



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 366 353**

⑤1 Int. Cl.:
A01K 67/033 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **08718323 .2**

⑨6 Fecha de presentación : **28.03.2008**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **2136619**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **30.12.2009**

⑤4 Título: **Procedimiento para producir ácaros.**

③0 Prioridad: **30.03.2007 EP 07105358**
24.04.2007 US 913635 P

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.10.2011

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.10.2011

⑦3 Titular/es: **ALK-ABELLÓ A/S**
Bøge Allé 6-8
2970 Hörsholm, DK

⑦2 Inventor/es: **Chamorro Salillas, María José;**
Arteaga Vázquez, Carmen;
Moreno Segura, Juan Carlos y
Juan Vidales, Fernando

⑦4 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 366 353 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir ácaros.

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para cultivar y producir ácaros, tales como ácaros del polvo doméstico, que comprende cultivar los ácaros en un medio de crecimiento adecuado, en condiciones adecuadas y durante un periodo de tiempo adecuado en un cuarto de producción adecuado, que se caracteriza porque los ácaros se cultivan en medio constituido por una bolsa cerrada.

Antecedentes

[0002] Especies diferentes de ácaros, tales como ácaros del polvo doméstico, se usan para preparar extractos alérgicos usados en formulaciones para alergia para usar en, por ejemplo, pruebas de alergia in vivo o in vitro, o en preparaciones de desensibilización administradas a pacientes.

[0003] Estos ácaros incluyen, en particular, ácaros de las especies siguientes: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia kulagini* o *tropicalis*, *Pyroglyphus africanus* y *Euroglyphus maynei*.

[0004] En numerosos documentos de la técnica anterior se describen procedimientos industriales relevantes para producir ácaros. Con respecto a las mejoras descritas de la producción de ácaros, se puede decir que la técnica anterior se centra en elementos técnicos, tales como un medio nuevo, humedad óptima, temperatura etc.

[0005] En términos generales, para la producción a gran escala con fines industriales, la técnica anterior usa MATRACES o, como alternativa, frascos de expresión para cultivar/criar ácaros de polvo doméstico.

[0006] El documento EP1236394B1 (Stallergenes correspondiente al documento US2003/0059445A1) describe el cultivo de ácaros del polvo domésticos en frascos (véase el ejemplo 1).

[0007] T. Batard y col. (Int Arch Allergy Immunol 2006; 140:295-305) describe el cultivo en matraces de plásticos (véase la página 296, columna 2).

[0008] F.C. Yi y col. (Asian Pacific J. of Allergy and Immunology (1999) 17: 189-194) describe cultivar ácaros de polvo domésticos en matraces Erlenmeyer (véase la página 190, columna del centro).

[0009] J. Miyamoto (Japón, J. Exp. Med. Vol, 45, 2. p. 133-138, 1975) describe el cultivo de ácaros de polvo domésticos en frascos de Roux (véase la página 134, columna 2).

[0010] El cultivo de ácaros del polvo en matraces Erlenmeyer o en frascos de Rouxs puede considerarse un procedimiento "estándar" de la técnica anterior. En la figura 1 del presente documento se muestra una imagen de un matraz Erlenmeyer y en la figura 2 del presente documento se muestra una imagen de un frasco de Roux.

[0011] Para la producción/cultivo de ácaros de polvo doméstico a pequeña escala, la técnica anterior también describe el uso de botes (véase, por ejemplo, J. Med Ent. Vol 12, nº 6: 577-621, 1976).

[0012] También se ha descrito el cultivo de ácaros en bolsas/sobres. Ivanov y Petrova describe en Medisinskaja Parazitologija y Parazitarnye Bolezni, 46-49, 1985, la producción a pequeña escala de *Dermatophagoides pteronyssinus* en bolsas de celofán cerradas 5 x 10 cm. De acuerdo con los autores del artículo, no existe peligro de infecciones fúngicas por moho que supriman el cultivo de los ácaros por el cultivo de ácaros en bolsas de celofán. La cantidad de medio de crecimiento (1 g) y, por tanto el tamaño del cultivo del ácaro que se puede obtener en las bolsas de celofán descritas en el artículo, es muy baja. También se sabe que el celofán tiene una permeabilidad al oxígeno muy baja y, por tanto, el celofán no sería adecuado como material de bolsa para el cultivo de ácaros a gran escala.

[0013] Otras especies de ácaros se usan en el campo del control biológico para reducir plagas en cosechas e invernaderos.

[0014] Un artículo en Crop Protection, 5(2): 122-124, 1986, describe la cría en masa del ácaro depredador *Cheyletus eruditus* para usar para el control biológico de ácaros en granos o semillas almacenados, mediante un procedimiento por el cual los ácaros depredadores se cultivan en bolsas. Bolsas de harina de fondo cuadrado de kg de capacidad se llenaron con g de hojas de lechuga, 20.000 ácaros presa y 100-200 ácaros depredadores. Cada bolsa se cerró plegando y manteniendo una temperatura de 25 °C y una humedad relativa del 75% durante 28-35 días. Para detectar el tiempo correcto para terminar la cría, la proporción entre ácaros depredadores y ácaros presa se comprobó cada dos días después del día 28.

[0015] Una importante ventaja del procedimiento de cultivo de acuerdo con la invención en comparación con el procedimiento anterior de criar ácaros depredadores es que las bolsas de la invención comprenden una zona transparente que permite la inspección visual del crecimiento del ácaro en la bolsa. En general, la cantidad del medio de cultivo usada en el procedimiento de la invención es también mucho mayor que la cantidad de medio de cultivo en el procedimiento descrito anteriormente.

