una posible interacción sinérgica entre ambos componentes de la respuesta inmunológica, lo cual concuerda con la hipótesis del papel bloqueador de los anticuerpos IgG4, que puede ser ejercido, no solamente a nivel de respuesta alérgica efectora,<sup>115</sup> sino también en la inhibición del mecanismo de presentación antigénica a células T, facilitada por la IgE.<sup>118,119</sup> Mediante este mecanismo, la inducción de IgG4 bloqueadora sería capaz de influir también en la respuesta inflamatoria crónica, organizada por las células Th2, que es esencial en las alergias respiratorias, y por lo tanto, sobre el efecto clínico, lo cual estaría en consonancia con lo observado en nuestro estudio.

### **Seguridad**

Las reacciones alérgicas son inherentes a la IT con alérgenos, o sea, no son un efecto colateral. La frecuencia de reacciones adversas durante la IT se ha estimado por varios autores entre 0,84 % y 10% de las inyecciones administradas, incluyendo entre 0,05 y 0,27 % de reacciones sistémicas, mayormente, de naturaleza leve o moderada,<sup>102-111</sup> aunque no siempre se han empleado criterios uniformes para su clasificación. La frecuencia de eventos adversos atribuibles al producto, observada en nuestros estudios, fue comparable a lo descrito internacionalmente. La misma fue de 2,5 % del total de inyecciones suministradas; incluyendo 0,5 % de reacciones sistémicas grado I y II, y no se observaron reacciones sistémicas severas (grados III y IV). La mayor parte de las reacciones aparecieron durante la fase de incremento con la dosis más alta, de acuerdo a lo esperado.

Entre los factores que favorecen la seguridad de la IT con un menor riesgo de reacciones sistémicas, se encuentran el empleo de vacunas estandarizadas y la adherencia a las recomendaciones para su administración, que fueron observadas plenamente en nuestros ensayos. También, las reacciones adversas suelen ser menores para la vacunas de ácaros en

comparación con los pólenes.<sup>102,111</sup> Por otra parte, el diseño del esquema de incremento de dosis juega un papel importante en la seguridad de la IT. En nuestros ensayos se empleó un esquema tradicional suficientemente cauteloso. El hecho de que la dosis máxima prevista (6000 UB, equivalente a 12 µg de Der p 1) fuera tolerada por todos los pacientes, es un indicador también, de la seguridad del tratamiento. En este sentido otros trabajos también han referido dosis similares como relativamente seguras y tolerables.<sup>89,214</sup>

#### **IV.7.6 Elementos de salida de los ensayos clínicos de inmunoterapia**

En resumen, los resultados obtenidos integrados mediante el meta-análisis, permiten concluir que la IT con las vacunas VALERGEN-DP, DS y BT es eficaz en la reducción muy significativa de los síntomas del asma (en 56%) y la medicación (58,4%) con respecto al empleo solamente de tratamiento farmacológico convencional. El mayor efecto se alcanzó en cuanto a reducción de la sensibilidad al alérgeno, disminuyendo la misma en 2,5 log. Se alcanzó una mejoría significativa, aunque modesta, de la función pulmonar, expresada en una reducción de la variabilidad del FPE y por consiguiente de la clasificación de la función respiratoria (OR= 4,8). El 76 % de los pacientes con IT obtuvo mejoría clínicamente significativa (OR= 22,3), lo cual es similar o algo superior a lo descrito en otras áreas geográficas. La eficacia del tratamiento fue mayor a los 12 meses con respecto a 6 meses. La IT indujo incrementos de IgG4 y reducción de IgE específica y la mejoría clínica estuvo correlacionada significativamente con la reducción del cociente IgE/IgG4 y de la reactividad cutánea. El tratamiento con VALERGEN-DP fue igualmente efectivo en la reducción de la sensibilidad cutánea hacia la especie homóloga DS y viceversa. La seguridad de la IT con el esquema empleado a una dosis de mantenimiento de 6000 UB, fue aceptable, ya que no se evidenciaron reacciones sistémicas severas y la frecuencia de reacciones locales o sistémicas fue similar a lo descrito internacionalmente (RR = 1,86).

De modo general, los resultados indicaron que la IT con las vacunas VALERGEN es un tratamiento efectivo contra el asma alérgica en nuestra población. Los resultados fueron consistentes entre los diferentes ensayos clínicos y vacunas, evidenciando el impacto de la estandarización.



## **IV.8 DISCUSIÓN GENERAL**

### **Ventajas de la estandarización**

En los acápites anteriores se ha discutido el impacto del establecimiento del sistema de estandarización en los aspectos de calidad de los productos y de su eficacia y seguridad clínicas. En particular, el proceso de fabricación logró reducir la variabilidad natural de las fuentes biológicas, desde aproximadamente un factor de 10 en los lotes no estandarizados hasta cerca de 2; o sea, 70-142%, valor menor que la tolerancia establecida internacionalmente para la actividad alérgica y el contenido de alérgenos individuales (50-200%),<sup>132</sup> la cual se corresponde con resultados consistentes en el diagnóstico y un margen adecuado de seguridad durante la IT.<sup>183</sup> La mayor parte de esta variabilidad aparente entre lotes estuvo causada por la imprecisión del método analítico para la potencia alérgica, que aún así, fue similar al método de referencia existente.<sup>138</sup> La variabilidad intrínseca del proceso de fabricación fue similar a lo publicado por la FDA para fabricantes licenciados en EE.UU.<sup>183</sup>

Los ensayos clínicos de diagnóstico por prueba cutánea demostraron la consistencia de los resultados clínicos en esa aplicación, con valores similares de tamaño de reacción, sensibilidad y especificidad, entre los diferentes productos, lográndose estandarizar la prueba con la dosis y límite de corte, óptimos. El ensayo con DP permitió comparar satisfactoriamente nuestro producto con el fabricante líder mundial que emplea un sistema de estandarización compatible con las UB, confirmando la validez del mismo para la prueba diagnóstica. Por otra parte, el empleo también en nuestro sistema, de métodos analíticos para Alérgenos Mayores permitió la comparación con otro fabricante de avanzada, en ese mismo ensayo clínico; así como, el diseño del esquema de dosis de la IT, de acuerdo al rango recomendado internacionalmente, expresado en términos de masa de Alérgeno Mayor (de 5 a 20 µg de Der p 1). No obstante, estas recomendaciones están basadas en unos pocos ensayos de IT con dosis múltiples,<sup>221,222</sup> y actualmente se ha reconocido la necesidad de llevar a cabo más estudios clínicos, diseñados específicamente para evaluar la relación dosis-respuesta durante la IT,<sup>98</sup> lo cual sería válido también para nuestras vacunas.

La aplicación de ensayos para Alérgenos Mayores, basados en anticuerpos monoclonales y policlonales, es de gran actualidad y se inscribe en la tendencia internacional que persigue establecer un sistema único de estandarización que permita la comparación y la

intercambiabilidad entre fabricantes.<sup>126</sup> Nuestros resultados establecieron una equivalencia de 2 ng/UB para Der p 1 y 4 ng/UB para Der s 1, que refleja diferencias en la actividad alérgica intrínseca entre ambos alérgenos. En tal sentido, esa puede ser una desventaja del sistema de unidades de masa, ya que las dosis óptimas, pueden no coincidir entre los diferentes alérgenos, careciendo de un sentido clínico claro, que pueda ser interpretado fácilmente por el médico (En contraste, por ejemplo, nuestros tres productos tienen la misma dosis óptima de 20 000 UB/mL para el diagnóstico).

No obstante, los ELISA-AcM demostraron su utilidad y ventajas prácticas en comparación con los métodos basados en IgE de pacientes alérgicos. Sin embargo, para BT, los AcM disponibles y los generados por nuestro grupo contra rBlo t 13, no fueron útiles para la estandarización de los extractos.<sup>82</sup> De modo que, la cuestión del desarrollo de un método analítico para la cuantificación de alérgenos nativos de BT está aún pendiente de solución a nivel internacional y se continúa trabajando en esa dirección.

El principal impacto de la estandarización debe manifestarse en la aplicación terapéutica de los productos, en primer lugar en su seguridad. En efecto, los resultados de los ensayos clínicos de IT demostraron un perfil adecuado de seguridad, permitiendo el uso de dosis elevadas de alérgenos con alto grado de cumplimiento del tratamiento y sin reacciones sistémicas severas. La consistencia clínica, tanto en cuanto a seguridad, como a eficacia, evidenció la utilidad de la estandarización. El meta-análisis de los seis ensayos clínicos de IT reflejó homogeneidad estadística ( $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ) de las variables principales, en contraste con el meta-análisis internacional de Abramson, donde la heterogeneidad de las variables de eficacia, fue significativa.<sup>90</sup> En nuestros estudios, los valores de dispersión para la diferencia estandarizada de promedios (SMD) de síntomas y medicación, no rebasaron  $\pm 20\%$ , mientras que para Abramson fueron de cerca de  $\pm 50\%$  (Tabla 37).

Otra de las ventajas de los productos desarrollados es su gran estabilidad, demostrada por los estudios en tiempo real. Se conoce que la liofilización provee una estabilidad elevada a los productos biológicos. Sin embargo, no abundan en el mercado internacional productos alérgicos con formulación liofilizada. Por ejemplo, la FDA reconocía que existían solamente 16 extractos alérgicos liofilizados licenciados en EE.UU. de un total de 140 productos de 11 fabricantes, ninguno de ellos de ácaros.<sup>183</sup> La mayor parte de los productos licenciados en EE.UU están formulados con Glicerina 50%, que actúa como preservativo y estabilizante, aunque

el período de validez de las formulaciones glicerinadas es de sólo dos años, mucho menor que los cinco años aprobados para nuestros liofilizados.<sup>186</sup> Otra de las ventajas de la formulación liofilizada es su flexibilidad para el desarrollo de nuevas presentaciones con diferentes vehículos para reconstituir el producto, por ejemplo, para la administración de la IT por vías no inyectables; así como, la posibilidad de ajustar a conveniencia la concentración del producto final, posibilitando un esquema de tratamiento ajustable y personalizado.

### **Reactividad e inmunogenicidad cruzada**

Era conocido de estudios previos que los alérgenos de DP y DS comparten un alto grado de reactividad cruzada y homología, y que la reactividad cruzada de ambos con BT es mucho más limitada.<sup>38,79,160</sup> Los resultados nuestros confirmaron estos datos, específicamente, por la correlación observada en las pruebas cutáneas entre DP y DS y no con BT (en el ensayo clínico de diagnóstico en niños), así como, por el empleo de sueros IgE comunes para DS y DP y anticuerpos policlonales que reconocen tanto Der p 1 como Der s 1. La reactividad cruzada es una propiedad antigénica que no coincide exactamente con la inmunogenicidad, o sea, la capacidad de inducir o modificar la respuesta inmunitaria específica; particularmente en la IT, la inmunogenicidad del alérgeno se reflejaría en su capacidad de reducir la reactividad cutánea específica.<sup>228</sup> En tal sentido, los resultados de los ensayos clínicos de IT con DP, DS y BT, demostraron por primera vez, la inmunogenicidad cruzada entre DS y DP y la falta de la misma entre ambos y BT, lo cual constituye un aporte científico del trabajo a la caracterización inmunológica de estos alérgenos.

Este resultado tiene también implicaciones para la práctica clínica, pues en nuestra población asmática existe una alta proporción de pacientes poli-sensibilizados (de acuerdo a varios estudios cerca del 30 % están sensibilizados simultáneamente a DP, DS y BT).<sup>76,229,230</sup> Entonces, el tratamiento óptimo para estos pacientes debería consistir en la combinación de vacunas de DP o DS más BT. En ese sentido, se encuentran ya en ejecución, el primer ensayo clínico con tratamiento combinado, que permitiría evaluar su eficacia con respecto a las vacunas individuales.

### **El Registro de los productos alérgicos**

Los extractos alérgicos no se consideraron productos farmacéuticos sujetos a Registro hasta los años 80-90, en que este requerimiento comienza a introducirse en Europa y EE.UU, acompañado del incipiente proceso de estandarización. Los productos alérgicos, han

requerido de un enfoque regulatorio diferenciado que, lamentablemente, no ha estado armonizado entre Europa y EE.UU, lo que ha influido desfavorablemente en su difusión internacional. Incluso, dentro de Europa, a pesar de la emisión de regulaciones comunitarias, el avance del proceso ha sido lento y desigual. La regulación europea excluye del Registro a los productos individualizados, preparados bajo prescripción para un paciente determinado, los cuales no se consideran productos industriales. La situación actual es que esta categoría, con escaso control regulatorio, domina entre el 75 y el 100 % del mercado en algunos países.<sup>231</sup> En Alemania, uno de los países líderes en esta rama, el Paul-Erlich-Institut tiene registrados cerca de 150 productos para diagnóstico y 20 como vacunas (incluyendo DP y DF). Sin embargo, siete países de la Unión Europea aún no tienen registrado ni un solo producto. No hay tampoco productos registrados por el procedimiento centralizado de la EMEA.<sup>231</sup> Por otra parte, en EE.UU. se cuenta solamente con 19 vacunas estandarizadas (el equivalente del Registro de la FDA) de cientos de extractos alérgicos presentes en el mercado.<sup>124</sup>

La falta de armonización entre ambos enfoques regulatorios ha impedido hasta ahora la inclusión de los productos alérgicos en la ICH.<sup>232</sup> No obstante, el desarrollo de nuestras vacunas, por llevarse a cabo en BIOCEN, un complejo científico-industrial con diversas producciones biofarmacéuticas y un sistema de aseguramiento de la calidad único, regido por las normas ISO-9001; ha estado obligado a incorporar en muchos estudios específicos (validación, estabilidad, desarrollo de especificaciones), el enfoque y los requerimientos de la ICH, demostrando, de esa forma, su compatibilidad con los productos alérgicos.

En Cuba, los productos alérgicos quedaron legalmente sujetos a la obligatoriedad del Registro desde 1980 por el CECMED. No obstante, la situación real, era la existencia de pequeños laboratorios en hospitales que preparaban y preparan aún, extractos alérgicos de forma artesanal en condiciones precarias, fuera de todo control por parte del CECMED. Como resultado de este trabajo, se logró por primera vez en el país, el Registro de productos alérgicos industriales para las dos indicaciones; primeramente para diagnóstico por pruebas cutáneas, y más recientemente, para inmunoterapia por vía inyectable (Tabla 38, Fig. 48, Anexo 5). También se han obtenido y renovado las correspondientes licencias de producción en las instalaciones de BIOCEN.

Como resultado colateral de este trabajo, se aprobó en el 2002, la regulación del CECMED que establece los requisitos de Registro para los productos alérgicos<sup>136,137</sup> con criterios muy

Tabla 38. Registro sanitario de los productos alergénicos VALERGEN® en Cuba (CECMED: <http://www.cecmmed.sld.cu>)

Productos	No. Registro
VALERGEN-DP ( <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> )	1694
VALERGEN-DS ( <i>Dermatophagoides siboney</i> )	1695
VALERGEN-BT ( <i>Blomia tropicalis</i> )	1708
Solución Diluyente para Extractos Alergénicos VALERGEN	1707



Fig. 48. Fotografía de los productos en su envase final, listos para la comercialización.

similares a la Guía Europea, incluyendo el concepto de agrupamiento en familias homólogas.<sup>131</sup> Sin embargo, para nuestros productos se ha hecho un uso muy limitado de esa posibilidad, a pesar de la reactividad cruzada y homología existente, particularmente, entre DP y DS. Solamente se ha aplicado en algunos estudios de validación, consistencia, estabilidad de productos intermedios y estudios de toxicidad por dosis repetida. Todos los estudios clínicos se han realizado con cada producto por separado, si bien la esencia misma del presente documento, que integra los resultados del desarrollo de los tres, responde al concepto regulatorio de alérgenos homólogos.