[0016] El documento GB 2 168 680 describe el cultivo de artrópodos vivos o depredadores similares en sobres de material o material plástico microperforados. Las bolsas descritas en esta solicitud tampoco permiten una inspección óptima del crecimiento de los ácaros en las bolsas porque la perforación del material plástico puede alterar la inspección del crecimiento de los ácaros.

Sumario de la invención

[0017] El problema que se ha de resolver mediante la presente invención es proporcionar un procedimiento mejor para cultivar y producir ácaros.

[0018] La solución se basa en el hallazgo de que cultivando ácaros en una bolsa adecuada, tal como, por ejemplo, una bolsa de papel/plástico tal como se muestra en la figura 3, es posible mejorar de forma significativa la producción de ácaros de polvo domésticos.

[0019] La bolsa de papel/plástico como se muestra en la figura 3 se puede caracterizar como una bolsa, en la que:

- 1: u lateral está fabricado por un material de celulosa (p. ej., papel) que es permeable a oxígeno;
- 2: el otro lateral está hecho de material plástico transparente. El plástico puede también ser permeable al oxígeno;
- 3: El tamaño de la bolsa es de aproximadamente 300 mm (ancho) x 500 mm (longitud) con una posibilidad de extenderse hasta una altura de alrededor de 65 mm con el fin de que la bolsa pueda comprender una cantidad relevante de medio para ácaros.

[0020] Como conoce el experto en la técnica, generalmente, un medio adecuado para el crecimiento de ácaros del polvo domésticos es un medio sólido, ya que los ácaros normalmente viven en camas o en otros lugares similares, por ejemplo en una casa. Los ácaros de bodega también se alimentan de material sólido y los ácaros depredadores se pueden alimentar de ácaros presa que se alimentan en un medio sólido.

[0021] Las ventajas de usar bolsas tal como se describe en el presente documento sobre los usos en la técnica anterior de matraces (p. ej., matraces Erlenmeyer, (véase la figura 1) o frascos de Roux (véase la figura 2), incluyen:

A: el material permeable al oxígeno (p. ej., papel) en un lado tiene un área de superficie mucho más grande que los correspondientes "orificios" en la parte superior de los matraces de la técnica anterior. Esto proporciona un suministro de oxígeno mejor y más uniforme para los ácaros en crecimiento y, por tanto, un mejor crecimiento;

B: el mejor suministro de oxígeno en las bolsas también proporciona la posibilidad de tener más medio de cultivo para ácaros y unidad de espacio físico. Por ejemplo, un matraz Erlenmeyer de 250 ml puede comprender solo aproximadamente 30-50 g de medio (véase la figura 1), mientras que la bolsa mostrada en la figura 3 comprende aproximadamente 500 g de medio y puede comprender todavía más (p. ej., 1200 g). En los matraces Erlenmeyer necesita un espacio libre relativamente grande por encima del medio, ya que el suministro de oxígeno desde el orificio relativamente pequeño en la parte superior del matraz proporciona un suministro de oxígeno relativamente limitado;

C: además, el medio de cultivo para ácaros puede estar presente en forma de una capa relativamente fina en las bolsas (compárese, por ejemplo, la bolsa de la figura 3 con los matraces Erlenmeyer, figura 1). Esto también proporciona mejor crecimiento de los ácaros, ya que los ácaros generalmente viven/crecen en la superficie (los ácaros normalmente viven en camas o en otros lugares de "superficie" similar en, por ejemplo, una casa);

D: Las bolsas, tal como se describe en el presente documento, pueden apilarse con relativa facilidad en, por ejemplo, un estante organizador, tal como se muestra en la figura 4, y, en consecuencia, se pueden tener numerosas bolsas apiladas en una estancia de producción industrial relevante (véase, por ejemplo, la figura 4). De acuerdo con el punto B anterior, el resultado final es que el uso de las bolsas aumenta significativamente la capacidad de producción en una estancia (puede contener más medio para ácaros) en comparación con el uso de matraces;

E: El material transparente, por ejemplo de plástico, permite la inspección del crecimiento directamente usando, por ejemplo, un microscopio estereoscópico sin tener que sacar una muestra de la bolsa. Cuando se usan matraces, es mucho más difícil usar, por ejemplo, un microscopio estereoscópico y, generalmente, se tiene que sacar una muestra del matraz para analizar el estado de crecimiento. Sacar muestras implica, por supuesto, un riesgo de contaminación;

F: una bolsa está abierta por un extremo y, por tanto, es fácil introducir el medio en las bolsas (véase, por ejemplo, la figura 5). Esto debería verse en comparación con el uso anterior de matraces, en el que el agujero/orificio es mucho más pequeño. En consecuencia, el uso de las bolsas proporciona la posibilidad de una carga automática (máquina no manualmente) de las bolsas con medio, lo que hace que la producción industrial sea más eficiente. Una vez que la bolsa está cargada con medio y se han inoculado los ácaros, se sella el agujero de la bolsa (véase, por ejemplo, la figura 6) antes del cultivo/crecimiento real de los ácaros.

G- Las bolsas permiten recoger el cultivo directamente en las bolsas y almacenar el material sin abrir;

H- Las bolsas pueden ser desechables (de un solo uso), lo que convierte en innecesaria la limpieza. Asimismo, el espacio usado para contener las bolsas vacías es bajo en comparación con el espacio usado cuando se usan matraces Erlenmeyer;

I- El peso añadido por el contenedor es insignificante cuando se usan bolsas y el peligro de que se rompa el cristal durante las operaciones se evita; y

J- Las bolsas se pueden sellar minimizando la salida de ácaros y la contaminación.