Nuestras vacunas han sido también los primeros productos alérgicos estandarizados registrados en América Latina, pues el ámbito regulatorio de esta rama en nuestra zona geográfica está aún en un estadio incipiente.<sup>233,234</sup> Obviamente, es la primera vez en el mundo que se registra un producto alérgico de DS, pues este ácaro es endémico de Cuba. No obstante, también es la primera vez que se registra, como producto farmacéutico, un extracto alérgico de BT. Esta especie es propia de países tropicales y es, por consiguiente, de menor interés para los fabricantes europeos y norteamericanos, aunque en algunos países está disponible como producto individualizado o para uso veterinario. La existencia de una vacuna estandarizada de BT desarrollada en Cuba ha sido reconocida por la bibliografía internacional del más alto impacto en la rama.<sup>37</sup>

### **Generalización de los resultados en la práctica clínica e impacto socioeconómico**

Las vacunas VALERGEN se han introducido crecientemente en los servicios de Alergia de todo el país cubriendo actualmente toda la demanda según la capacidad de estos servicios, y están ya incluidas en el cuadro básico de medicamentos del sistema nacional de salud.<sup>235</sup> Los productos están limitados a ser usados en los servicios de Alergia, por los riesgos que implica su administración por vía inyectable y la necesidad de supervisión médica especializada para su indicación. Los ensayos clínicos de IT se realizaron en una población representativa de nuestra población asmática adulta. No obstante, el tamaño de la muestra ha sido aún limitado en comparación con la población alérgica del país, y se recomienda realizar más ensayos para expandir y confirmar estos resultados, particularmente en niños, precisamente porque el principal impacto potencial de la IT radica en la posibilidad de prevenir el agravamiento de la enfermedad y el desarrollo de nuevas sensibilizaciones alérgicas, lo cual se logra con mayor efectividad en la niñez.<sup>96</sup>

El impacto socioeconómico del asma es bien conocido, al tratarse de una enfermedad de muy alta y creciente prevalencia. La intervención farmacológica, aunque ha demostrado ser efectiva en el control de los síntomas asmáticos, no es eficiente como política de salud pública pues incrementa los costos de atención sin incidir en la tasa de prevalencia. Esto adquiere mayor relevancia en un sistema de salud como el nuestro, sentado sobre bases racionales y no lucrativas. Así pues, el enfoque etiológico del asma, y la IT, como pilar del mismo, explotando su efecto preventivo y perdurable, constituye una alternativa importante en el manejo de esta enfermedad crónica.

En varios estudios recientes que han abordado la costo-efectividad de la IT, tanto en Europa como en EE.UU, <sup>236 - 238</sup> se ha demostrado su capacidad de reducir el consumo de medicamentos y los costos por ese concepto, así como por atención médica y otros costos indirectos, con un saldo neto favorable que se refuerza a largo plazo. Esto, a pesar de que la IT en esos países es una práctica bastante lucrativa, generalmente privada, y los precios de las vacunas son elevados (por ejemplo, en EE.UU. el costo medio del tratamiento por seis meses es 453 USD<sup>236</sup>). Aunque un análisis a fondo de la relación costo-beneficio de la IT está fuera del alcance del presente trabajo, una estimación preliminar de la misma en nuestro sistema de salud, teniendo en cuenta que los costos de las vacunas VALERGEN son mucho menores, resultaría previsiblemente en un efecto mayor. En efecto, el precio para el sistema nacional de medicamentos, del juego de un bulbo de liofilizado VALERGEN y cuatro de diluyente (suficiente para seis meses de tratamiento), es de 76.00 pesos, con un componente de costo en divisas de solo 1.94 CUC, claramente favorable con respecto al precio de productos similares en Europa o EE.UU. que oscila entre 60 y 100 USD.

El efecto económico directo por concepto de reducción del consumo de medicamentos pudiera estimarse a partir del valor promedio observado en nuestro trabajo (58,4%) y la posible extensión de este enfoque a toda la población tributaria del mismo en el país (que atendiendo a la prevalencia del asma y la sensibilización a ácaros, se estima entre 200 000 y 400 000 habitantes), lo cual, indudablemente, arrojaría un impacto socio-económico considerable.

En resumen, en nuestro país, donde existe una red extensa de servicios de Alergia en todas las provincias con perspectivas de crecimiento, potenciada por las características de nuestro sistema de salud, gratuito y de alcance general, existen condiciones únicas para la aplicación sistemática de un enfoque racional del asma, basado en un tratamiento etiológico y preventivo.

La generalización del empleo de las vacunas de alergenos de los ácaros más importantes en el país, como elemento básico de este enfoque, tiene el potencial de contribuir sustancialmente al mejoramiento de los índices de esta enfermedad, y a la reducción de los costos sociales provocados por la misma.

### **Aporte científico-tecnológico**

Los resultados obtenidos han implicado la introducción en el país de una nueva tecnología de producción y evaluación de una clase completa de productos biofarmacéuticos: las vacunas alérgicas. Se realizaron aportes científicos concretos en la caracterización inmunobiológica de alergenos de DS y BT y se desarrollaron, por primera vez en el país, métodos analíticos para la detección de IgE específica y ensayos inmunoenzimáticos basados en anticuerpos monoclonales y policlonales específicos a alergenos. Se desarrolló un método original para el cultivo y propagación de ácaros con alta eficiencia, como base del proceso productivo, el cual fue patentado en Cuba. Se realizaron, por primera vez en el país, ensayos clínicos de IT con un diseño a doble ciegas controlado por placebo. La metodología del desarrollo integral a ciclo completo de estas vacunas terapéuticas es útil para el desarrollo prospectivo de otros productos alérgicos, y sienta las bases para la investigación y diseño en el país de nuevas vacunas basadas en alergenos recombinantes y nuevos adyuvantes inmunomodulares.

La disponibilidad de vacunas o extractos alérgicos estandarizados, además de su evidente impacto social potencial, provee también herramientas muy útiles para el desarrollo de la investigación clínica alérgica, posibilitando ya la publicación de trabajos en revistas médicas de prestigio<sup>199-202,206,207,229,230</sup> y un mayor nivel científico en la formación profesional de los residentes de la especialidad.



## V. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo se resumen en las siguientes conclusiones:

1. Se demostró la preponderancia de los Alergenos Mayores del Grupo 1 de *Dermatophagoides*, así como de la fracción de 12 a 21 kDa de *Blomia tropicalis* con relación a la actividad alérgica total de los extractos alérgicos respectivos, en nuestra población; evidencia que sustenta el uso de dichos marcadores en el sistema de estandarización de estos productos.
2. Se desarrollaron y validaron métodos analíticos para la determinación de la actividad y composición alérgicas, basados en inmunoensayos con anticuerpos IgE humanos, o con anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra Alergenos Mayores del Grupo 1, que demostraron ser apropiados para el control de la calidad de los productos, particularmente en cuanto a precisión y sensibilidad analítica, de acuerdo con los requerimientos regulatorios internacionales.
3. Se estandarizó el proceso de fabricación, incluyendo el cultivo de ácaros, a partir del diseño e implementación de medidas y controles intermedios, y ajustes de parámetros tecnológicos, lográndose reducir la variabilidad natural inherente a la fuente alérgica hasta niveles inferiores al error aportado por los métodos analíticos. De esa forma, se evidenció la consistencia del proceso con una probabilidad de éxito del 94%, similar a lo descrito para fabricantes del mundo desarrollado.
4. La formulación liofilizada demostró su estabilidad durante cinco años de almacenamiento a 4°C, aventajando sustancialmente al producto reconstituido, para el cual el tiempo de vida fue de solo seis meses. La estabilidad de nuestros productos liofilizados resultó superior a la referida para la mayoría de los productos comerciales existentes y constituye un elemento de calidad y fiabilidad para su uso clínico.
5. Los productos resultaron inocuos desde el punto de vista toxicológico, aportando así, más seguridad para su aplicación clínica por vía inyectable.
6. La dosis de 20 000 UB/mL demostró un balance óptimo de sensibilidad y especificidad en la prueba de punción cutánea, tanto en adultos como en niños, probándose la eficacia diagnóstica de los productos en esa aplicación clínica. El extracto alérgico de

*Dermatophagoides pteronyssinus* (VALERGEN-DP) fue similar, en cuanto a exactitud diagnóstica, a productos comerciales de firmas prestigiosas.

7. Las tres vacunas alergénicas probaron su eficacia y seguridad en la inmunoterapia por vía inyectable en pacientes asmáticos, consiguiendo, en general, una reducción de los síntomas y el consumo de medicamentos en 60 %; mejoría clínica en el 76% de los pacientes; reducción de la sensibilidad cutánea y de la IgE e incremento de la IgG4 alérgeno-específica; con una frecuencia de eventos adversos similar a lo descrito internacionalmente y sin reacciones sistémicas severas.
8. La inmunoterapia con VALERGEN DP (*Dermatophagoides pteronyssinus*) fue efectiva contra la especie homóloga *Dermatophagoides siboney* y viceversa. En cambio, se demostró la ausencia de inmunogenicidad cruzada con *Blomia tropicalis*, lo cual aporta nuevos conocimientos sobre las características de estos alérgenos e indica la necesidad de su combinación para el tratamiento efectivo de pacientes polisensibilizados.
9. Los resultados clínicos de la inmunoterapia demostraron consistencia clínica y homogeneidad entre diferentes productos, lotes, y sitios de investigación clínica, evidenciando la utilidad del sistema de estandarización implementado.

Por último, como resultado final del ciclo completo de desarrollo, se obtuvo el Registro como medicamento de los tres productos para ambas indicaciones: diagnóstico mediante pruebas cutáneas e inmunoterapia subcutánea, lográndose la introducción de las vacunas en el sistema nacional de medicamentos y en todos los servicios de alergia del país.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Continuar los trabajos de investigación para la generación de anticuerpos monoclonales contra alergen recombinantes o naturales de *Blomia tropicalis* y el desarrollo de un ELISA útil para la cuantificación de los mismos en los extractos alérgicos y aplicable en su estandarización.
2. Llevar a cabo ensayos clínicos que permitan evaluar la eficacia de la combinación de la inmunoterapia con alergen de *D. pteronyssinus* o *D. siboney* con *Blomia tropicalis* en pacientes cubanos, atendiendo al alto grado de polisensibilización y la falta de inmunogenicidad cruzada demostrada.
3. Realizar ensayos clínicos de inmunoterapia por vía sublingual con las tres vacunas, en busca de evaluar su eficacia y seguridad, teniendo en cuenta la posibilidad de reducir el riesgo de reacciones sistémicas.
4. Llevar a cabo ensayos clínicos de inmunoterapia en niños, con el fin de confirmar la eficacia y seguridad de las vacunas en esa población, e investigar su efecto preventivo a largo plazo.

## BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> Akdis M. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. *Curr Op Immunol* 2006, 18:738–44.
- <sup>2</sup> Van Neerven RJ, Knol EF, Wurtzen PA, IgE-mediated allergen presentation and blocking antibodies: Regulation of T-Cell activation in Allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;141:119-29.
- <sup>3</sup> Pawankar P, Baena-Cagnani C, Bousquet J, Canonica W, Cruz AA, Kaliner MA, Lanier BQ. State of World Allergy Report 2008: Allergy and Chronic Respiratory Diseases. *WAO Journal* 2008;Suppl 1:S4-17.
- <sup>4</sup> GINA - The Global Initiative for Asthma [internet]. World Health Organization [citado 24 abril 2008]. Disponible en <http://www.ginasthma.com>.
- <sup>5</sup> Johanson SGO, Haahtela. Prevention of allergy and allergic asthma. En: Ring J et al (eds). *Chemical Immunology and Allergy*, vol 84. Basel: Karger 2004.
- <sup>6</sup> Linneberg A, Gislum M, Johansen N, Husemoen LN, Jorgensen T. Temporal trends of aeroallergen sensitization over twenty-five years. *Clin Exp Allergy* 2007;37:1137-42.
- <sup>7</sup> Platts-Mills TAE. Asthma severity and prevalence: an ongoing interaction between exposure, hygiene and life style. *PLoS Med* 2005;2e34.
- <sup>8</sup> Bonet M. II Encuesta Nacional de Factores de Riesgo y Enfermedades no Trasmisibles, Cuba, 2001. (Comunicación personal: Mariano Bonet, Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología, MINSAP, 2008).
- <sup>9</sup> Fabr  D, Varona P, Suárez R. Prevalencia de asma en adolescentes cubanos por diferentes criterios. *Rev Alergia México* 2005;52(3):132-7.
- <sup>10</sup> Anuario Estadístico de Salud de Cuba (2006) Cuadro 69. Prevalencia en pacientes dispensarizados por algunas enfermedades según grupos de edad y sexo. 2006 (disponible en [www.infomed.sld.cu](http://www.infomed.sld.cu)).
- <sup>11</sup> Informe Anual de la Dirección Nacional de Estadística. MINSAP, Cuba, 2001.
- <sup>12</sup> Anuario Estadístico de Salud de Cuba (2000). Primeros 40 padecimientos referidos por la población. Distribución porcentual. 1998-1999 Fuente: Encuesta Nacional de Uso y Satisfacción con los Servicios de Salud 1999 (disponible en [www.infomed.sld.cu](http://www.infomed.sld.cu))
- <sup>13</sup> Neffen HE. Asthma prevalence and risk factors in Latin America. *Current Allergy Clin Immunol* 2007;20(1):8-10.
- <sup>14</sup> Batista R. Comportamiento del Asma Bronquial en Cuba. Reporte Técnico de Vigilancia Vol. 1, No 3 Diciembre 1996. ISSN 1028-4338. Unidad de Análisis y Tendencias en Salud. MINSAP, Cuba.
- <sup>15</sup> Neffen HE, Baena CE, Asthma Mortality in Latin America. Proceedings of the XVIth World Congress of Asthma. Buenos Aires, p231,1999.
- <sup>16</sup> Anuario Estadístico de Salud en Cuba (2007). Tasas de mortalidad ajustadas según causas seleccionadas y estratos 2007 (disponible en [www.infomed.sld.cu](http://www.infomed.sld.cu)).
- <sup>17</sup> Bateman ED. The economic burden of uncontrolled asthma across Europe and Asia Pacific region: can we afford to not control asthma? *Eur Respir Rev* 2006;98:10-6.

- 
- <sup>18</sup> Accodini S, Corsico A, Cervera I, Gislason D, Gulsvik A, Janson C et al. Therapy and Health Economics Working Group of the European Community Respiratory Health Survey II. The socio-economic burden of asthma is substantial in Europe. *Allergy* 2008;63:116-24.
- <sup>19</sup> Nicolaou N, Siddique N, Custovic A. Allergic disease in urban and rural populations: increasing prevalence with increasing urbanization. *Allergy* 2005;60:1357-60.
- <sup>20</sup> Douwes J, Pearce N. Asthma and the westernization 'package'. *Int J Epidemiol* 2002;31:1098-102.
- <sup>21</sup> Von Hertzen LC, Haahtela T. Asthma and atopy – the price of affluence? *Allergy* 2004;59:124-37.
- <sup>22</sup> Lau S, Illi S, Sommerfeld C, Niggemann B, Bergmann R, von Mutius E, Wahn U. Early exposure to house dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study. Multicentre Allergy Study Group. *Lancet* 2000;356:1392-97.
- <sup>23</sup> Linneberg A. Are we getting enough allergens? *Int Arch Allergy Immunol* 2008;147:93-100.
- <sup>24</sup> Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;299:1259–60.
- <sup>25</sup> Ponsonby AL, Kemp A. Investigation of the hygiene hypothesis: current issues and future directions. *Allergy* 2008;63:506–8.
- <sup>26</sup> Rook GAW, Brunet LR. Old friends for breakfast. *Clin Exp Allergy* 2005;35:841–2
- <sup>27</sup> Vercelli D. Mechanisms of the hygiene hypothesis — molecular and otherwise. *Current Opinion in Immunology* 2006;18:733–7.
- <sup>28</sup> Mari A. When does a protein become an allergen? Searching for a dynamic definition based on most advanced technology tools. *Clinical and Experimental Allergy* 2008, 38, 1089–94.
- <sup>29</sup> Radauer C, Bublin M, Wagner S, Mari A, Breiteneder H. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:847-52.
- <sup>30</sup> Allergen nomenclature. WHO/IUS Allergen Nomenclature Subcommittee World Health Organization, Geneva. Switzerland. *Clin Exp Allergy* 1995;25:27-37.
- <sup>31</sup> Kern RA. Dust sensitization in bronchial asthma. *Med Clin North Am* 1921;5:751.
- <sup>32</sup> Voorhorst R, Spijkma-Boezeman MIA, Spijkma FTM. Is a mite the producer of house dust allergen? *Allergie Asthma* 1964;10:329-34.
- <sup>33</sup> Edwin EA, Ronmark E, Wickens K, Perzanowski M, Barry D, Lundback B, Crane J, Platts-Mills TAE. Contribution of dust mite and cat specific IgE to total IgE: Relevance to asthma prevalence. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:359-65.
- <sup>34</sup> Platts-Mills TAE. The role of Indoor Allergens in chronic allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:297-302.
- <sup>35</sup> Cuervo N, Dusbabek F, de la Cruz, J, Abreu R. Los ácaros de los polvos domésticos en Cuba. *Rev Cub Med Trop* 1983;35:83-103.
- <sup>36</sup> Fernández-Caldas E. Mite fauna, Der p 1, Der f 1, and *Blomia tropicalis* allergens levels in the tropical environment. *Clin Exp Allergy* 1993;23:292-7.
- <sup>37</sup> Fernandez-Caldas E, Fox R, Bucholtz G, et al. House dust mite allergy in Florida. Mite survey in households of mite sensitive individuals in Tampa, Florida. *Allergy Proc* 1990;11:263–7.