15 **[0022]** Como se muestra en los ejemplos de trabajo en el presente documento, el uso de una bolsa tal como se describe en el presente documento para la producción relevante industrial de ácaros proporciona al menos el mismo rendimiento de ácaros por g de medio que un matraz Erlenmeyer que solo comprende aproximadamente 30 g de medio (véase el matraz en la figura 1, un espacio libre relativamente grande por encima del medio). Una razón de esto es el mejor y más uniforme suministro de oxígeno en las bolsas, que permite un crecimiento eficiente de los ácaros en bolsas con relativamente poco espacio abierto alrededor del medio en las bolsas. Como se hace evidente a partir de lo anterior, esto proporciona la posibilidad de introducir más bolsas (es decir, más medio) en un cuarto de producción, en comparación con el uso de matraces y, por tanto, se pueden producir muchos más ácaros dentro del mismo cuarto de producción física.

25 **[0023]** El experto en la técnica puede identificar de forma rutinaria tipos adecuados de bolsas que se pueden usar para alcanzar las ventajas de producción de ácaros tratadas en el presente documento.

[0024] En general, una bolsa que es útil para la producción de ácaros, tal como se describe en el presente documento, se puede caracterizar por una bolsa que es suficientemente permeable al oxígeno para obtener las ventajas mencionadas con anterioridad.

[0025] Otra característica esencial de la bolsa es que comprende un área que es transparente, para permitir la inspección del crecimiento de ácaros directamente usando, por ejemplo, un microscopio estereoscópico, sin tener que sacar una muestra de la bolsa.

[0026] En consecuencia, la invención se refiere a un procedimiento para cultivar y producir ácaros de acuerdo con la reivindicación 1.

[0027] El término "cultivar" también se puede denominar "criar". Ambos términos se pueden usar de forma intercambiable en el presente documento.

DEFINICIONES

[0028] Antes de tratar las realizaciones detalladas de la invención se proporciona una definición de términos específicos relacionados con los aspectos principales de la invención.

[0029] El término "bolsa", como se usa en relación con el nuevo procedimiento de producción de ácaros, tal como se describe en el presente documento debe entenderse como lo entendería un experto en la técnica en el presente contexto. El experto en la técnica entiende que una bolsa tiene una serie de características que son diferentes de un matraz o un bote. En comparación con un matraz o un bote, una bolsa es más flexible y, por tanto, puede cambiar de forma relativamente más fácil (p. ej., se puede plegar). En el presente contexto, una bolsa puede, por ejemplo, tomar una forma (p. ej., plegarse) alrededor del medio de cultivo del ácaro con el fin de tener relativamente poco espacio libre abierto alrededor del medio dentro de la bolsa (véase, por ejemplo, la figura 3 en el presente documento). Una "bolsa abierta" indica, en el presente documento, una bolsa con un agujero adecuado para añadir medio en la bolsa (véase, la ilustración de la figura 5). El agujero puede cerrarse (p. ej., mediante termosellado, véase, por ejemplo, la figura 6 del presente documento) con el fin de mantener el medio encerrado o contenido dentro de la bolsa durante la producción. Dicha bolsa se denomina "bolsa cerrada".

[0030] Las formas de realización de la presente invención se describen más adelante, únicamente a modo de ejemplos.

FIGURAS

[0031]

Figura 1: Un matraz Erlenmeyer de 250 ml.

Figura 2: Frasco de cultivo de Roux con el cuello desplazado. La capacidad es de 1000 ml.

Figura 3: Ejemplo de una bolsa cerrada con medio para ácaros tal como se describe en el presente documento.

5 Figura 4: Ejemplo de bolsas apiladas en un estante organizador tal como se describe en el presente documento.

Figura 5: Un ejemplo de una bolsa abierta cargada con medio.

Figura 6: Un ejemplo del sellado de una bolsa.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE FORMAS DE REALIZACIÓN CONCRETAS

Permeabilidad al oxígeno de la bolsa

15 **[0032]** Como se ha citado anteriormente, la bolsa tiene una permeabilidad al oxígeno que es suficiente para permitir el crecimiento de los ácaros. Más adelante se tratan parámetros relevantes de permeabilidad al oxígeno cuantitativos preferidos en el presente documento.

20 **[0033]** Como sabe un experto en la técnica, la permeabilidad al oxígeno de una bolsa puede verse en relación con la porosidad del material de la bolsa. De acuerdo con la técnica, esto puede medirse de acuerdo con la norma ISO 5636-3, método de Bendtsen. La norma ISO 5636-3, método de Bendtsen, es bien conocida para el experto,

25 **[0034]** Medido de acuerdo con la norma ISO 5636-3, método de Bendtsen, las bolsas usadas en los ejemplos de trabajo (ilustradas en la figura 3) del presente documento tiene una porosidad mínima de 300 ml/min. En otras palabras, las bolsas tienen una permeabilidad al aire de al menos 300 ml/min, medida de acuerdo con la norma ISO 5636-3, método de Bendtsen.

30 **[0035]** Un papel "normal" puede tener una permeabilidad al aire de alrededor de 10 ml/min. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que una bolsa con una permeabilidad al aire de al menos 5 ml/min tiene suficiente permeabilidad al oxígeno para obtener la producción de ventajas tal como se ha descrito en el presente documento.