- 
- <sup>38</sup> Fernandez-Caldas E, Lockey RF. *Blomia tropicalis*, a mite whose time has come. *Allergy* 2004;59(11):1161-4.
- <sup>39</sup> Platts-Mills TA, Vervloet D, Thomas WR, et al. Indoor allergens and asthma: Report of the Third International Workshop. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:S2–S24.
- <sup>40</sup> Caraballo L, Puerta L, Martínez B, Moreno L. Identification of allergens from the mite *Blomia tropicalis*. *Clin Exp Allergy* 1993;24:1050-60.
- <sup>41</sup> Baldo BA, Ford SA, Tovey ER. Toward a definition of the complete spectrum and rank order of importance of allergens from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Adv Biosci* 1989;74:13–31.
- <sup>42</sup> Kawamoto S, Aki T, Yamashita M, Tategaki A, Fujimuri T, Tsuboi S, Katsutani T, Suzuki O, Shigeta A, Murooka Y, Ono K. Toward elucidating the full spectrum of Mite Allergens – State of the art. *J Biosci Bioeng* 2002;94(4):285-98.
- <sup>43</sup> Bergston A, Karlson A, Rolfsen W, Einarsson R. Detection of allergens in mould and mite preparations by a nitrocellulose electroblotting technique. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1986;80:383-90.
- <sup>44</sup> Fernandez-Caldas E, Puerta L, Caraballo L, Lockey RF. Mite Allergens. En Lockey R (ed). *Allergens and Allergen Immunotherapy*. 4th Edition. Informa HealthCare USA, New York, 2008.
- <sup>45</sup> Chapman MD, Platts-Mills TAE. Purification and characterization of the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*-antigen P1. *J Immunol* 1980;125:587–92.
- <sup>46</sup> Tovey ER, Chapman MD, Platts-Mills TAE. Mite feces are a major source of house dust allergens. *Nature* 1982;289:592–93.
- <sup>47</sup> Yaseuda H, Mia H, Yui Y, Shida T: Comparative analysis of physicochemical and immunochemical properties of the two major allergens from the *Dermatophagoides pteronyssinus* and the corresponding allergens from *Dermatophagoides farinae*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989;88:402–7.
- <sup>48</sup> Halleux S, Stura E, van der Elst L, Carlier V, Jacquemin M, Saint-Remy JM. Three-dimensional structure and IgE-binding properties of mature fully active Der p 1, a clinically relevant major allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:571-5.
- <sup>49</sup> Takai T, Kato T, Yasueda H, Okumura K, Ogawa H. Analysis of the structure and allergenicity of recombinant pro- and mature Der p 1 and Der f 1: major conformational IgE epitopes blocked by prodomains. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:555-63.
- <sup>50</sup> Zhang J, Hamilton JM, Garrod DR, et al. Interactions between mature Der p 1 and its free prodomain indicate membership of a new family of C1 peptidases *Allergy* 2007;62:1302–9.
- <sup>51</sup> Hewitt CRA, Brown AP, Hart BJ, et al. A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively clearing CD23: innate protection by antiproteases. *J Exp Med* 1995;182:1537–44.
- <sup>52</sup> Gough L, Sewell HF, Shakib F. The proteolytic activity of the major dust mite allergen Der p 1 enhances the IgE antibody response to a bystander antigen. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1594-8.
- <sup>53</sup> Ghaemmaghami AM, Robins A, Gough L, et al. Human T cell subset commitment

---

determined by the intrinsic property of antigen: the proteolytic activity of the major mite allergen Der p 1 conditions T cells to produce more IL-4 and less IFN-gamma. Eur J Immunol 2001;31:1211–6.

- <sup>54</sup> Esch R. Role of Protease on the Stability of Allergenic Extracts. Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-Jena-New York, 171-9,1991.
- <sup>55</sup> Grier TJ, LeFevre DM, Duncan EA, Esch RE. Stability of standardized grass, dust mite, cat, and short ragweed allergens after mixing with mold or cockroach extracts Ann Allergy Asthma Immunol. 2007;99(2):151-60.
- <sup>56</sup> Wahn U, Lau S, Bergmann R, et al: Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitisation during the first three years of life. J Allergy Clin Immunol 1997;99:763–9.
- <sup>57</sup> Lind P: Purification and partial characterization of two major allergens from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. J Allergy Clin Immunol 1985;76:753–61.
- <sup>58</sup> Van der Zee JS, van Swieten P, Jansen HM, Aalberse RC: Skin tests and histamine release with P1-depleted *Dermatophagoides pteronyssinus* body extracts and purified P1. J Allergy Clin Immunol 1988;81:884–95.
- <sup>59</sup> Suzuki M, Tanka Y, Korematsu S, Mikami B, Minato N. Crystal structure and some properties of a major house dust mite allergen Der f 2. Biochem Biophys Res Com 2006;339:679-86.
- <sup>60</sup> Chua KY, Doyle CR, Simpson RJ, et al. Isolation of cDNA coding for the major mite allergen Der p 2 by IgE plaque immunoassay. Int Arch Allergy Appl Immunol 1990;91:118–23.
- <sup>61</sup> Hales BJ, Martin AC, Pierce LJ, Laing IA, Hayden CM, Goldblat J, Le Souef PN, Thomas WR. IgE and IgG anti-house dust mite specificities in allergic disease. J Allergy Clin Immunol 2006;118:361-7.
- <sup>62</sup> O'Brien RM, Thomas WR: Immune reactivity to Der p I and Der p II in house dust mite-sensitive patients attending paediatric and adult allergy clinics. Clin Exp Allergy 1994;24:737–42.
- <sup>63</sup> Epton MJ, Hales BJ, Thompson PJ, Thomas WR: T-cell cytokine responses to outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae* and the house dust mite allergens Der p 1 in allergic and non-allergic subjects. Clin Exp Allergy 2002;32(11):1589-95.
- <sup>64</sup> Caraballo L, Mercado D, Jimenez S, et al. Analysis of the cross-reactivity between BtM and Der p 5, two group 5 recombinant allergens from *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. Int Arch Allergy Immunol 1998;117(1):38–45.
- <sup>65</sup> Mora C, Flores I, Montealegre F, et al. Cloning and expression of Blo t 1, a novel allergen from the dust mite *Blomia tropicalis*, homologous to cysteine proteases. Clin Exp Allergy 2003;33(1):28–34.
- <sup>66</sup> Arruda K, Vailes LD, Platts-Mills AE, et al. Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. Am J Respir Crit Care Med 1997;155:343–50.
- <sup>67</sup> Tsai JJ, Yi FC, Chua KY, Liu YH, Lee BW, Cheong N. Identification of the major allergenic components in *Blomia tropicalis* and the relevance of the specific IgE in asthmatic patients. Ann Allergy Asthma Immunol. 2003;91(5):485-9.
- <sup>68</sup> Jimenez S, Puerta L, Mendoza D, et al. IgE antibody responses to recombinant allergens of *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* in a tropical environment. Allergy

---

Clin Immunol Int 2007;19(6):1–6.

- <sup>69</sup> Li CS, Hsu CW, Chua KY, Hsieh KH, Lin RH: Environmental distribution of house dust mite allergen Der p 5. J Allergy Clin Immunol 1996;97:857–9.
- <sup>70</sup> Yi FC, Chua KY, Cheong N, Shek LP, Lee BW. Immunoglobulin E reactivity of native Blo t 5, a major allergen of *Blomia tropicalis*. Clin Exp Allergy. 2004;34(11):1762-7.
- <sup>71</sup> Weghofer M, Grote M, Dall'Antonia Y, Fernández-Caldas E, Krauth MT, Van Hage M, Horak F, Thomas WR, Valent O, Keller W, Valenta R, Vrtala S. Characterization of folded recombinant Der p 5, a potential diagnostic marker allergen for House Dust Mite allergy. Int Arch Allergy Immunol 2008;147:101-9.
- <sup>72</sup> Yun Feng G, De Yun W, Tan Ching O, et al. Identification and characterization of a novel allergen from *Blomia tropicalis*: Blo t 21. J Allergy Clin Immunol 2007;120:105–12.
- <sup>73</sup> Caraballo L, Puerta L, Jimenez S, Martinez B, Mercado D, Avjioglu A, Marsh D. Cloning and IgE binding of a recombinant allergen from the mite *Blomia tropicalis*, homologous with fatty acid-binding proteins. Int Arch Allergy Immunol. 1997;112(4):341-7.
- <sup>74</sup> Puerta L, Caraballo L, Fernández-Caldas E, Avjioglu A, Marsh DG, Lockey RF, Dao ML. Nucleotide sequence analysis of a complementary DNA coding for a *Blomia tropicalis* allergen. J Allergy Clin Immunol. 1996;98(5 Pt 1):932-7.
- <sup>75</sup> Cheong N, Yang L, Lee BW, Chua KY. Cloning of a group 3 allergen from *Blomia tropicalis* mites. Allergy. 2003 Apr;58(4):352-6.
- <sup>76</sup> Ferrándiz R, Casas R, Dreborg S. Sensitisation to *Dermatophagoides siboney*, *Blomia tropicalis*, and other domestic mites in asthmatic patients. Allergy, 1996;51:501-5.
- <sup>77</sup> Martínez N, Aranda RE, Casas R, Garriga S, Labrada A. Epidemiological Study of sensitization to common inhalant allergens in Cuba. Allergy Clin Immunology Int 1997;Suppl 4:148.
- <sup>78</sup> Ferrándiz R, Casas R, Dreborg S, Einarsson R, Bonachea I, Chapman M. Characterization of allergenic components from house dust mite *Dermatophagoides siboney*. Purification of Der s 1 and Der s 2 allergens, Clinical and Experimental Allergy 1995;25:922-8.
- <sup>79</sup> Ferrándiz R, Casas R, Dreborg S. Crossreactivity between *Dermatophagoides siboney* and other Domestic Mites. II. Analysis of Individual Crossreacting Allergens after SDS-PAGE and Western Blotting Inhibition. Int Arch Allergy Immunol 1998;116:206-14.
- <sup>80</sup> Ferrándiz R, Casas R, Dreborg S. Purification and IgE binding capacity of Der s 3, a major allergen from *Dermatophagoides siboney*. Clin Exp Allergy 1997;27:700-4.
- <sup>81</sup> Sewer M, Uyema K, Labrada M, Coca MA, González M. Monoclonal Antibodies against Der s 1, a Major Allergen of *Dermatophagoides siboney*. Int Arch Allergy Immunol 2000;123:242–8.
- <sup>82</sup> Labrada M, Uyema K, Sewer M, Labrada A, González M, Caraballo L, Puerta L. Monoclonal Antibodies against Blo t 13, a Recombinant Allergen from *Blomia tropicalis*. Int Arch Allergy Immunol 2002;129:212–8.
- <sup>83</sup> Puerta L, Labrada A, Labrada M, Uyema K, Jiménez S, Caraballo L. Blo t 13 Allergen from *Blomia tropicalis* shows high frequency of IgE binding in allergic Cuban patients and cross-reactivity with *Dermatophagoides siboney* extract, J Allergy Clin Immunol 2003;111(2):10.



- 
- <sup>84</sup> Haahtela T. Skin test used for epidemiological studies. Position paper: Allergen standardisation and skin testing. The European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* 1993;48(14):76-80.
- <sup>85</sup> Dreborg S. Skin testing. The safety of skin tests and the information obtained from using different methods and concentrations of allergen. *Allergy* 1993;48:473-5.
- <sup>86</sup> Niemeijer NR, Fluks AF, De Monchy JGR. Optimisation of skin testing II. Evaluation of concentration and cut-off values, as compared with RAST and clinical history, in a multicenter study. *Allergy* 1993;48:498–503.
- <sup>87</sup> Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 1911;1:1572.
- <sup>88</sup> Voorhorst R, van der Hooft-van Asbeck MC, van Krieken H, Nikkels AH. Atopic skin test re-evaluated. V. The wheal-flare ratio of skin reactions to extracts of grass pollen, *Dermatophagoides pteronyssinus* and to histamine and compound 48/80. *Ann Allergy*. 1979;42(3):183-4.
- <sup>89</sup> Bousquet J; Lockey R; Malling HJ. WHO position paper Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102 (4 Pt 1):558-62.
- <sup>90</sup> Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Allergen immunotherapy for asthma (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, Issue 3, 2003, Oxford: Update Software.
- <sup>91</sup> Durham SR, Walker SM, Varga EM, Jacobson MR, O'Brien F, Noble W, Till SJ, Hamid Q and Nouri-Aria K. Long term clinical efficacy of grass pollen immunotherapy. *New Engl J Med* 1999; 341:468-75.
- <sup>92</sup> Passalacqua G, Canonica GW. Long-lasting clinical efficacy of allergen specific immunotherapy. *Allergy* 2002;57(4):275-6.
- <sup>93</sup> Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(5 Suppl):S147-334.
- <sup>94</sup> Möller C, Dreborg S, Ferdousi HA, Halken S, Høst A, Jacobsen L, Koivikko A, Koller DY, Niggemann B, Norberg LA, Urbanek R, Valovirta E, Wahn U. Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study). *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:251-6.
- <sup>95</sup> Des Roches A, Paradis L, Menardo JL, Bouges S, Daures JP and Bousquet J. Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99 (4):450-3.
- <sup>96</sup> Pajno GB, Barberio G, De Luca F, Morabito L and Parmiani S. Prevention of new sensitizations in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy: A six-year follow-up study. *Clin Exp Allergy* 2001;31(9):1392-97.
- <sup>97</sup> Purello-D'Ambrosio F, Gangemi S, Merendino RA, Isola S, Purcinelli P, Parmiciani S et al. Prevention of new sensitizations in monosensitized subjects submitted to specific immunotherapy or nor. A retrospective study. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1295–1302.
- <sup>98</sup> Van Ree R. Indoor allergens: Relevance of major allergen measurements and standardization. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:270-7.
- <sup>99</sup> Canonica GW, Baena-Cagnani CE, Bousquet J, Bousquet PJ, Lockey RF, Malling HJ,

- 
- Passalacqua G, Potter P, Valovirta E. Recommendations for standardization of clinical trials with Allergen Specific Immunotherapy for respiratory allergy. A statement of a World Allergy Organization (WAO) taskforce. *Allergy* 2007;62: 317-24.
- <sup>100</sup> Pajno GB. Sublingual immunotherapy: The optimism and the issues. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:796-801.
- <sup>101</sup> Nelson HS. Immunotherapy: Where is it now?. *J Clin Immunol* 2007;119:769-7.
- <sup>102</sup> Gastaminza G, Algorta J, Udicana M, Etxenagusia M, Fernández E et al. Systemic reactions to immunotherapy: influence of composition and manufacturer. *Clin Exp Allergy* 2003;33(4):470-8.
- <sup>103</sup> Lin MS, Tanner E, Lynn J, Friday GA. Nonfatal systemic reactions induced by skin testing and immunotherapy. *Ann Allergy* 1993;71:557-62.
- <sup>104</sup> Malling HJ. Minimizing the risk of allergen-specific immunotherapy. *Drug Safety* 2000;23:323-32.
- <sup>105</sup> Ragusa FV, Pasalacqua G, Gambardella R et al. Nonfatal systemic reactions so subcutaneous immunotherapy: a 10-year experience. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1997;7:151-4.
- <sup>106</sup> Tinkelman DG, Cole WQ, Tunno J. Immunotherapy: a one year prospective study to evaluate risk factors of systemic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:8-14.
- <sup>107</sup> Luigi AA, Senna G, Mezzelani P, Pappalardo G. Safety of Specific Immunotherapy: a retrospective study. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1994;4:250-4.
- <sup>108</sup> Vervloet D, Khairallah E, Arnaud A, Charpin J. A prospective national study of the safety of immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1980;10:59-64.
- <sup>109</sup> Stewart GE, Lockey RF. Systemic reactions from allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:567-78.
- <sup>110</sup> Lockey RF, Nikoara Kasti GL, Theodoropoulos DS, Bukantz SC. Systemic reactions and fatalities associated with allergen immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunology*, 2001;121:229-34.
- <sup>111</sup> Greenberg MA, Kaurman CR, González GE, Rosenblatt CD, Smith LJ, Summers RJ, Late and immediate systemic-allergic reactions to inhalant allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1986;77:865-70.
- <sup>112</sup> Reid MJ, Lockey RF, Turkeltaub PC and Platts-Mills TAE. Survey of fatalities from skin testing and immunotherapy 1985-1998. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:6-15.
- <sup>113</sup> Akdis M, Schmidt-Weber C, Jutel M, Akdis C, Blaser K. Mechanisms of allergen immunotherapy. *Allergy Clin Immunol Int* 2004;16:65-9.
- <sup>114</sup> Norman PS. Immunotherapy: 1999-2004. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:1013-23.
- <sup>115</sup> Larche M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006;6:761-71.
- <sup>116</sup> Aalberse RC, Scurman J. IgG4 breaking the rules. *Immunol* 2002;105:9-19.
- <sup>117</sup> Garcia BE, Sanz ML, Gato JJ, Fernandez J, Oehling A. IgG4 blocking effect on the release of antigen-specific histamine. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1993;3:26-33.
- <sup>118</sup> van Neerven RJ, Wikborg T, Lund G, Jacobsen B, Brinch-Nielsen A, Arned J, et al.