35 **[0036]** De acuerdo con esto, en una realización preferida, la bolsa es una bolsa permeable a oxígeno que tiene una permeabilidad al aire de al menos 5 ml/min, medida acuerdo con la norma ISO 5636-3, método de Bendtsen. De forma más preferida, la bolsa tiene una permeabilidad al aire de al menos 50 ml/min medida acuerdo con la norma ISO 5636-3, método de Bendtsen, incluso más preferente, la bolsa tiene una permeabilidad al aire de al menos 150 ml/min medida acuerdo con la norma ISO 5636-3, método de Bendtsen y, de forma más preferida, la bolsa tiene una permeabilidad al aire de al menos 250 ml/min medida acuerdo con la norma ISO 5636-3, método de Bendtsen.

40 **[0037]** En términos generales, se cree que, por motivos prácticos, sería difícil fabricar una bolsa adecuada que tuviera una permeabilidad al aire de más de 20.000 ml/min, medida acuerdo con la norma ISO 5636-3, método de Bendtsen.

45 **[0038]** Como sabe un experto en la técnica, la norma ISO 5636-3, método de Bendtsen, se usa, preferentemente, cuando la bolsa comprende material de celulosa (p. ej., papel).

50 **[0039]** Un procedimiento alternativo adecuado en el presente documento para medir la permeabilidad al oxígeno de una bolsa es el procedimiento de ensayo estándar conocido para el índice de transmisión de oxígeno a través de paquetes secos, usando un sensor colorimétrico realizado de acuerdo con la norma conocida del Instituto Nacional Estadounidense de Estándares (American Standards National Institute), documento/norma ASTM 1307-02.

[0040] Este procedimiento de prueba ASTM F1307-02 abarca un procedimiento para la determinación del índice en equilibrio de la transmisión de gas oxígeno en envases. Más específicamente, el procedimiento es aplicable a envases que durante un uso normal incluirán un entorno seco.

55 **[0041]** Como se usa en el presente documento, un aparato adecuado para realizar este procedimiento de prueba ASTM F1307-02 es un aparato comercialmente disponible MOCON®. El procedimiento de prueba ASTM F1307-02 se puede usar para prácticamente cualquier material de bolsa adecuado (p. ej., papel o plástico) y, por tanto, en el presente documento es el procedimiento de prueba de la permeabilidad al oxígeno más preferido.

60 **[0042]** La unidad del procedimiento de prueba ASTM F1307-02 es cm³ de oxígeno por bolsa al día.

[0043] Sin desear quedar limitado a teoría alguna, se cree que una bolsa con una permeabilidad al aire de al menos 10 cm³ de oxígeno por bolsa al día tiene suficiente permeabilidad al oxígeno para obtener la producción de ventajas tal como se ha descrito en el presente documento.

- [0044]** En una realización preferida, la bolsa tiene una permeabilidad al oxígeno de al menos 10 cm³ de oxígeno por bolsa al día, medida de acuerdo con el procedimiento de prueba estándar para el índice de transmisión de oxígeno a través de envases secos usando un sensor colorimétrico mediante el estándar conocido del Instituto Nacional Estadounidense de Estándares documento/estándar ASTM F1307-02. Más preferido es que la bolsa tenga una permeabilidad al oxígeno de al menos 10 cm³ de oxígeno por bolsa al día, todavía más preferido es que la bolsa tenga una permeabilidad al oxígeno de al menos 20 cm³ de oxígeno por bolsa al día, incluso más preferido es que la bolsa tenga una permeabilidad al oxígeno de al menos 50 cm³ de oxígeno por bolsa al día y lo más preferido es la que bolsa tenga una permeabilidad al oxígeno de al menos 100 cm³ de oxígeno por bolsa al día.
- 10 **[0045]** Como se ha comentado con anterioridad, se demuestra en el ejemplo de trabajo 1 que usando una bolsa tal como se describe en el presente documento (véase la bolsa en la figura 3) para la producción industrial de ácaros se obtiene al menos el mismo rendimiento de ácaros por g de medio que un matraz Erlenmeyer de 250 ml que solo comprende aproximadamente 30 g de medio (véase el matraz en la figura 1, un espacio libre relativamente grande por encima del medio). Una razón de esto es el mejor y más uniforme suministro de oxígeno en las bolsas, que
- 15 permite un crecimiento eficiente de los ácaros en bolsas a pesar de un relativamente poco espacio abierto alrededor del medio en las bolsas. Como se hace evidente a partir de lo anterior, esto proporciona la posibilidad de introducir más bolsas (es decir, más medio y, por tanto, más ácaros) en un cuarto de producción, en comparación con el uso de matraces y, por tanto, se pueden producir muchos más ácaros dentro del mismo cuarto de producción.
- 20 **[0046]** Un modo alternativo de analizar si una bolsa tiene una permeabilidad al oxígeno preferida es comparar la producción de los ácaros en la bolsa con la producción de un matraz Erlenmeyer estándar de 250 ml que comprenden 30 g de medio y se cierra con un tapón de algodón (ilustrado en el matraz de la figura 1).
- [0047]** De acuerdo con esto, en una realización preferida, la bolsa tiene una permeabilidad al oxígeno que es
- 25 suficiente para proporcionar al menos un 65% del rendimiento de ácaros por g de medio en la bolsa en comparación con el rendimiento en un matraz Erlenmeyer de 250 ml que comprende 30 g de medio y se cierra con un tapón de algodón, e el que los ácaros en la bolsa y el matraz Erlenmeyer se cultiva en condiciones idénticas, es decir usando el mismo medio de crecimiento, las mismas condiciones de crecimiento, el mismo periodo de tiempo y el mismo cuarto de producción.
- 30 **[0048]** Más preferido es que la bolsa tenga una permeabilidad al oxígeno que es suficiente para proporcionar al menos un 80% del rendimiento de ácaros por g de medio en la bolsa en comparación con el rendimiento en un matraz Erlenmeyer de 250 ml que comprende 30 g de medio y se cierra con un tapón de algodón, incluso más preferido, la bolsa tiene una permeabilidad al oxígeno que es suficiente para proporcionar al menos un 90% del
- 35 rendimiento de ácaros por g de medio en la bolsa en comparación con el rendimiento en un matraz Erlenmeyer de 250 ml que comprende 30 g de medio y se cierra con un tapón de algodón y más preferido, la bolsa tiene una permeabilidad al oxígeno que es suficiente para proporcionar al menos el mismo rendimiento de ácaros por g de medio en la bolsa en comparación con el rendimiento en un matraz Erlenmeyer de 250 ml que comprende 30 g de medio y se cierra con un tapón de algodón, en el que la bolsa y el matraz Erlenmeyer se cultiva en condiciones
- 40 idénticas, es decir usando el mismo medio de crecimiento, las mismas condiciones de crecimiento, el mismo periodo de tiempo y el mismo cuarto de producción.