- 
- Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation. *J Immunol* 1999;163:2944-52.
- <sup>119</sup> Wachholz PA, Soni NK, Till SJ, Durham SR. Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:915-22.
- <sup>120</sup> Aas K, Backman A, Belin L, Weeke B. Standardization of allergen extracts with appropriate methods. The combined use of skin prick testing and radio-allergosorbent test. *Allergy* 1978;33:130-7.
- <sup>121</sup> Dreborg S. Standardisation of allergenic preparations by *in vitro* and *in vivo* methods. Position paper: Allergen standardisation and skin testing. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy*, 1993;48(14):63–70.
- <sup>122</sup> Becker WM, Vogel L, Vieths S. Standardization of allergen extracts for immunotherapy: where do we stand? *Curr Op Allergy Clin Immunol* 2006; 6:470–5.
- <sup>123</sup> Baer H, Godfrey H, Maloney CJ, et al. The potency and antigen E content of commercially prepared ragweed extracts. *J Allergy* 1970;45(6):347-54.
- <sup>124</sup> Slater JE. Standardized Allergen Vaccines in the United States. En Lockey R (ed) *Allergen and Allergen Immunotherapy*. 4<sup>th</sup> Edition. Informa Healthcare USA, New York, 2008.
- <sup>125</sup> Hakkaart Gaj, Aalberse RC, van Ree R. Lack of lysozyme activity of natural and yeast-derived recombinant Der p 2. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;114:202-4.
- <sup>126</sup> van Ree R, Chapman MD, Ferreira F, Vieths S, Bryan D, et al. The CREATE Project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification, *Allergy* 2008;63:310–26.
- <sup>127</sup> Registration of allergen preparations. Nordic Guidelines. 2nd edition. Nordic Council on Medicines. Uppsala, Sweden, 1989.
- <sup>128</sup> Larenas-Linnemann D, Cox LS. European allergen extract units and potency: review of available information. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008;100:137–45.
- <sup>129</sup> Turkeltaub PC. Allergen vaccine unitage based on biological standardization: Clinical significance. En: Lockey R, Bukantz SC (eds). *Allergens and Allergen Immunotherapy*. 3<sup>rd</sup> Edition. Marcel Dekker Inc., New York, 321–40, 1999.
- <sup>130</sup> Bengtsson A, Rolfsen W, Einarsson. Characterization of allergens and patient sera by a nitrocellulose immunoprint technique. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985;78:139-44.
- <sup>131</sup> Note for Guidance on Allergen Products (CPMP/BWP/243/96). EMEA 1996.
- <sup>132</sup> European Pharmacopeia, monograph 1063, Allergen Products. 3rd Edition 1997.
- <sup>133</sup> EMEA/CHMP/BWP/304831/2007. Guideline on allergen products: Production and quality issues (Draft), 2007.
- <sup>134</sup> 21 CFR PART 680--Additional Standards for Miscellaneous Products. § 680.1 Allergenic Products. USA, 1973.
- <sup>135</sup> Guidance: On the content and format of Chemistry, Manufacturing and Controls Information and Establishment description information for an allergenic extract. CBER, FDA, 1999. Disponible en <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.
- <sup>136</sup> Reg. 30–2002 Requisitos para las solicitudes de inscripción en el registro de medicamentos de uso humano de productos alérgicos. CECMED, Cuba, 2002. Disponible en:

---

<http://www.cecmmed.sld.cu>

- <sup>137</sup> Cartaya J, Orta SD, Rodríguez J, Torres O, Labrada A. Amparo normativo para las vacunas terapéuticas en Cuba. Evaluación del desarrollo clínico-farmacológico en los últimos 7 años. Anuario Científico CECMED 2005;2:43-56.
- <sup>138</sup> Methods of the allergenic products testing laboratory; CBER/FDA. Fed Reg 1994; 59 (no. 225); 60362-3, USA. Disponible en <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.
- <sup>139</sup> Finney DJ. Statistical Methods in biological assay. 3<sup>rd</sup> Ed. Griffin, London, 1978.
- <sup>140</sup> Turkeltaub PC. Standardization of allergenic extracts based on parallel line bioassay intradermal test methods. En: Dieges PH, De Monchy JGR, (eds). Skin Test and RAST inhibition procedures in the standardization of allergenic extracts. University Hospital Dijkzigt, Rotterdam, 35-62, 1987.
- <sup>141</sup> Pérez A, Guerra E, Labrada A. Automatización del análisis de los resultados del ELISA. Biotecnología Aplicada 1999;16:31-6.
- <sup>142</sup> Laemmli, UK. Cleavage of structural protein S during the assembly of head of bacteriophage T 4. Nature 1970;227:680.
- <sup>143</sup> Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology. CPMP/ICH/281/95). EMEA, 1996
- <sup>144</sup> Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Anal Biochem 1977;83(2):346-56.
- <sup>145</sup> Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-Labeled antibody: a new method of conjugation. J Histochem Cytochem 1974;22(12):1084-91.
- <sup>146</sup> Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology. (CPMP/ICH/281/95). EMEA, 1996.
- <sup>147</sup> Theis RC, Benedict SR. The determination of Phenol in the blood. J Biol Chem 1924, 61(1):67-71.
- <sup>148</sup> Fernández B, Labrada A, Facenda E. Medio y método de cultivo de ácaros del polvo doméstico para la fabricación de vacunas de alérgenos y productos obtenidos mediante los mismos. Certificado de Autor de Invención No. 22 803, OCPI, Cuba, 2002.
- <sup>149</sup> Colloff, MJ, Spieksma F. Pictorial keys for the identification of domestic mites. Clin Exp Allergy, 1992; 22:823-30.
- <sup>150</sup> ISO 9001:2000. Norma Internacional. Sistema de gestión de la calidad. Ginebra, Suiza, 2000.
- <sup>151</sup> Guidance for industry: Testing limits in stability protocols for standardized grass pollen extracts. CBER/FDA, USA, 2000. Disponible en <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.
- <sup>152</sup> Malling HJ. Methods of skin testing. Position paper: Allergen standardisation and skin testing. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Allergy 1993;48(14 Suppl);55-6.
- <sup>153</sup> Galen RS and Gambino SR. Beyond normality: The predictive value and efficiency of medical diagnoses. John Wiley & Sons, New York, 1975.
- <sup>154</sup> Registro Público Cubano de Ensayos Clínicos. Centro Nacional Coordinador de Ensayos Clínicos (CENCEC), MINSAP, Cuba, 2007. Disponible en <http://registroclinico.sld.cu>.

- 
- <sup>155</sup> Bousquet J, Michel FB. International consensus report on diagnosis and management of asthma. *Allergy* 2007; 47(2):129–32.
- <sup>156</sup> Dreborg S. Skin testing. The safety of skin tests and the information obtained from using different methods and concentrations of allergen. *Allergy* 1993;48:473–5.
- <sup>157</sup> Libowitz MJ. The use of peak expiratory flow rate measurements in respiratory diseases. *Ped. Pneumol* 1991;11:166-74.
- <sup>158</sup> Quackenboss JJ, Libowitz MJ and Kryzanowsky M. The normal range of diurnal changes in peak expiratory flow rates. Relationship to symptoms and respiratory diseases. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:323-30.
- <sup>159</sup> Higgins JPT, Green S (eds). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions v4.2.6* [updated Sept 2006]. Disponible en: <http://www.cochrane.org/resources/>.
- <sup>160</sup> Puerta L., Fernández-Caldas E., Caraballo L.R, Lockey R.F. Sensitization to *Blomia tropicalis* and *Lepidoglyphus destructor* in *Dermatophagoides spp*- allergic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:943-50.
- <sup>161</sup> Thomas WR, Smith WA, Hales BJ, Mills KL, O'Brien RM. Characterization and immunobiology of House Dust Mite Allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129:1-18.
- <sup>162</sup> Heymann PW, Chapman MD, Platts-Mills TAE. Antigen Der f 1 from the house dust mite *Dermatophagoides farinae*. *J Immunol* 1986;137:2841-7.
- <sup>163</sup> Weghofer M, Thomas WR, Pittner G, Horak F, Valenta R, Vrtala S. Comparison of purified *Dermatophagoides pteronyssinus* allergens and extract by two-dimensional immunoblotting and quantitative IgE inhibitions. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1384-91.
- <sup>164</sup> ICH Guideline Q6B: Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. 1999. Disponible en <http://www.ich.org>.
- <sup>165</sup> Esch R. Evaluation of allergen vaccine potency. *Curr Allergy Asthma Reports* 2006;6:402–6.
- <sup>166</sup> Casas R, Ferrandiz R, Wihl JA, Fernandez B, Dreborg S. Biologic activity of *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis* allergens in exposed and unexposed mite-allergic individuals: effect of patient selection on the biologic standardization of mite extracts. *Allergy* 1999;54:392–6.
- <sup>167</sup> Dreborg S. Precision of biological standardization of allergenic preparations. *Allergy* 1992;47:291-4.
- <sup>168</sup> Dreborg S, Einarsson R. The major allergen content of allergenic preparations reflects their biological activity. *Allergy* 1992;47:418-23.
- <sup>169</sup> Grier TJ, Hazelhurst DM, Duncan EA, West TK, Esch RE. Major Allergen measurements: Sources of variability, validation, quality assurance, and utility for laboratories, manufacturers, and clinics. *Allergy Asthma Proc* 2002;23:125–31.
- <sup>170</sup> Chew FT, Yi PC, Chua KY, Fernández-Caldas E, Arruda LK, Chapman MD et al. Allergenic differences between the domestic mites *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* 1999;29:982-8.
- <sup>171</sup> Van Strik R. Statistical evaluation of skin test results for the standardization of allergens. En skin test and RAST inhibition procedures in the standardization of allergen extracts. Diegues PH and de Monchy JGR (eds). University Hospital Dijkzigt, Rotterdam, 12-

---

23,1985.

- <sup>172</sup> Maasch MJ, Wahl R, Fuchs T. Application of the First International Standard of *Dermatophagoides pteronyssinus* in the evaluation of two different allergen extracts produced from different source materials. *Int Arch Allergy Appl Immun* 1987;84:363-72.
- <sup>173</sup> Ramos JDA, Cheong N, Teo, ASM, Kuo IC, Lee BW, Chua KY. Production of monoclonal antibodies for immunoaffinity purification and quantitation of Blo t 1 allergen in mite and dust extracts. *Clin Exp Allergy* 2004;34:604-10.
- <sup>174</sup> Aalberse RC, van Ree R. Monoclonals antibody assays for allergens: pick your antibodies with care! *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:583-6.
- <sup>175</sup> Becker WM, van Ree R, Fiebig H, Cromwell O, Bernhard W, et al. Validation of quantitative, allergen-specific ELISAs. En *Regulatory Control and Standardization of Allergenic Extracts. 11<sup>th</sup> International Paul Ehrlich Seminar. Verlag Chmelorz, Wiesbaden, 91-7, 2006.*
- <sup>176</sup> Regulación no. 21-2000. Requisitos para la solicitud de autorización y modificación de ensayos clínicos. CECMED, MINSAP, Cuba, 2000. Disponible en <http://www.cecmecmed.sld.cu>.
- <sup>177</sup> Miyamoto T, Oshima S, Ishizaki T, Sato SH. Allergenic identity between the common floor mite (*Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961) and house dust as a causative antigen in bronchial asthma. *J Allergy* 1968;42(1):14-28.
- <sup>178</sup> Spieksma FTM. The house-dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* producer of the house-dust allergen. Ph.D. Thesis, University of Lieden, Netherlands, 1967.
- <sup>179</sup> Sasa M, Miyamoto J, Shinoara S, Suzuki H, Katsuhata A. Studies on Mass Culture and Isolation of *D. farinae* and some other mites associated with House Dust and stored food. *Jpn J Exp Med.* 1970;40(5):367-82.
- <sup>180</sup> Miyamoto J, Ishii A, Sasa M. A successful method for mass culture of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Troussart, 1897). *Jpn J Exp Med* 1975;45(2):133-8.
- <sup>181</sup> Larsen JN, Houghton CG, Lombardero M, Lowenstein H. Manufacturing and standardizing allergen extracts in Europe. En Lockey R (ed). *Allergens and Allergen Immunotherapy. 4th Edition. Informa Healthcare USA, New York, 2008.*
- <sup>182</sup> Infante L, Labrada A, Facenda E, Castro RL, Fernandez B, Luis B. Contamination with mite allergens in the domestic environment of allergic children. (Abstract). 6th Latin-American Congress of Immunology. Havana, 2002. Proceedings CD-ROM. Elfos Scientiae, Havana, 2002.
- <sup>183</sup> Slater J, Pastor RW. The determination of equivalent doses of standardized allergen vaccines. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:468-74.
- <sup>184</sup> Nelson HS, Iklé D, Buchmeier A. Studies of allergen extract stability: the effects of dilution and mixing. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98(2):382-8.
- <sup>185</sup> Bousquet J, Djoukadar F, Hewitt B, Guerin B, Michel FB. Comparison of the stability of a mite and a pollen extract stored in normal conditions of use. *Clin Allergy* 1985;15(1):29-35.
- <sup>186</sup> Soldatova LN, Paupore EJ, Burk SH, Pastor RW, Slater JE. The stability of house dust mite allergens in glycerinated extracts. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105(3):482-8.
- <sup>187</sup> Liu T, Lin Y. The epitope stability of group 1 and group 2 allergens in mite extracts. *Ann*

- 
- Allergy Asthma Immunol 1998;80(2):177-83.
- <sup>188</sup> Niemeijer NR, Kauffman HF, van Hove W, Dubois AE, de Monchy JG. Effect of dilution, temperature, and preservatives on the long-term stability of standardized inhalant allergen extracts. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996;76(6):535-40.
- <sup>189</sup> Hewitt CRA, Horton H, Jones RM, Pritchard DI. Heterogeneous proteolytic specificity and activity of the house dust proteinase allergen Der p1. *Clin Exp Allergy* 1997;27:201-7.
- <sup>190</sup> Frost AA, Pearson RG. Kinetics and Mechanisms. A Study of Homogenous Chemical Reactions. Ed. Revolucionaria. Instituto del Libro, La Habana, p43,1968.
- <sup>191</sup> Niemeijer NR, Meijer G, Kauffman HF, De Monchy JG. Determination of the stability of diluted allergen extracts using a concentration step prior to EAST inhibition. *Clin Exp Allergy* 1996;26(8):953-6.
- <sup>192</sup> Pérez M, Labrada A, Facenda E. Análisis de la actividad enzimática de proteínas alergénicas de ácaros del polvo doméstico. *Revista CENIC: Ciencias Biológicas* 2008, en prensa.
- <sup>193</sup> Note for Guidance on Preclinical Pharmacological and Toxicological Testing of Vaccines (CPMP 465/95). EMEA, 1995.
- <sup>194</sup> Li JT. Allergy Testing *Am Fam Physician* 2002;66:621-6.
- <sup>195</sup> Pastorello E A. Skin tests for diagnosis of IgE-mediated allergy. Position paper: Allergen standardisation and skin testing. The European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* 1993; 48(14 Suppl):57-62.
- <sup>196</sup> Dreborg S (ed). The skin prick test. Methodological studies and clinical applications. Linköping: Linköping University Medical Dissertation No. 239, 1987:133-58.
- <sup>197</sup> Choi IS, Koh YI, Koh JS, Lee MG. Sensitivity of the skin prick test and specificity of the serum-specific IgE test for airway responsiveness to house dust mites in asthma. *J Asthma* 2005;42(3):197-202.
- <sup>198</sup> Vives R, Rodríguez J, Daroca P, Canto G, Bensabat Z, Reaño M. Correlation between skin-testing, specific serum IgE, and bronchial allergen challenge in perennial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997;140:32-4.
- <sup>199</sup> Rodríguez O, Benítez M, Labrada A, Jove V. Ensayo clínico diagnóstico con extracto alergénico de *Blomia tropicalis* en adultos alérgicos y voluntarios sanos. *Revista Alergia México* 2000;47(2):57-9.
- <sup>200</sup> Rodríguez O y Labrada A. Ensayo clínico diagnóstico en niños con extracto alergénico de *Blomia tropicalis*. *Allergologia et Immunopathologia*. 2000;28(4):225-8.
- <sup>201</sup> Ulloa C, Sánchez A, Abdo A, Castro RL, Yrarragorri C. Respuesta cutánea inmediata con diversas diluciones de *Dermatophagoides siboney* *Alergia, Asma Immunol Ped* 2000 (México); 9(5):154-7.
- <sup>202</sup> Fuentes Y, Castro R, Rodríguez R, Martínez I, Labrada A. Eficiencia de dos pruebas diagnósticas en la determinación de alergia por ácaros en niños. *Vaccimonitor* 2008; 17(2)1-6.
- <sup>203</sup> Niemeijer NR, Goedewaagen B, Kauffman HF, De Monchy JGR. Optimisation of skin testing I. Choosing allergen concentration and cut-off values by factorial design. *Allergy*

---

1993;48:491–7.

- <sup>204</sup> Van Hage-Hamsten M. *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis* – dust mites of subtropical and tropical areas. *Clinical and Experimental Allergy*, 1995;25:905-7.
- <sup>205</sup> Santoso H. The value of a single skin prick testing for specific IgE *Dermatophagoides pteronyssinus* to distinguish atopy from non-atopic asthmatic children in the tropics. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 1998;16(2-3):69-74.
- <sup>206</sup> Castro RL, Mateo M, Naranjo RM, Navarro B, Álvarez M, Ronquillo M, García I, Oliva Y, González M, Rodríguez J and Labrada A. Correlation between skin tests to *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis* in Cuban asthmatics.. *Allergol et Immunopathol* 2006;34(1):23-6.
- <sup>207</sup> Castro RL, Primo SI, González M, Navarro B, Álvarez M, Irragarorri C, Ronquillo M, García I, Labrada A. Comparación de dos lancetas en la prueba por punción cutánea. *Rev Alergia Mexico* 2005;52(5):188-93.
- <sup>208</sup> Valyasevi MA, Maddox DE, Li JT. Systemic reactions to allergy skin tests. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;83:132-6.
- <sup>209</sup> Turkeltaub PC. Biological standardization of allergenic extracts. *Allergol Immunopatol* 1989;17: 53-65.
- <sup>210</sup> Malling HJ. Immunotherapy as an effective tool in allergy treatment. *Allergy* 1998; 53(5):461-72.
- <sup>211</sup> Wihl JÅ, Ipsen H, Petersen BN, Munch EP, Janniche H, Løwenstein H Immunotherapy with partially purified and standardized tree pollen extracts. II, Results of skin prick tests and nasal provocation tests from a three-year double-blind study of patients treated with pollen extracts either of birch or combinations of alder, birch and hazel. *Allergy* 1988;43:363-9.
- <sup>212</sup> Garcia-Ortega P, Merelo A, Marrugat J, Richart C. Decrease of skin and bronchial sensitization following short-intensive scheduled immunotherapy in mite-allergic asthma. *Chest* 1993;103:183-7.
- <sup>213</sup> Ameal A, Vega-Chicote JM, Fernandez S, Miranda A, Carmona MJ, Rondon MC, Reina E, Garcia-González JJ. Double-blind and placebo-controlled study to assess efficacy and safety of a modified allergen extract of *Dermatophagoides pteronyssinus* in allergic asthma. *Allergy* 2005; 60: 1178–83.
- <sup>214</sup> Varney VA, Taba K, Mavroleon G, Frew AJ. Usefulness of specific immunotherapy inpatients with severe perennial rhinitis induced by house dust mite: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Clin Exp Allergy* 2003;33:1076-82.
- <sup>215</sup> Ferrer A, Garcia-Selles J. Significant improvement in symptoms, skin test, and specific bronchial reactivity after 6 months of treatment with a depigmented, polymerized extract of *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae*. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2003;13(4):244-51.
- <sup>216</sup> Bordignon V, Parmiani S. Variation of the skin end-point in patients treated with sublingual specific immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2003;13(3):170-6.
- <sup>217</sup> Guerra F, Daza JC, Almeda E. Immunotherapy with a depigmented, polymerized vaccine of *Olea europaea* pollen allergens, significantly reduces specific bronchial and skin test



- 
- reactivity in sensitized patients after one year of treatment. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2003;13(2):108-17.
- <sup>218</sup> Lofqvist T, Agrell B, Dreborg S, Svenson G. Effect of immunotherapy with a purified, and standardized preparation of mite (*D. farinae*) in perennial allergic rhinitis. *Ann Allergy* 1987;55:314.
- <sup>219</sup> Mosbech H, Djurup R, Dreborg S, Poulsen LK, Stahl-Skov O, Steriger I. Hyposensitization in asthmatics with PEG-modified and unmodified house dust mite extract. III. Effect on mite specific immunological parameters and relation between the immunological changes and mite-sensitivity or clinical effect. *Allergy* 1990;45:130-41.
- <sup>220</sup> Tabar AI, Echechipia S, Gacría BE, Olaguibel JM, Lizaso MT, Gómez B, Aldunate MT, Martín S, Marcotegui F. Double-blind comparative study of cluster and conventional immunotherapy schedules with *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:109-18.
- <sup>221</sup> Haugaard L, Dahl R, Jacobsen L. A controlled dose-response study of immunotherapy with standardized, partially purified extract of house dust mite: clinical efficacy and side effects. *J Allergy Clin Immunol* 1993;91:702-22.
- <sup>222</sup> Olaguibel JM, Tabar AI, García Figueroa BE, Cortes C. Immunotherapy with standardized extract of *Dermatophagoides pteronyssinus* in bronchial asthma: a dose titration study. *Allergy* 1997;52:168-78.
- <sup>223</sup> Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:1025-34.
- <sup>224</sup> Piazza I, Bizarro N. Humoral response to subcutaneous, oral and nasal immunotherapy for allergic rhinitis due to *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Ann Allergy* 1993;71:461-9.
- <sup>225</sup> Djurup R, Østerballe O. IgG subclass antibody response in grass pollen allergic patients under-going specific immunotherapy. Prognostic value of serum IgG subclass antibody levels early in immunotherapy. *Allergy* 1984;39:433-41.
- <sup>226</sup> Gehlhar K, Schlaak M, Becker W, Bufe A. Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. *Clin Exp Allergy* 1999;29:497-506.
- <sup>227</sup> Keskin O, Tuncer A, Adalioglu G, Sekerel BE, Sackesen C, Kalayci O. The effects of Grass pollen allergoid immunotherapy on clinical and immunological parameters in children with rhinitis. *Ped Allergy Immunol* 2006;17:396-407.
- <sup>228</sup> Aalberse RC. Assessment of allergen cross-reactivity. *Clinical and Molecular Allergy* 2007, 5:2-7.
- <sup>229</sup> Castro RL, Labrada A, Navarro B, Álvarez M, García I. Prevalencia de la sensibilización a tres ácaros domésticos en la población infantil alérgica de un consultorio médico]. *Rev Cub Med Gen Integr* 2005;21:1-2.
- <sup>230</sup> Castro RL, González M, Labrada A, Navarro B, Álvarez M, García I. Sensibilización a *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides siboney* y *Blomia tropicalis* en niños de tres consultorios. *Rev Cub Med Gen Integr* 2005;21:3-4.
- <sup>231</sup> Reese G. Summary of the response to the questionnaire marketing Authorization of Allergen

---

Products in Europe sent to National Regulatory Authorities. En Lower J, Vieths S (eds). Regulatory Control and Standardization of Allergenic Extracts. 11<sup>th</sup> Paul Ehrlich Seminar, 2005, Paul Ehrlich Institut. Verlag Chmielorz, Wiesbaden, 2006.

- <sup>232</sup> The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Disponible en <http://www.ich.org>.
- <sup>233</sup> Prácticas y procedimientos de fabricación, control y comercialización que se deben aplicar para asegurar que las instalaciones, métodos y controles usados en la elaboración y venta de productos alergénicos para uso in-vivo sean adecuados para asegurar la eficacia, calidad, estabilidad y seguridad de los mismos. ANMAT. Disposición 6826/02, Boletín Oficial de la Nación. 5/12/2002. Argentina.
- <sup>234</sup> Regulamento técnico de produção e controle de qualidade para registro, alteração pós-registro e revalidação dos extratos alergênicos e dos produtos alergênicos. ANVISA Resolução - RDC nº 324, 10/nov/2003. Brasil.
- <sup>235</sup> Formulario Nacional de Medicamentos. Centro para el Desarrollo de la Farmacología. MINSAP. Cuba. Disponible en <http://www.cdf.sld.cu/formulario/formulario.htm>.
- <sup>236</sup> Hankin CS, Cox L, Lang D, Levin A, Gross G, Eavy G, Meltzer E, Burgoyne D, Bronstone A, Wang Z. allergy immunotherapy among Medicaid-enrolled children with allergic rhinitis: Patterns of care, resource use, and costs. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:227-32.
- <sup>237</sup> Petersen KD, Gyrd-Hansen D, Dahl R. Health-Economic Análisis of subcutaneous Specific Immunotherapy for grass pollen and mite allergy. *Allergol et Immunopathol* 2005;33(6):296-302.
- <sup>238</sup> Schadlich PK, Brect JG. Economic Evaluation of Specific Immunotherapy versus symptomatic treatment of allergic rhinitis in Germany. *Pharmacoeconomics* 2000;17(1):37-52.

# **ANEXOS**

**Anexo 1. Estudio sobre la optimización de parámetros del proceso de diafiltración.**

**Anexo 2. Estudio sobre el desarrollo del proceso de liofilización.**

**Anexo 3. Especificaciones de Calidad de los productos**

**Anexo 4. Producción científica del autor**

**Anexo 5. Certificados de Registro de los productos VALERGEN.**

**Anexo 6. Certificado de Autor de Invención No. 22 803, OCPI, 2002. Autores: Fernández B, Labrada A, Facenda E.**

**Anexo 7. Certificado de Premio Nacional de la Academia de Ciencias 2002.**

**“Desarrollo por primera vez en el país, de extractos alergénicos estandarizados para el diagnóstico de la alergia”.**

## ANEXO 1

### OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS PARA EL PROCESO DE DIAFILTRACIÓN

#### Introducción

La etapa de diálisis o purificación parcial de los extractos alérgicos persigue el objetivo de remover los componentes de bajo peso molecular extraídos de la materia prima alérgica. Estos componentes que no poseen actividad alérgica, pueden causar irritación inespecífica en los pacientes y afectar la estabilidad del producto. Empleando modelos matemáticos, se estudiaron los parámetros óptimos para la introducción de la tecnología de Ultrafiltración (UF) por cartuchos de fibra hueca, a escala industrial, en sustitución de los métodos usualmente empleados a escala de laboratorio para ese propósito: la diálisis o la cromatografía de exclusión molecular. En esta tecnología, las membranas ultrafiltrantes están configuradas en forma de tubos de pequeño diámetro, por el interior de los cuales se recircula el producto, a alta velocidad tangencial. La tecnología de Ultrafiltración permite tanto la **diafiltración** (análoga a la diálisis) como la **concentración** del producto. El proceso de diafiltración tiene varias ventajas sobre la gel-filtración o la diálisis. Los volúmenes de producto admitidos son elevados, y a diferencia de los métodos cromatográficos no están limitados por las dimensiones de la columna. Su introducción permite ahorrar grandes cantidades de reactivos necesarios para la preparación de soluciones, así como disminuye el tiempo total de procesamiento, permitiendo realizar la etapa de semipurificación y concentración en una sola instalación.

Los objetivos concretos del estudio tecnológico de esta etapa fueron:

- Caracterizar el proceso de diafiltración y concentración por fibra hueca de extractos alérgicos, y determinar:
  - Los coeficientes de rechazo para las fracciones de alto y bajo peso molecular, los cuales caracterizan el proceso de retención o eliminación de las fracciones respectivas.
  - El volumen de solución de diafiltración óptimo para obtener una remoción adecuada de la fracción de bajo peso molecular.
  - Concentración óptima de soluto durante el proceso de diafiltración.
- Estudiar la composición final del producto diafiltrado y validar el resultado del proceso de diafiltración con respecto al método de gel-filtración.

## Materiales y Métodos

**Modelos matemáticos:** Se emplearon los siguientes modelos matemáticos que describen el proceso de ultrafiltración:<sup>1</sup>

- Coeficientes de rechazo: El coeficiente de rechazo ( $\sigma$ ) es una medida de la probabilidad con que una especie dada es rechazada por la membrana, o sea no pasa a través de los poros presentes en ella. El comportamiento de la concentración de la fracción retenida, durante el proceso de Concentración, quedará expresada en la siguiente forma:

$$C = C_0 \cdot VCR^{-\sigma}$$

donde VCR: es el factor de concentración, o sea la relación entre el volumen inicial de la solución ( $V_0$ ) y el volumen retenido ( $V_r$ ) durante el proceso de ultrafiltración:  $VCR = V_0/V_r$ ; y  $C_0$  es la concentración inicial.

- Modelo de gel-polarización: Durante el proceso de ultrafiltración se forma un gradiente de concentración junto a la membrana. La concentración de soluto en la pared de la membrana crece en la medida que avanza el proceso. Sin embargo, este valor sólo puede incrementarse hasta cierto límite, que se alcanza cuando el soluto retenido forma una capa llamada "gel". El flujo a través de la membrana sería:

$$J = K \cdot \ln(C_g/C_B) \quad [1]$$

donde  $K$  es el coeficiente de transferencia de masa y  $C_g$ ,  $C_B$  son la concentración de soluto en la superficie de la membrana y en el seno de la solución, respectivamente. Cuando  $C_B$  se iguala a  $C_g$  entonces el flujo es igual a 0,

- Diafiltración continua: La diafiltración continua implica la adición de agua o de una solución específica al tanque de alimentación, con un flujo igual al de permeado, manteniendo el volumen constante durante el proceso. El transcurso de la diafiltración continua es usualmente presentado en términos del factor de dilución ( $VD$ ) que es igual a la relación entre el volumen de permeado y el volumen inicial ( $V_p/V_0$ ):

$$\ln(C_0/C) = (1-\sigma) \cdot V_p/V_0 = VD \cdot (1-\sigma)$$

La fracción del soluto removido ( $\delta$ ) queda definida como:

$$\delta = 1 - e^{-VD \cdot (1-\sigma)}$$

De esta expresión se deduce que se podrá estimar el valor mínimo del volumen de solución que se requerirá para la diafiltración, en función del coeficiente de rechazo del soluto ( $\sigma$ ) de

interés para un  $\delta$  determinado.

- Tiempo mínimo de proceso: El tiempo requerido para llevar a cabo la operación de diafiltración, dependerá principalmente de la concentración de soluto. La concentración óptima de soluto ( $CB_{opt}$ ) implicará un tiempo mínimo de proceso. Minimizando el tiempo en función de la concentración ( $dt/dCB=0$ ), obtenemos:

$$CB_{opt} = C_g/e$$

Por tanto, se puede predecir la concentración de soluto óptima para conducir la operación de diafiltración en un tiempo mínimo, conociendo solamente el valor de concentración del gel ( $C_g$ ). Este valor se puede determinar estudiando la dependencia de  $J$  vs.  $\ln(CB)$ , según la ecuación [1].

**Instalaciones:** Equipo de ultrafiltración por fibra hueca Amicon, modelo DC-10L, cartucho H15P10, límite de corte 10 KD. Volumen máximo de procesamiento 20 L. A la instalación se le adicionó un detector UV con registrador gráfico acoplado que permite monitorear la absorbancia a 280 nm del retenido de forma "on line". (Fig 1)

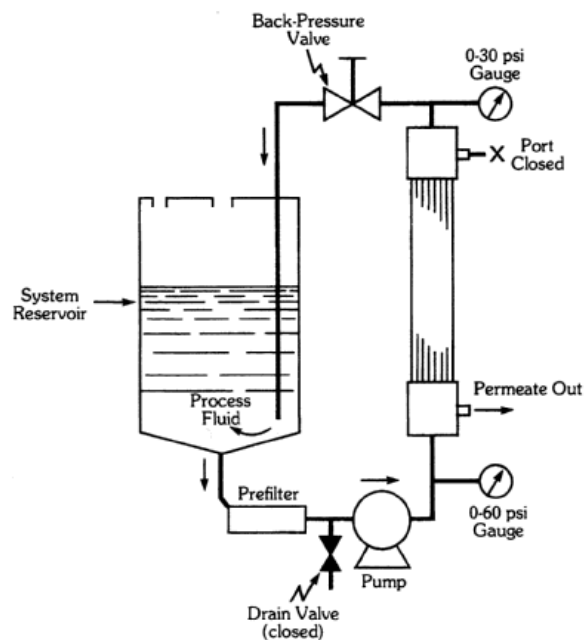


Fig. 1 Esquema de la instalación de ultrafiltración

**Experimentos:** Se realizaron tres lotes consecutivos de 10 L de extracto crudo para determinar los coeficientes de rechazo y la concentración óptima. El proceso se divide en tres etapas: (i) concentración de 10 hasta 2 L; (ii) diafiltración continua empleando 20 L de solución de diafiltración; (iii) concentración de 2 hasta 0,5 L (Fig 2).