Materiales para bolsas y otras características de la bolsa

- 45 **[0049]** Para proporcionar una bolsa con la permeabilidad al oxígeno relevante en el presente documento se podrían usar muchos materiales para bolsa diferentes adecuados.
- [0050]** En una realización preferida, la bolsa es una bolsa fabricada con al menos un material seleccionado del grupo de materiales que consisten en un material de celulosa (p. ej., papel), un material plástico y un textil (tejido o
- 50 no tejido). También se pueden usar combinaciones de estos materiales.
- [0051]** Ejemplos de materiales plásticos adecuados incluyen polipropileno, polietileno, PVC, policarbonato, poliuretano, nylon, viscosa y poliéster.
- 55 **[0052]** El material plástico puede ser transparente para permitir la inspección del crecimiento/madurez del ácaro directamente usando, por ejemplo, un microscopio estereoscópico sin tener que sacar una muestra de la bolsa. De acuerdo con esto, se prefiere que una parte de la bolsa esté hecha de material plástico transparente.
- [0053]** Cuando se usa, por ejemplo, un microscopio estereoscópico, para la inspección visual a través del material
- 60 transparente, generalmente la madurez del cultivo de ácaros se analiza como el número de ácaros por campo visual (p. ej., número de ácaros por g).
- [0054]** La bolsa como tal simplemente tiene que tener suficiente área transparente para poder proporcionar una idea adecuada de la madurez del cultivo de ácaros dentro de la bolsa. Preferentemente, la bolsa comprende al
- 65 menos 10% de área transparente de la superficie total de la bolsa, más preferentemente la bolsa comprende al

menos 25% del área transparente de la superficie total de la bolsa e incluso más preferentemente la bolsa comprende al menos 50% del área transparente de la superficie total de la bolsa. Una bolsa que comprende al menos 50% del área transparente de la superficie total de la bolsa es, adecuadamente, una bolsa en la que un lado está hecho de material plástico transparente, tal como se ilustra en la figura 3.

5

[0055] Ejemplos de material de celulosa adecuado incluyen cartón o, más preferentemente, papel.

[0056] Normalmente, los materiales textiles no tejidos están hechos de fibras poliméricas, tal como fibras de polipropileno o polietileno. Los materiales textiles tejidos podrían ser, por ejemplo, algodón.

10

[0057] Es obvio que la bolsa debe ser de un material del cual los ácaros dentro de la bolsa cerrada esencialmente no deben ser capaces de escapar a través del material como tal (puede ser que algunos ácaros sí escapen por algunos de los orificios pequeños en la bolsa, pero esto no se entiende como un escape a través del material como tal).

15

[0058] En términos generales, un material de celulosa (preferentemente papel) es más permeable al oxígeno que la mayoría del material plástico relevante en el presente documento. Por otro lado, el material plástico puede ser transparente.

20 **[0059]** En una realización preferida, la bolsa está hecha de papel, material plástico transparente y, opcionalmente, también otros materiales adecuados.

[0060] Conforme a esto, una bolsa preferida es una bolsa en la que:

- 25 1: un lado de la bolsa consiste en, esencialmente, un material de celulosa (preferentemente papel); y
 2: el otro lateral de la bolsa consiste esencialmente en un material plástico transparente.

[0061] Un ejemplo de dicha bolsa se ilustra en la figura 3.

30 **[0062]** La expresión “que consiste esencialmente en” debe entenderse como el experto en la técnica lo entendería en el presente contexto. El experto entendería que, con el fin de poseer la mejora significativa por encima del uso de matraces, las bolsas preferidas, como se han descrito anteriormente, no tiene que consistir en 100% de un material de celulosa (preferentemente papel) en un lado y 100% de un material plástico transparente en el otro lado. Por ejemplo, puede comprender 90% de material de celulosa (preferentemente papel) en un lado y 90% de material
 35 plástico transparente en el otro lado.

[0063] La bolsa como se usa en el presente documento debería ser, preferentemente, de materiales de grado médico. Un ejemplo de una bolsa de grado médico es una bolsa adecuada para usar para esterilizar material en un autoclave. En el mercado existen numerosas bolsas comerciales. Las bolsas adecuadas para esterilizar material en
 40 un autoclave y usadas en los ejemplos de trabajo del presente documento están disponibles comercialmente en Westfield Medical Ltd, Reino Unido.

[0064] Generalmente, una bolsa de grado médico se normaliza de acuerdo con, por ejemplo, las normas y, en general, deben cumplir varios criterios. Por ejemplo, la porosidad debe ser lo suficientemente baja para evita que la
 45 atraviesen bacterias y microorganismos; debe ser lo suficientemente permeable al vapor, pero no a microorganismos; debe ser lo suficientemente resistente como para poder manipularse y debe estar esencialmente sin toxinas que pudieran entrar en contacto con el producto. Normalmente, las bolsas adecuadas de grado médico están hechas de papel y plástico médico.

50 **[0065]** De acuerdo con esto, en una realización preferida, la bolsa, tal como se ha descrito en el presente documento, es una bolsa de grado médico, en la que la porosidad es lo bastante baja como para permitir que la crucen las bacterias y microorganismos; es suficientemente permeable al vapor, pero no a microorganismos y, de este modo, tampoco alojan ácaros de polvo; es lo suficientemente resistente a la manipulación y está esencialmente libre de toxinas que pudieran entrar en contacto con los ácaros dentro de la bolsa.

55

[0066] El tamaño de la bolsa en el presente contexto no es esencial. No obstante, por motivos prácticos, se prefiere que el tamaño de la bolsa sea de 20 mm a 200 mm (anchura) x de 40 mm a 4000 mm (longitud) x con una posibilidad de extenderse a una altura adecuada con el fin de que la bolsa pueda comprender una cantidad relevante del medio de cultivo para ácaros tal como se especifica en el punto (iii) del primer aspecto de la invención.

60

[0067] La bolsa, como se muestra en la figura 3 y se usan en los ejemplos de trabajo del presente documento, es una bolsa que tiene 300 mm (anchura) x 500 (longitud) x con una posibilidad de extenderse a una altura de 65 mm.

[0068] En una realización preferida, el tamaño de la bolsa es de 50 mm a 1000 mm (anchura) x de 100 mm a
 65 1.500 mm (longitud) x con una posibilidad de extenderse a una altura adecuada con el fin de que la bolsa pueda

comprender una cantidad relevante del medio de cultivo para ácaros tal como se especifica en el punto (iii) del primer aspecto de la invención.

[0069] Muchas bolsas adecuadas están hechas de material barato, tal como, por ejemplo, papel o material de plástico barato. De acuerdo con esto, una ventaja del uso de bolsas como se ha tratado en el presente documento es que se pueden tirar después de usar para la producción de los ácaros, es decir, la bolsa no se reutiliza en una producción posterior de ácaros. Un matraz Erlenmeyer es bastante caro y, por tanto, debe limpiarse después del uso para utilizarse en una producción posterior de ácaros.

[0070] El procedimiento de la invención se puede usar para producir ácaros a gran escala para usar en la producción de productos alérgenos para usar en el diagnóstico de la alergia y el tratamiento de la alergia mediante inmunoterapia y también para producir ácaros, por ejemplo ácaros depredadores, para usar como agentes biológicos de control de plagas en cosechas e invernaderos.

Ácaros de polvo domésticos u ácaros de bodega o del bulbo

[0071] En una realización de la invención, el ácaro es un ácaro de polvo doméstico.

[0072] En otra realización, el ácaro es un ácaro de bodega, o un ácaro del bulbo.

[0073] En una realización preferida, el ácaro es un ácaro del orden de los Acariformes, más preferentemente del suborden Astigmata o Prostigmata.

[0074] El procedimiento, tal como se ha descrito en el presente documento, se puede usar para producir diferentes especies de ácaro al mismo tiempo, por ejemplo una bolsa individual puede comprender diferentes especies de ácaros.

[0075] Un ácaro preferido en el presente documento, dentro del orden de los Acariformes, subórdenes Astigmata y Prostigmata, es al menos un ácaro seleccionado del grupo que consiste en las familias siguientes Chortoglyphidae, Pyroglyphidae, Acaridae y Glyciphagidae. Ejemplos adecuados dentro de estas familias son *Dermatophagoides*, *Tyrophagus* *Lepidoglyphus*, *Glyciphagus*, *Acarus*, *Euroglyphus*, *Blomia*, *Pyroglyphus*, *Chortoglyphus* o *Cheyletus*. Algunos de estos ácaros pertenecen al grupo conocido como ácaros del polvo domésticos, otros son conocidos como ácaros de bodega o ácaros del bulbo, y pueden encontrarse en el polvo doméstico.

[0076] Los ácaros cultivados y producidos en el presente documento son ácaros seleccionados del grupo que consiste en las especies siguientes: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides microceras*, *Dermatophagoides siboney*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Lepidoglyphus destructor*, *Glyciphagus domesticus*, *Acarus siro*, *Euroglyphus maynei*, *Blomia kulagini*, *Blomia tropicalis* y *Pyroglyphus africanus*.

[0077] Dentro del grupo anterior, los ácaros del polvo domésticos más preferidos son *Dermatophagoides pteronyssinus* o *Dermatophagoides farinae*.