**Técnicas Analíticas:** La concentración de proteínas se determinó mediante Absorbancia a

280 nm ( $A_{280}$ ) y mediante la técnica de Bradford.<sup>2</sup> La composición de los productos se estudió mediante análisis por cromatografía de exclusión molecular empleando Sephadex G-25 superfino como matriz (límite de exclusión 5000 D). La instalación cuenta con un integrador acoplado al detector UV para determinar automáticamente el área bajo los picos

## Resultados

### Coeficientes de Rechazo y VD

Se obtuvieron los siguientes valores de coeficiente de rechazo de las fracciones de alto y bajo peso molecular ( $\sigma_{APM}$  y  $\sigma_{BPM}$ , respectivamente):  $\sigma_{APM}=0,939\pm0,063$ ;  $\sigma_{BPM}= 0,095\pm0,032$ , Como se puede apreciar  $\sigma_{APM}$  tiene un valor promedio muy cercano a la unidad, lo que demuestra que los elementos de alto peso molecular, en su conjunto tienen una probabilidad muy pequeña de atravesar la membrana. Este resultado garantiza la alta recuperación de los elementos de más de 10 KD durante la ultrafiltración, que son los responsables, de la actividad alérgica.  $\sigma_{BPM}$  tiene un valor cercano a 0, lo cual indica que la probabilidad de pasar a través de la membrana de los elementos con pesos menores de 10 KD es elevada. Estos resultados son satisfactorios y concuerdan con los parámetros especificados por el fabricante para otras sustancias, a pesar de que este modelo teórico está diseñado para una especie molecular determinada y no para mezclas complejas de varias moléculas, como lo son los extractos alérgicos.

El valor promedio de factor de dilución (VD) para lograr una remoción del 99% de los elementos de bajo peso molecular, de acuerdo al modelo teórico, fue de  $VD = 5,07\pm0,15$ , Este resultado permite minimizar el volumen de solución de diafiltración a utilizar. Por ejemplo: para el  $VD_{99\%}$  obtenido, el volumen de solución de diafiltración, para un volumen inicial de 2 L, sería de 10 L. Para confirmar experimentalmente el modelo, se comparó la curva teórica de la dependencia de la fracción de soluto retenido ( $Cr/Co$ ) vs. VD, con el comportamiento en la práctica de la concentración de proteínas (estimada mediante  $A_{280}$ ) durante el proceso de diafiltración. Como se aprecia en la Fig 3 ambas curvas son similares. En ambos casos con un  $VD = 5,07$  se obtendría una remoción satisfactoria de los componentes indeseables.

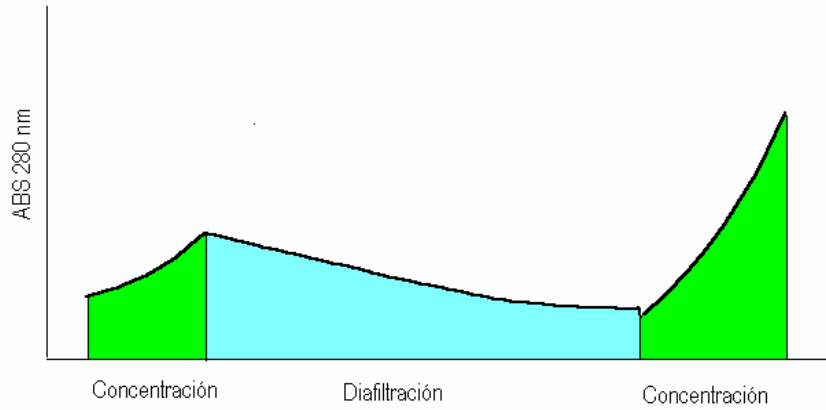


Fig. 2. Marcha del proceso reflejada en la Absorbancia a 280 nm del retenido, determinada "on line".

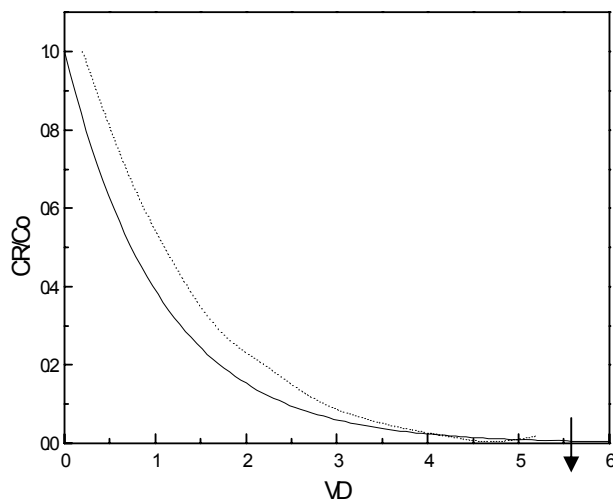


Fig. 3. Comparación del comportamiento teórico de la concentración de retenido (Cr) en dependencia del factor de dilución (VD) [—], para un valor de  $\sigma = 0,095$ ; con el registro de  $A_{280}$  (concentración de proteínas) durante la diafiltración [.....]. La flecha señala el valor óptimo de VD para alcanzar el 99 % de remoción de la fracción de bajo peso molecular

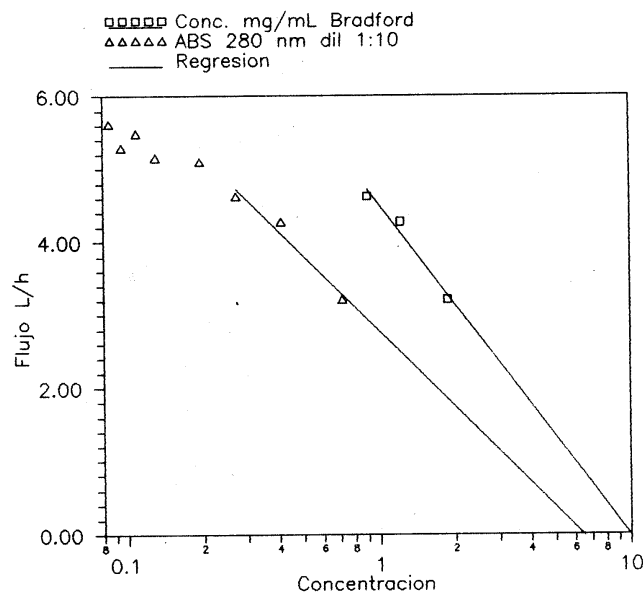


Fig. 4. Dependencia del flujo de permeado de la concentración de proteínas del retenido. El punto de intersección con el eje de las Y, corresponde a la concentración límite para la cual el flujo es igual a 0.



### Concentración óptima

En la Fig. 4 se muestra los resultados experimentales determinados durante la etapa de concentración final del producto. La regresión lineal efectuada con los tres últimos puntos, permite estimar la concentración límite ( $C_g$ ) como el punto de intercepción sobre el eje de las Y. Los valores de  $C_g$  estimados estarían entre 9 y 15 mg/mL de proteínas. Los resultados obtenidos para  $C_g$ , son comparables con los reportados por otros autores para otras sustancias de origen proteico. El valor estimado de concentración óptima para minimizar el tiempo de operación está aún muy por encima de los valores actuales, que son del orden de 200 a 300  $\mu\text{g/mL}$ ; lo cual indica que es recomendable realizar la diafiltración con extractos aún mas concentrados. Este resultado nos permitiría escalar la producción con lotes de mayor volumen, en el mismo equipo, de acuerdo a las necesidades crecientes del sistema de salud.

### Comparación de los extractos semipurificados por diafiltración y gel-filtración.

En la siguiente tabla se resumen los resultados de los análisis realizados a los extractos alergénicos semipurificados por UF, en comparación con los valores típicos de los obtenidos por gel-filtración a escala de laboratorio.

Método	Fracción Alto PM (%)	Conc. proteínas ( $\mu\text{g/mg}$ de peso seco)
Ultrafiltración.	78,8 $\pm$ 2,0	394 $\pm$ 40
Gel-filtración	66,0	400

Como se observa, no hay diferencias en cuanto a composición de proteínas, mientras que los ultrafiltrados tienen incluso una mayor porción de componentes de alto peso molecular. Es decir, los de bajo peso son eliminados mejor por UF. En las Fig. 5 se evidencia como el proceso de diafiltración es capaz de eliminar eficazmente dichos componentes. Las ventajas de la diafiltración se resumen en la utilización de una misma instalación en las etapas de semipurificación y concentración; un menor consumo de soluciones y por lo tanto menor costo; mayores volúmenes de procesamiento (El volumen máximo en la gel-filtración está limitado por la capacidad de la columna); un menor tiempo de proceso; operación más sencilla y mayor facilidad para el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación; y menor costo de la instalación industrial

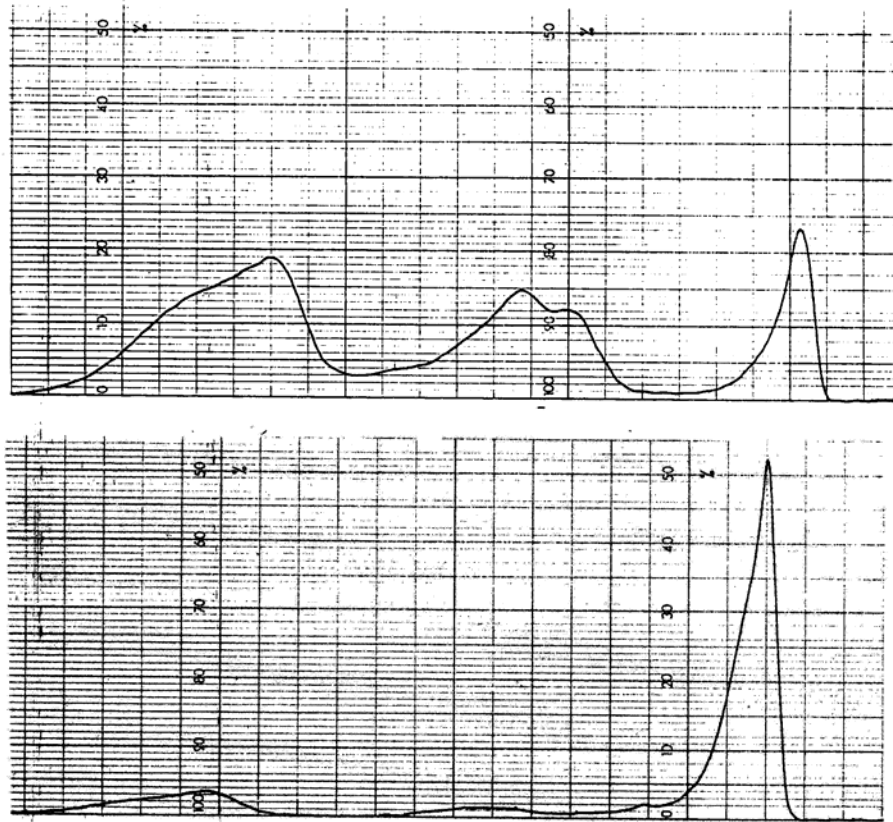


Fig. 5. Cromatogramas de las muestras del proceso de concentración-diafiltración. Arriba: inicio el proceso (Fracción de alto PM,  $F_{APM} = 16,2 \%$ ). Abajo: final de la diafiltración-concentración ( $F_{APM} = 77,1 \%$ ). Se evidencia la eliminación de los componentes de bajo peso molecular de los primeros dos picos del cromatograma.

## Conclusiones

En conclusión, se establecieron los parámetros óptimos de explotación de la tecnología de ultrafiltración por fibra hueca para la diafiltración y concentración de extractos alérgicos de ácaros, entre ellos la relación entre el volumen de solución de diafiltración y el volumen de producto para alcanzar el 99 % de eliminación de los componentes de bajo peso molecular, y la concentración óptima del producto durante el proceso de diafiltración. El proceso de diafiltración desarrollado es capaz de eliminar los componentes de bajo peso molecular (<10 KD) de los extractos alérgicos. La UF con cartuchos de fibra hueca es una tecnología más eficiente para el escalado industrial de los productos.

## Bibliografía

- <sup>1</sup> Cheyran, M. (ed) (1986). Ultrafiltration Handbook. Technomic Publishing Company, Inc. New York
- <sup>2</sup> Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the cuantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem 72: 248-254

## **ANEXO 2**

### **DESARROLLO DEL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN.**

#### **Introducción**

El proceso de liofilización tiene la misión de obtener un producto final con mayor estabilidad. Como es sabido, los extractos alérgicos son mezclas de diferentes proteínas, susceptibles a diferentes mecanismos de degradación. La liofilización, es el método conocido más eficaz para estabilizar este tipo de preparado. No obstante, para obtener un proceso de liofilización eficiente es necesario estudiar una serie de parámetros de la formulación y del proceso, con el objetivo final de obtener una estructura rígida de la pastilla liofilizada, que garantice la estabilidad del producto en el tiempo, sin afectar por ello su actividad biológica. Entre estos parámetros, reviste especial importancia determinar la temperatura de fusión incipiente, pues permite conocer el valor crítico de temperatura que no puede sobrepasar el producto durante la fase de sublimación, evitando así posibles fusiones en la estructura del mismo. Este trabajo tuvo como objetivos: determinar la concentración óptima del producto, determinar la temperatura de fusión incipiente de los productos y establecer los parámetros del ciclo de liofilización en una liofilizadora a escala industrial.

#### **Materiales y métodos**

Se emplearon 6 lotes pilotos de los extractos alérgicos de *Dermatophagoides siboney* y *Dermatophagoides pteronyssinus*, para los diferentes estudios. Con el fin de determinar la concentración óptima de proteínas en la formulación se evaluaron inicialmente 3 lotes experimentales de DS con concentraciones iniciales diferentes.

La temperatura de fusión incipiente fue determinada obteniendo las curvas de resistividad contra temperatura, durante el calentamiento de muestras de 10 mL previamente congeladas por debajo de -80 °C, con el uso de nitrógeno líquido. Se realizaron para este experimento tres réplicas; para cada réplica se emplearon 5 viales, calculándose el valor promedio

Fue empleado un equipo liofilizador marca USIFROID modelo SMH-100, Inicialmente, el ciclo de liofilización se basó en una receta básica conservadora, empleada usualmente para la liofilización de productos biológicos cuando no se conoce todavía su comportamiento en este proceso, con duración total de 36 h. Esta receta parte de las condiciones de liofilización a escala de laboratorio. La optimización del proceso en la liofilizadora de escala industrial se

basó, primeramente, en la determinación de la temperatura de fusión incipiente, lo cual permitió diseñar racionalmente cambios en varios parámetros. Se modificaron el tiempo de congelación, la temperatura de la platina y la presión durante la sublimación (dos variantes 150 y 240  $\mu$ bar), y la temperatura y duración del secado secundario.

El contenido de proteínas totales fue determinado por la técnica de Lowry. El contenido de proteínas específicas (alergenos del grupo 1: Der s 1 o Der p 1) fue determinado mediante ELISA con AcM. La humedad residual se determinó por el método de Karl Fischer, según la USP.

### **Resultados**

Se determinó la concentración inicial de proteínas óptima para alcanzar una pastilla de características adecuadas ( $> 2,5$  mg/mL) sin necesidad de modificar la formulación original del producto con otros aditivos. El recobrado del proceso, en cuanto a proteínas totales, empleando dicha concentración resultó 88 % como promedio.

El valor promedio de la temperatura de fusión incipiente resultó  $-2,07 \pm 0,02^{\circ}\text{C}$ . Teniendo en cuenta este valor, se redujo el tiempo de congelación de 2 a 3 h y se fijó la temperatura de la platina durante la sublimación en  $0^{\circ}\text{C}$ . En esas condiciones los mejores resultados se obtuvieron con la presión en la cámara, durante la sublimación en 150  $\mu$ bar y una duración del proceso de sublimación de 9 h (Fig. 1), el cual es menor que las 16 h de la receta inicial. Los recobrados obtenidos con el proceso modificado fueron: 97% de proteínas específicas (alergenos del grupo 1) y 90 % de proteínas totales. Los valores de humedad residual resultaron, en todos los casos, menores del 5%, satisfaciendo las especificaciones de calidad del producto. La calidad de la pastilla con el proceso optimizado resultó satisfactoria, el rechazo por concepto de defectos en la pastilla durante la inspección visual fue menor del 3 %. El proceso optimizado fue aplicado también a tres lotes del extracto alergénico de *Blomia tropicalis*, obteniéndose también en este caso resultados satisfactorios: recobrado de proteínas  $> 90$  %, humedad residual  $< 5$  %, rechazos por concepto de defectos en la pastilla  $< 5$  %.

### **Conclusiones**

En resumen, se logró establecer el proceso de liofilización de extractos alergénicos a escala industrial. El mismo fue optimizado en sus parámetros principales sobre la base de la determinación de la temperatura de fusión incipiente del producto. El proceso brinda

resultados satisfactorios en cuanto a los parámetros de calidad del producto final con altos valores de recobrado.

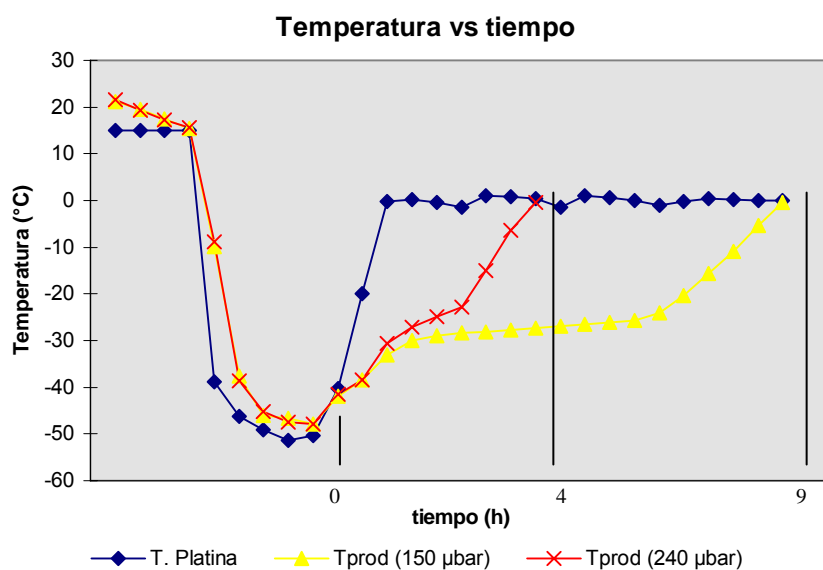


Fig 1. Curvas comparativas de temperatura de producto en el tiempo a diferentes presiones en la cámara, durante el proceso de sublimación. La presión óptima, de acuerdo a los resultados finales resultó ser 150 µbar.

### ANEXO 3

#### ESPECIFICACIONES DE CALIDAD DE LOS PRODUCTOS

Tabla 1. Especificaciones de Calidad de los productos finales: extractos alergénicos liofilizados VALERGEN-DP, VALERGEN-DS y VALERGEN-BT

Parámetro	Límites	Método Analítico
Potencia Alergénica Total	50 000 – 200 000 UB (0,5 – 2,0 RI)	ELISA de inhibición de IgE.
Composición alergénica - Patrón de bandas - Intensidad de las bandas principales	- Similar a la RI, - 50 – 200 % (relativo a RI)	<u>Western Blotting</u> IgE
Composición proteica - Patrón de bandas - Componentes principales (15 y 25 kDa para DP y DS, 12-21 kDa para BT)	- Similar a la RI. - > 30 %	SDS-PAGE
Humedad residual	< 5 %	USP
Organoléptica del producto liofilizado y reconstituido	pastilla de color pardo claro, solución transparente, sin partículas ni precipitados	Inspección visual
Tiempo de disolución	< 1 min	
pH	6,4 – 8,4	Potenciométrico
Uniformidad de la dosis	CV ≤ 6 %	USP
Esterilidad	Estéril	USP
Inocuidad Inespecífica	Atóxico	USP

RI: Referencia Interna

DP: *Dermatophagoides pteronyssinus*

DS: *Dermatophagoides siboney*

BT: *Blomia tropicalis*

**Tabla 2. Especificaciones de calidad de la Materia Prima Alergénica, resultante de la propagación de los ácaros.**

Parámetro	Método analítico	Límites
Identidad	Inspección microscopio, claves pictóricas de identidad	-
Pureza	Inspección en estereoscopio, 100 % del cultivo Inspección bajo microscopio de ácaros seleccionados (n =20)	> 99% > 95%
Densidad de ácaros	Conteo bajo estereoscopio de ácaros vivos	> 20/cm <sup>2</sup>
Contenido alergénico		
DP: Der p 1	ELISA-AcP	> 0,17 mg/g
DS: Der s 1	ELISA-AcM	> 0,25 mg/g
BT: proteínas	Lowry	> 40 mg/g
BT: actividad específica	ELISA de Inhibición de IgE	> 5000 UB/mg de proteínas

DP: *Dermatophagoides pteronyssinus*

DS: *Dermatophagoides siboney*

BT: *Blomia tropicalis*

**Tabla 3. Especificación de Calidad de la Solución Diluyente para Extractos Alergénicos VALERGEN**

Parámetro	Límites	Método analítico
Contenido de albúmina	0,25 – 0,45 mg/mL	Bradford
Contenido de fenol	0,3 - 0,5 %	Valoración con <i>p</i> -nitroanilina
pH	7,0 - 7,8	Potenciométrico
Organoléptica	Solución transparente incolora sin partículas visibles	Inspección visual
Volumen	≥ 5,0 mL	USP
Esterilidad	Estéril	USP
Contenido de endotoxinas	< 0.5 U/mL	LAL, USP
Seguridad general	Atóxico	USP

## ANEXO 4. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR

### Publicaciones cuyos resultados forman parte de la Tesis

1. **Labrada A**, Facenda E, Coca MA, Ferrándiz R, Sewer M. Equilibración de potencia de extractos alergénicos por ELISA de inhibición. (Reporte corto). Avances in Biotecnología Moderna 1994; 2:P70.
2. **Labrada A**, Aranda RE, Martínez N, Facenda E, Coca MA. Biological standarization of Dermatophagoides allergenic extracts in Cuba. Relationship of the allergenic potency with the Der 1 allergen content. Allergy Clin Immunol Int 1997;Suppl.4:135.
3. **Labrada A**, Aranda RE, Martínez N, Facenda E, Coca MA, Diéguez R, Fernández B. Biological Potency and allergen composition of House Dust Mite allergenic extracts. (Short Report) Avances en Biotecnología Moderna 1997;4:P48.
4. Pérez A, Guerra E, **Labrada A**. Automatización del análisis de los resultados del ELISA. Biotecnología Aplicada 1999;16:31-36.
5. Aranda RE, **Labrada A**, Facenda E, Diéguez R, Martínez N et al. Respuesta IgE a Blomia tropicalis. Revista Cubana de Medicina Tropical 2000;52(1):31-6.
6. Aldana L, González Y, **Labrada A**, García A, Amaya R, et al. Ensayo de Toxicidad a dosis repetidas de los extractos alergénicos *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides siboney*. Estudio de 28 días. Revista Cubana de Farmacia 2000; Suppl 34:517-518.
7. Castro RL, **Labrada A**, Abdo A, González J, Ulloa CA, Falcón ME, Aranda RE, Dreborg S. Diagnostic efficacy of skin prick test with mite allergen extracts (*D. pteronyssinus*, *D. siboney* and *Blomia tropicalis*) in a Cuban population. Allergy Clin Immunol Int 2000;Suppl 2:178.
8. **Labrada A**, Martínez N, Lorenzo N, Facenda E, Aranda RE, Diéguez R, Dreborg S. Stability of allergen vaccines of *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis* mites, in freeze dried and liquid form. Allergy Clin Immunol Int 2000;Suppl 2:179.
9. Rodríguez O, Benítez M, **Labrada A**, Jove V. Ensayo Clínico diagnóstico con extracto alergénico de *Blomia tropicalis* en adultos alérgicos y voluntarios sanos. Rev Alergia México 2000; 47(2):57-59.
10. Rodríguez O y **Labrada A**. Ensayo clínico diagnóstico en niños con extracto alergénico de *Blomia tropicalis*. Allergologia et Immunopathologia 2000; 28(4):225-228.
11. Fuentes D, González B, González Y, Aldana L, Arteaga ME, Bada AM, **Labrada A** y Bellido de Luna AT. Alteraciones patológicas producidas por la inoculación subcutánea de los extractos alergénicos de *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides siboney* en ratas y ratones Rev Toxicol 2003;20:23-26.
12. Cartaya J, Orta SD, Rodríguez J, Torres O, **Labrada A**. Amparo normativo para las vacunas terapéuticas en Cuba. Evaluación del desarrollo clínico-farmacológico en los últimos 7 años. Anuario Científico CECMED 2005;2:43-56.
13. Fernández BI, Jorge OC, Pérez M, Más A, Ramírez W, Navarro BI, Luis B, Torralba D, Oliva Y, López A, **Labrada A**. Caracterización del cultivo del ácaro del polvo Dermatophagoides siboney como materia prima para la producción de extractos alergénicos Revista CENIC Ciencias Biológicas 2005;36(Esp).
14. González Y, **Labrada A**, González B, Bada AM et al. Repeated doses toxicity assay of Dermatophagoides siboney allergen extract in mice. Acta Pharmacol Sin 2006;27(Suppl 1):366.
15. González Y, González B, Bada AM, Fuentes D, León A, Santana E, Arteaga ME and **Labrada A**. Toxicity assay in repeated doses of Dermatophagoides siboney and Blomia tropicalis allergens extracts in Cenp:NMRI mice. Toxicology Letters 2006;164(Suppl 1):S84
16. **Labrada A**, Facenda E, Castro RL, Fernández B, Uyema K, Sewer M, Aranda RE, Más A, Navarro B, Jorge O, Novoa I, Díaz J, Bourg V. State of the Art in developing allergen vaccines in Cuba: prospects of novel adjuvanted vaccines. Vaccine 2006; 24S2:36-37.
17. Castro RL, Mateo M, Naranjo RM, Navarro B, Álvarez M, Ronquillo M, García I, Oliva Y, González M, Rodríguez J and **Labrada A**. Correlation between skin tests to



*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis* in Cuban asthmatics. *Allergol et Immunopathol* 2006;34(1):23-6.

18. **Labrada A.** Desarrollo de vacunas de alérgenos de ácaros domésticos para la inmunoterapia de la alergia respiratoria. *Revista Cubana de Farmacia* 2007; 41(S2):100.

#### Otras publicaciones relacionadas

19. Martínez N, Aranda RE, Casas R, Garriga S, **Labrada A.** Epidemiological Study of sensitization to common inhalant allergens in Cuba. *Allergy Clin Immunology International* 1997;Suppl 4:148.
20. Jorge O, Labrada M, Sewer M, **Labrada A.** Development of Mab based Enzyme Immunoassay for detection of Der s 1 major allergen specific IgE (Short Report). *Avances en Biotecnología Moderna* 1997;4:P57.
21. Rodríguez O, **Labrada A,** Yedra AM. Rinitis y pólipos nasales. Su relación con ácaros domésticos. *Rev Alergia México* 2000;47(2):78-81.
22. Coca MA, **Labrada A,** Romero R, Facenda E, Alonso I, Silva A, Aranda RE. Unión de Der p 2, alérgeno mayor de *Dermatophagoides pteronyssinus* expresado en *E. coli*, a la IgE de pacientes cubanos. *Revista CNIC Ciencias Biológicas.* 2001;32(1):3-7.
23. Labrada M, Uyema K, Sewer M, **Labrada A,** González M, Caraballo L, Puerta L. Monoclonal Antibodies against Blo t 13, a Recombinant Allergen from *Blomia tropicalis*. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129:212–218.
24. Puerta L, **Labrada A,** Labrada M, Uyema K, Jiménez S, Caraballo L. Blo t 13 Allergen from *Blomia tropicalis* shows high frequency of IgE binding in allergic Cuban patients and cross-reactivity with *Dermatophagoides siboney* extract, *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(2):10.
25. Castro RL, Primo SI, González M, Navarro B, Álvarez M, Irraragorri C, Ronquillo M, García I, **Labrada A.** Comparación de dos lancetas en la prueba por punción cutánea. *Rev Alergia México* 2005;52(5):188-93.
26. Castro RL, **Labrada A,** Navarro B, Álvarez M, García I. Prevalencia de la sensibilización a tres ácaros domésticos en la población infantil alérgica de un consultorio médico]. *Rev Cubana Med Gen Integr* 2005;21:1-2.
27. Castro RL, González M, **Labrada A,** Navarro B, Álvarez M, García I. Sensibilización a *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides siboney* y *Blomia tropicalis* en niños de tres consultorios. *Rev Cubana Med Gen Integr* 2005;21:3-4.
28. Calderón L, Facenda E, Rodríguez D, Gomez E, **Labrada A,** Lanio ME. Modulation of the specific allergic response by mite allergens encapsulated into Liposomes. *Vaccine* 2006, vol. 24S2:38.
29. Lastre M, Pérez O, **Labrada A,** Bidot I, Pérez J, et al Bacterial derived Proteoliposome as adjuvant for Allergy vaccines. *Vaccine* 2006, 24S2:34.
30. Pérez M, **Labrada A** Facenda E. Análisis de la actividad enzimática de proteínas alérgicas de ácaros del polvo doméstico. *Revista CNIC: Ciencias Biológicas,* 2008, en prensa.
31. Scala E, Ferrara R, Más A, Hidalgo A, Zafiro A, Pomponi D, **Labrada A,** Mari A. Group 1 Mite Allergen from *Dermatophagoides siboney* (Der s 1) behave as Der p 1 and Der f 1 to detect mite allergic subjects in a D. siboney not exposed population . *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(2):S178.
32. Más A, **Labrada A,** Facenda E, Mateo M, Montesino M, Oliva Y, Torralba D, Castillo O. Development of in-house references of house dust mite allergen vaccines. *Allergy* 2008;83(Suppl 88):395.
33. Fuentes Y, Castro R, Rodríguez R, Martínez I, **Labrada A.** Eficiencia de dos pruebas diagnósticas en la determinación de alergia por ácaros en niños. *Vaccimonitor* 2008; 17(2)1-6.

#### Patentes que forman parte de la Tesis

1. Fernández B, **Labrada A,** Facenda E. Medio y método de cultivo de ácaros del polvo doméstico para la fabricación de vacunas de alérgenos y productos obtenidos mediante los

mismos. Certificado de Autor de Invención No. 22 803, OCPI, Cuba, 2002.

### Otras patentes relacionadas

2. Lastre M, Pérez O; **Labrada A**; Bidot I; Pérez J; Bracho G; Del Campo J; Pérez D; Facenda E; Zayas C; Rodríguez C; Sierra G. Composición vacunal contra las alergias y métodos para su obtención. Certificado de Autor de Invención No. 22983, 2004, OCPI, Cuba. Solicitud internacional PCT/CU 03/00007 WO 03/094964. "Allergy vaccine composition, production method thereof and use of same in allergy treatment", 2003.

### Eventos internacionales en que se han presentado los resultados

1. Congreso Biotecnología Habana 1994.
  - Cartel: **Labrada A**, Facenda E, Coca MA, Ferrándiz R, Sewer M. Equilibración de potencia de extractos alergénicos por ELISA de inhibición.
2. XVI International Congress of Allergology and Clinical Immunology. Cancún 1997, México.
  - Poster: **Labrada A**, Aranda RE, Martínez N, Facenda E, Coca MA. Biological standardization of Dermatophagoides allergen extracts in Cuba. Relationship of the allergenic potency with the Der 1 allergen content.
  - Poster: Martínez N, Aranda RE, Casas R, Garriga A, **Labrada A**. Epidemiological Study of sensitization to common inhalant allergens in Cuba.
3. Congreso Biotecnología Habana 1997.
  - Cartel: **Labrada A**, Aranda RE, Martínez N et al. Biological potency and allergen composition of House Dust Mite Allergenic Extracts
  - Cartel: Jorge O, Labrada M, Sewer M, **Labrada A**. Development of Mab based Enzyme Immunoassay for detection of Der s 1 major allergen specific IgE..
  - Cartel: Pérez A, Guerra E, **Labrada A**. Automatización de la determinación de la potencia relativa de extractos alergénicos.
4. Congreso Internacional de Farmacia, La Habana, 1998.
  - Cartel: Novoa I, Coca MA, López A, Hernández Y, **Labrada A**. Desarrollo de una formulación liofilizada para extractos alergénicos y optimización del ciclo de liofilización.
5. Congreso Biotecnología Habana 1999.
  - Cartel: **Labrada A**, Martínez N, Lorenzo N, Facenda E, Aranda RE, Diéguez R. Stability of allergen extracts of Dermatophagoides spp mites in freeze dried and liquid form.
  - Cartel: Castro RL, **Labrada A**, Abdo A, Aranda RE. Eficacia del diagnóstico por punción cutánea con VALERGEN-DP y VALERGEN-DS.
6. XV International Congress of Allergology and Clinical Immunology. Sydney, Australia 2000.
  - Poster: Castro RL, **Labrada A**, Abdo A, González J, Ulloa CA, Falcón ME, Aranda RE, Dreborg S. Diagnostic efficacy of skin prick test with mite allergen extracts (D. pteronyssinus, D. siboney and Blomia tropicalis) in a Cuban population.
  - Poster: **Labrada A**, Martínez N, Lorenzo N, Facenda E, Aranda RE, Diéguez R, Dreborg S. Stability of allergen vaccines of Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides siboney and Blomia tropicalis mites, in freeze dried and liquid form.
7. Congreso Internacional de Ciencias Farmacéuticas, Cubafarmacia 2002, La Habana.
  - Conferencia: **Labrada A**. Estabilidad de las vacunas de alergenos de ácaros en forma liofilizada y en solución.
  - Cartel: **Labrada A**, Facenda E, Lorenzo N, Diéguez R, Más A. Desarrollo y validación de métodos analíticos para la potencia y la composición alergénica de vacunas de alergenos de ácaros.
  - Cartel: Castro RL, **Labrada A**, Abdo A, González L, Ulloa C, Oliva Y, González M. Evaluación clínica de los Extractos Alergénicos VALERGEN para el diagnóstico específico de alergias respiratorias en adultos.