Ácaros depredadores

[0078] Los ácaros depredadores son ácaros que son depredadores de plagas, en particular de plagas de cultivos, tales como insectos, nematodos o arácnidos. Normalmente, los ácaros depredadores serán útiles para controlar plagas de cultivos habituales, tales como arañas y mosca blanca.

[0079] La mayoría de los ácaros depredadores pertenecen a la familia Phytoseiidae (orden Acarina) y los ácaros depredadores más frecuentes en invernaderos son *Amblyseius swirskii*, *Phytoseiulus persimilis*, *Amblyseius californicus*, *Amblyseius cucumeris*, *Amblyseius degenerans* y *Hypoaspis miles*.

[0080] Otros ácaros depredadores incluyen *Euseius tulalpharensis*, *Typhlodromus occidentalis*, *Typhlodromus pyri*, *Zetzellia* *malphali*, *Amblyseius* (*Iphiseius*) *degenerans*, *Amblyseius* (*Kalphampimodromus*) *alphaberralphans*, *Amblyseius* (*Neoseiulus*) *balpharkeri*, *Amblyseius* *alphandersoni*, *Amblyseius* (*Neoseiulus*) *alphallalphacis*, *Amblyseius* (*Euseius*) *finlalphandicus*, *Amblyseius* (*Typhi odromalphalus*) *lalphailalphae*, *Amblyseius* (*Typhlodromalphalus*) *limonicus*, *Amblyseius* (*Typhlodromips*) *montdorensis*, *Amblyseius* (*Euseius*) *ovalphalis*, *Amblyseius* (*Euseius*) *scutalis*, *Amblyseius* (*Euseius*) *stipulatus* y *Amblyseius* (*Neoseiulus*) *womersleyi* (también conocido como *Amblyseius longispinosus*). Esta lista no es exhaustiva. McMurtry y col. (Annual Review of Entomology 42, 291-321) clasifica la diversidad de estadios de vida en Phytoseiidae en función de, principalmente, los hábitos alimentarios y características biológicas y morfológicas relacionadas. Dado que la taxonomía de los ácaros está cambiando continuamente, el número y especie de los ácaros clasificados como ácaros depredadores puede cambiar (véase, por ejemplo, el Catálogo de Phytoseiidae de Moraes y col. Publicado en 2004 que enumera 2.250 especies, en comparación con la edición anterior publicada en 1986 en la que se enumeraban solo 150 especies).

[0081] El uso de estos ácaros depredadores para control de plagas se describe con más detalle en el documento WO 2008/015393.

[0082] El procedimiento, tal como se describe en el presente documento, se puede usar, pero no de acuerdo con la invención, para proporcionar una fuente de ácaros depredadores para el control de plagas en cultivos e invernaderos. Un depredador concreto se seleccionará sobre la base de la plaga objetivo que se va a controlar y el cultivo al que se va a aplicar el depredador.

[0083] Por ejemplo, los ácaros depredadores se pueden usar para controlar una o más de las plagas de la siguiente lista no exhaustiva: *Tetranychus* spp., incluidos, entre otros, *Tetranychus urticae*, *T. cinnabarinus*, *T. kanzawai*, *T. turkestanii*, *T. occidentalis*; *Oligonychus* spp.; *Panonychus ulmi* y *P. citri*; ácaros Eriophyid, incluidos, entre otros, *Aculops lycopersici*, *Aculus schlectendali*, *Phyllocoptruta oleivora*, *Aceria ficus*, *Rhyncaphytoptus ficifoliae*; ácaros Tarsonemid incluidos, entre otros, *Polyphagotarsonemus latus*, *Phytonemus pallidus*; plagas de arañuelas, incluidos, entre otros, *Frankliniella occidentalis*, *F. intonsa*, *F. schultzei*, *Thrips tabaci*, *T. palmi*, *Echinothrips americanus*, *Heliethrips haemorrhoidalis*; y plagas de mosca blanca, incluidos, entre otros, *Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci*, *Aleyrodes proletella*, *A. lonicerae*.

[0084] Se prefiere escoger un ácaro depredador que no produzca daños a la planta del cultivo en sí. Los ácaros depredadores se pueden usar para controlar plagas en una o más de las plantas de cultivo de la siguiente lista no exhaustiva: tomate, pimentón dulce, pimiento de chile, berenjena, pepino, judías, calabacín, melón, fresa, frambuesa, banana, papaya, manzana, pera, ciruela, uvas, rosas, crisantemos, begonias, ciclamen, poinsettia, cítricos, *skimmia*, *choisya*, *dafne* y *magnolia*.

[0085] El procedimiento, tal como se describe en el presente documento, se puede usar, pero no de acuerdo con la invención, para proporcionar una fuente de ácaros depredadores para el control de arañuelas (*Frankliniella occidentalis* o *Thrips tabaci*) y/o mosca blanca (tales como *Trialeurodes vaporariorum* o *Bemisia tabaci*). El procedimiento, tal como se describe en el presente documento, se puede usar, pero no de acuerdo con la invención, para proporcionar una fuente de ácaros depredadores para el control de plagas en cultivos e invernaderos.

30 Medios de crecimiento sólidos adecuados:

[0086] Los ácaros de polvo domésticos y algunos otros ácaros viven de forma natural en casas, por ejemplo en camas. Los ácaros de polvo domésticos se alimentan principalmente de escalas o escamas de piel humana.

35 **[0087]** No obstante, en principio, cualquier medio de crecimiento sólido adecuado se puede usar para la producción de ácaros en una bolsa, tal como se describe en el presente documento.