- Cartel: Castro RL, **Labrada A**, Andina R, Fabré D, Oliva Y, González M. Evaluación clínica de los Extractos Alergénicos VALERGEN para el diagnóstico específico de alergias respiratorias en niños.
8. VI Latin-American Congress of Immunology, Havana 2002.
- Poster: Navarro B, Facenda E, Más A, **Labrada A**, Castro RL, Oliva Y, Febles M. Biological activity of isolated major allergens of *Dermatophagoides siboney*.
  - Poster: **Labrada A**, Facenda E, Lorenzo N, Más A, Quintero R. Stability of IgE binding activity of domestic mite allergens.
  - Poster: Infante L, **Labrada A**, Facenda E, Castro RL, Fernández B, Luis B. Contamination with mite allergens in the domestic environment of allergic children.
  - Poster: **Labrada A**, Labrada M, Uyema K, Navarro B, Febles M, Puerta L. Isolation and characterization of a low molecular weight allergen fraction from *Blomia tropicalis*.
  - Oral presentation: Labrada M, Uyema K, Sewer M, **Labrada A**, González M, Puerta L, Caraballo L. Characterization of rBlo t 13, recombinant allergen from *Blomia tropicalis* using monoclonal antibodies.
  - Poster: Calderón L, Facenda E, Martínez Y, Otero A, Pico MC, **Labrada A**, Lanio ME. Liposome encapsulation of the major allergens of *D. siboney* for specific immunotherapy
  - Poster: Jorge O, Romero RJ, Fernández B, Luis B, Torralba D, González B, **Labrada A**. Nucleic acids encoding a house dust mite allergen from *Dermatophagoides siboney*.
  - Poster: Castro RL, Andino R, **Labrada A**, Fabré D, Oliva Y, González M. Diagnostic efficacy of the skin prick-test, using allergen extracts of common domestic mites, in Cuban children.
  - Poster: Castro RL, **Labrada A**, Abdo A, Espino R, Ronquillo M, González M, Aranda RE. Diagnostic efficacy of the Skin Prick-Test, using allergen extracts of common domestic mites in a Cuban adult population.
  - Poster: Montesino M, Uyema K, **Labrada A**, Febles M. Development of an ELISA based on specific polyclonal antibodies, for quantifying the Group 1 Major Allergen of House Dust Mites..
  - Poster: Puerta L, **Labrada A**, Caraballo L. IgE reactivity to recombinant allergens from *Blomia tropicalis* in Cuban allergic patients.
9. Congreso Internacional Biotecnología Habana 2003
- Cartel: **Labrada A**, Puerta L, Navarro B, Caraballo L. IgE reactivity to recombinant allergens from *Blomia tropicalis* in Cuban allergic patients.
  - Cartel: Calderón L, Facenda E, Uyema K, Lazo L, Huergo L, Martínez Y, Alvarez C, Otero A, **Labrada A**, Lanio ME. Liposomes as adjuvant for immunopresentation of the major allergens from *Dermatophagoides siboney*.
  - Cartel: Jorge O, Mustelier G, Lemus T, Torralba D, **Labrada A**. cDNA sequence and 3-dimensional model of Der s 1 and Der s 2. major allergens of the House Dust Mite *D. siboney*.
  - Cartel: Uyema K, Montesino M, **Labrada A**, Febles M. Development of an ELISA based on specific polyclonal antibodies, for quantifying the Group 1 Major Allergen of House Dust Mites.
  - Cartel: Alemán C, Bourg V, **Labrada A**, Facenda E, González B, Lazo L, Huergo L. Model of allergic respiratory inflammation in mice, provoked by allergens of *Dermatophagoides siboney*.
10. II International Workshop on Vaccine Adjuvants, Varadero, Cuba, 2004
- Oral presentation: **Labrada A**. State of the Art in Developing Allergen Vaccines in Cuba. Prospects of Novel Adjuvanted Vaccines.
11. I Encuentro Iberoamericano de Alergia, Asma e Inmunología Clínica, La Habana, 2004.
- Conferencia. **Labrada A**. Desarrollo y Registro de extractos alérgicos

estandarizados.

12. III International Workshop on Vaccine Adjuvants and Glycoconjugates, Varadero, Cuba, 2006

- Oral presentation: **Labrada A.** The anti-allergic protecting effect of bacterial-derived proteoliposome as allergen adjuvant in the context of changing paradigms in allergy immunotherapy.
- Poster: Ramírez W, **Labrada A**, Facenda E, Bourg V, González B, Lastre M and Pérez O. Preclinical evaluation in mice of the immunogenicity of a novel adjuvanted anti-allergic vaccine.

13. Congreso Internacional Biotecnología Habana 2006. Carteles:

- **Labrada A**, Fernández B, Castro RL, Facenda E, Más A, Oliva Y, Ramírez W, Montesino M, Torralba D, Luis B. Development of standardized allergen vaccines of tropical domestic mites.
- Castro RL, **Labrada A**, Ronquillo M, Rodríguez J, Mateo M, Oliva Y. Efficacy and Safety of VALERGEN vaccines in the treatment of allergic asthma in a Cuban population. Results from Double-Blind Placebo Controlled clinical trials.
- Ramírez W, **Labrada A**, Facenda E, Bourg V, González B, Lastre M, Pérez O. Preclinical evaluation in mice of the immunogenicity of a novel anti-allergic vaccine, based on *N. meningitidis* proteoliposome as adjuvant.
- Montesino M, López O, Batanero E, Hidalgo A, Toledo A, **Labrada A**. Biodegradable poly-(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres loaded with allergens from *Dermatophagoides siboney*: Preparation and characterization.
- Pérez M, **Labrada A**, Torralba D. Protease and allergenic activity of different components from allergen extracts of *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides siboney*.
- **Labrada A**, Jacquet A, Jorge O, Fernández B. Amino acid and cDNA sequence of the serine protease allergen (Der s 3) from *Dermatophagoides siboney*. Homology with other mite species.
- Más A, **Labrada A**, Facenda E, Bourg V, Petrovsky N. Immunogenicity in mice of *Dermatophagoides siboney* allergens adsorbed onto a Gamma-Inulin vaccine formulation.
- Fernández B, Jorge O, Torralba D, Luis B, Pérez M, Ramírez W, **Labrada A**. Molecular markers of the allergenic activity during the culture growth of *Dermatophagoides siboney*.
- Mateo M, **Labrada A**, Castro RL, Navarro B, Naranjo R. IgG4 allergen-specific antibodies are inversely correlated to IgE mediated allergic response in asthmatic patients allergic to domestic mites.

14. XIII International Congress of Immunology IMMUNORIO 2007, Río de Janeiro, Brasil.

- Presentación oral: **Labrada A.** Immunogenicity and antiallergic effect of a House Dust Mite allergen vaccine, using the proteoliposome form *Neisseria meningitidis* as adjuvant.

15. Congreso Biotecnología Habana 2007

- Poster: Ramírez W, Facenda E, **Labrada A**. Development and validation of inhibition ELISA based on human IgE, for assessing allergenic potency.
- Poster: Más A, **Labrada A**, Facenda E, Mateo M, Montesino M, Oliva Y, Torralba D, Castillo O. Development of in-house references of house dust mite allergen vaccines.

16. Congreso Internacional de Inmunoterapia en Alergología Camaguey 2007.

Conferencias:

- **Labrada A.** Alergenos de importancia en Cuba.
- **Labrada A.** Desarrollo, Registro y Producción de vacunas alérgicas estandarizadas.
- Castro RL. Eficacia de la inmunoterapia con vacunas estandarizadas de

Dermatophagoides siboney y Blomia tropicalis en asmáticos cubanos.

- Montesino M. Preparación de alérgenos de ácaros encapsulados en micropartículas biodegradables.

Presentaciones orales cortas y carteles:

- Correlación inversa entre los anticuerpos IgG4 e IgE alérgeno-específicos en pacientes cubanos alérgicos a ácaros. Mateo M, **Labrada A**, Castro RL, Navarro B, Naranjo R.
- Correlación entre pruebas cutáneas para Dermatophagoides siboney, Dermatophagoides pteronyssinus y Blomia tropicalis en pacientes alérgicos. Castro RL, Mateo M, Naranjo R, Navarro B, Álvarez M, Ronquillo M, García I, Oliva Y, González M, Rodríguez J, **Labrada A**.
- Marcadores moleculares de la actividad alérgica durante el cultivo de Dermatophagoides siboney. Fernández B, Jorge O, Torralba D, Luis B, Pérez M, Ramírez W, **Labrada A**.
- Contenido de los alérgenos principales de Dermatophagoides pteronyssinus y D. siboney en el ambiente doméstico de niños alérgicos. Infante L, **Labrada A**, Castro RL, Facenda E, Fernández B, Luis B.
- Desarrollo y validación de ensayos de actividad alérgica in vitro basados en IgE humana. Ramírez W, Más A, **Labrada A**.
- Alérgenos purificados de Dermatophagoides siboney y su uso como patrones. Hidalgo A, Más A, **Labrada A**, Navarro B, Oliva Y, Castro RL, Montesino M, Ramírez W.
- Desarrollo y validación de ensayos tipo ELISA para la determinación de alérgenos mayores: la experiencia cubana. Montesino M, **Labrada A**, Ramírez W, Uyema K, Más A.
- Estabilidad de las vacunas estandarizadas de alérgenos de ácaros. Más A, **Labrada A**, Facenda E, Ramírez W, Mateo M, Oliva Y, Montesino M.
- Actividad biológica "in vivo" del alérgeno mayor Der s 1 en comparación con otras fracciones del extracto alérgico de Dermatophagoides siboney. **Labrada A**, Navarro B, Oliva Y, Castro RL, Torralba D, Más A, Facenda E, Mateo M.

17. Congreso Internacional de Farmacología Habana 2007.

- Conferencia: **Labrada A**. Desarrollo de vacunas de alérgenos de ácaros domésticos para la inmunoterapia de la alergia respiratoria.

18. XXVII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Barcelona, España, 2008.

- Poster: Más A, **Labrada A**, Facenda E, Mateo M, Montesino M, Oliva Y, Torralba D, Castillo O. Development of in-house references of house dust mite allergen vaccines.

### Premios Nacionales

1. **Premio Nacional de la Academia de Ciencias 2002.** Desarrollo por primera vez en el país, de extractos alérgicos estandarizados para el diagnóstico de la alergia. **Labrada A**, Facenda E, Castro RL, Fernández B, Uyema K, Labrada M, Sewer M, Díaz J, Aranda RE, Rodríguez O, Más A, Coca MA, Novoa I, Pérez A, Abdo A, Fabré D, Andino R.
2. **Mención Especial, XIV Forum Nacional de Ciencia y Técnica, 2003.** "Desarrollo de extractos alérgicos de ácaros como productos biofarmacéuticos para el diagnóstico de alergias respiratorias". **Labrada A**, Facenda E, Castro RL, Fernández B, Oliva Y, Díaz J, Uyema K, Coca MA, Más A, Labrada M, Torralba D, Aranda RE, Luis B, Quintero R, Lorenzo N, Diéguez R, Martínez N, Espinosa B, Sewer M, Febles M, Bourg V, Pérez M, Novoa I, Abdo A, Ronquillo M, Fabré D, Andino R, González M.
3. **Mención, XV Forum Nacional de Ciencia y Técnica, 2007.** "Primeras evidencias de eficacia clínica de las vacunas terapéuticas antialérgicas VALERGEN". Castro RL, **Labrada A**, Ronquillo M, Álvarez M, Rodríguez J, García I, Oliva Y, Mateo M, Irragarri C, Abdo A.

4. **Premio Anual de Salud 2008.** "Primeros ensayos clínicos a doble ciega controlados por placebo con las vacunas antialérgicas VALERGEN-DP, VALERGEN-DS y VALERGEN-BT en asmáticos en Cuba" Ronquillo M, Castro RL, Álvarez M, Rodríguez J, García I, Irraragori C, Abdo A, Navarro B, González M, Oliva Y, Mateo M y **Labrada A.**

#### **Tesis de Maestría tutoradas, cuyos resultados forman parte del trabajo**

1. Maestría en Bioquímica "Actividad biológica de Der s 1 en comparación con otras fracciones de alérgicas de *D. siboney*", Dra. Bárbara Navarro, Fac. Biología, UH, 2003.
2. Maestría en Ciencias Farmacéuticas: "Estudios de Toxicidad por dosis repetida del extracto alérgico de *Blomia tropicalis* (CENPALAB)". Lic. Yana González, IFAL, UH, 2004.

#### **Tesis de Maestría tutoradas, relacionadas con el trabajo**

3. Maestría en Bioquímica: "Anticuerpos monoclonales contra Blo t 13" Lic. Mayrel Labrada, Fac. Biología, UH, 2002.
4. Maestría en Bioquímica: "Secuencia cDNA de alérgenos mayores de *D. siboney*", UH. Lic. Olga Jorge, Fac. Biología, UH, 2003.
5. Maestría en Bioquímica. "Estudio de la capacidad inmunomoduladora de liposomas que contienen colesterol y StII y encapsulan los alérgenos principales de *D. siboney*". Lic. Lesly Calderón, Fac. Biología, UH, 2004.
6. Maestría en Farmacología Experimental. "Estudio de la respuesta inmune a alérgenos de ácaros adyuvados con p64K". Lic. Natacha Reyes, IFAL, UH, 2005.
7. Maestría en Bioquímica: "Estudios preclínicos en ratones de la nueva vacuna de alérgenos de *D. siboney* adyuvada con proteoliposoma". Lic. Wendy Ramírez, Fac. Biología, UH, 2007.
8. Maestría en Bioquímica "Actividad enzimática de alérgenos de ácaros". Lic. Magdiel Pérez, Fac. Biología, UH, 2007.
9. Maestría en Bioquímica "Formulación vacunal de partículas biodegradables de PLGA con alérgenos de *Dermatophagoides siboney*", Lic. Mayelín Montesinos, Fac. Biología, UH, 2008.

#### **Tesis de Especialidad en Alergología asesoradas o tutoradas, cuyos resultados forman parte del trabajo**

1. "Estudio de la respuesta IgE específica a *Blomia tropicalis*". Dra. Maivis N. Cabrera, Hosp. Calixto García 1998.
2. "Ensayo clínico del extracto alérgico de *Dermatophagoides siboney* para uso diagnóstico". Dr. Carlos Ulloa Benítez, Hosp. Calixto García, 2000.
3. "Ensayo clínico del extracto alérgico de *Blomia tropicalis* para uso diagnóstico". Dra. María Esther Falcón, Hosp. Calixto García, 2000.
4. "Sensibilidad y seguridad de los productos VALERGEN en la prueba cutánea por puntura". Dra. Odalis Vergara Consuegra, Hosp. Calixto García, 2001.
5. "Inmunoterapia subcutánea con el extracto de *D. siboney*". Dra. María de las Nieves Quintana Graverán, Hospital Universitario Calixto García, 2006.
6. "Ensayo clínico controlado a doble-ciego con la vacuna VALERGEN-DP en asmáticos adultos sensibles a *Dermatophagoides pteronyssinus*". Dra. Ma. de la Fé Pérez Bernardino, Hospital Universitario Calixto García, 2006.
7. "Eficacia Terapéutica de la vacuna VALERGEN-BT en asmáticos sensibles a *Blomia tropicalis*." Dr. Gonzalo Brook, Hospital Universitario Calixto García, 2007.
8. "Eficacia diagnóstica de VALERGEN-DP mediante la prueba cutánea." Dra. Janet Rodríguez Hernández, Hospital Universitario Calixto García, 2007.

#### **Tesis de Especialidad en Alergología asesoradas o tutoradas, relacionadas con el trabajo**

9. "Estudio de la Sensibilización a los ácaros en los trabajadores de la Biblioteca Nacional José Martí". Dr. Jorge Antonio Rodríguez Díaz, Hosp. Calixto García, 1999.
10. "Sensibilización a los ácaros en los pacientes alérgicos del Archivo Nacional". Dra. Zoraida Carcasés, Hosp. Calixto García, 1999.
11. "Comparación de dos lancetas en la realización de prueba cutánea inmediata por punción". Dra. Sarah Idalmis Primo Valdés, Hosp. Calixto García, 2001.
12. "Eficiencia del diagnóstico de la prueba de provocación nasal con VALERGEN-BT". Dr. Joel Alberto Martínez González, Hospital Universitario Calixto García, 2002.
13. "Diagnóstico de la prueba de provocación nasal con VALERGEN-DP". Dra. Miladis M. Méndez Muñiz, Hospital Universitario Calixto García, 2002.
14. "Eficiencia de dos pruebas diagnósticas en la determinación de la alergia a tres ácaros". Dra. Yadira Fuentes Paéz, Hospital Pediátrico William Soler, 2004.
15. "Sensibilización a *Dermatophagoides* en pacientes con alergia respiratoria". Dr. Amado Eduardo Milián Ortiz, Hospital Universitario Calixto García, 2005.