[0088] De hecho, las ventajas de usar una bolsa para la de ácaros, tal como se describe en el presente documento, se pueden ver como ventajas relativas/comparativas en el uso de la técnica anterior de un matraz o un bote. Para dichas ventajas relativas/comparativas, el medio como tal no es tan importante, ya que para realizar ejemplos comparativos adecuados se usa el mismo medio tanto en las bolsas como en los matraces.

[0089] La técnica anterior describe numerosos medios diferentes adecuados para cultivar diferentes ácaros relevantes en el presente documento, tales como ácaros del polvo domésticos. A continuación se proporciona un breve resumen de ejemplos de medios relevantes.

[0090] Los ácaros requieren un área o espacio para vivir en el que realizar sus actividades. El área proporcionada por la superficie interior de un contenedor de cultivo (p. ej., una bolsa o matraz) es relativamente pequeña en comparación con el área que podría explotarse para el volumen del contenedor. Un sustrato inerte o parcialmente inerte puede incrementar el área en órdenes de magnitud.

[0091] Un medio recomendado para cultivar ácaros incluye normalmente 2 ingredientes o, si sólo se incluye 1 ingrediente, porciones del material no son comestibles.

55 **[0092]** Casi todos los medios (dietas) utilizados con regularidad contienen una cantidad significativa de proteína (p. ej., de levadura).

[0093] Se han realizado numerosos estudios de la eficacia de diferentes ingredientes del medio de cultivo, tal como: levaduras, albúminas, alimentos para animales, alimentos para peces, piel humana desprendida, escalas de piel, hígado animal en polvo, harina de soja.

[0094] En una realización preferida, el medio es un medio que comprende al menos uno de los ingredientes seleccionados del grupo que consiste en levaduras, albúminas, derivados de pescado, hígado animal en polvo, harina de soja, hidrolizado de proteínas de la leche, vitaminas, minerales y un hidrolizado proteico. El medio comprende, preferentemente, dos o más de estos ingredientes.

[0095] Puede preferirse usar un hidrolizado proteico que no comprenda alérgenos que puedan causar reacciones anafiláticas en pacientes sensibilizados.

[0096] Preferentemente, el medio se calienta y se seca a 160 °C antes de usar. Normalmente esto se realiza antes de que el medio se introduzca en la bolsa.

[0097] Para cultivar ácaros depredadores como se ha mencionado con anterioridad, se requiere la presencia de ácaros presa en el medio. El medio puede contener también un medio que sirva como dieta para los ácaros presa.

[0098] Los ácaros presa más usados son ácaros de productos almacenados, tales como *Tyrophagus putrescentiae*, *Acarus siro* y *Carpoglyphus lactis*. El documento GB2393890 revela que *A. cucumeris* se puede criar usando *Tyrophagus putrescentiae*, *T. tropicus*, o *Acarus siro*. Ramakers y col. (Bulletin-SROP 6(3), 203-206) revela que la cría de *Amblyseius mckenziei* y *A. cucumeris* se puede llevar a cabo usando BRAN de trigo como fuente principal de alimento y *Acarus farris* como presa sustituta. Nomikou y col. (Experimental and Applied Acarology 27 1-2), 57-68) revelan que *Tyrophagus putrescentiae* se puede usar como fuente de alimentos para *Typhlodromips* (*Amblyseius*) *swirskii*, para obtener proporciones elevadas de depredadores/presas. Steiner y col. (Australian Journal of Entomology 42, 24-130) revelan que *Tyrophagus putrescentiae* se puede usar como fuente de alimentos para *Typhlodromips montdorensis*. En el documento WO2006/057552 se revela que *Amblyseius swirskii* se puede criar en ácaros astogmátidos, tales como ácaros de las familias *Carpoglyphidae*, *Pyroglyphidae*, *Glyciphagidae* o *Acaridae*. En particular, revela que *Carpoglyphus actis* se puede usar como ácaro de presa para criar *A. swirskii*. También se ha descrito el uso de varias especies de ácaros de productos almacenados para criar el ácaro depredador *Amblyseius cucumeris*.

[0099] Los ácaros presa se pueden cultivar usando un medio que comprende al menos uno de los ingredientes seleccionados del grupo que consiste en levaduras, albúminas, derivados de pescado, hígado animal en polvo, harina de soja, hidrolizado de proteínas de la leche, vitaminas, minerales y un hidrolizado proteico. El medio comprende, preferentemente, dos o más de estos ingredientes. Algunos ácaros necesitan una dieta rica en azúcares. El documento WO 08/015393 describe con más detalle una dieta preferida para ácaros de presa.

30 Condiciones de cultivo generales adecuadas

[00100] El experto en la técnica conoce o puede identificar de forma rutinaria condiciones de cultivo adecuadas para un ácaro de interés específico. En general, las condiciones de cultivo descritas en la técnica cuando se cultiva un matraz o un bote se pueden usar como condiciones de cultivo adecuadas en una bolsa, tal como se describe en el presente documento.

[00101] A continuación se proporciona un resumen de condiciones de cultivo de ácaros adecuadas.

[00102] Generalmente, los ácaros domésticos crecen bien a temperatura ambiente, como cabría esperar de especies que están presentes casi universalmente en las casas. En general, la temperatura adecuada para cultivo de ácaros es de 23°C ± 2 °C. Temperaturas por debajo de 10 °C y por encima de 35 °C en general no son adecuadas para la mayoría de los ácaros relevantes. Una temperatura adecuada preferida en el presente documento puede ser de 23°C ± 5 °C.

[00103] La humedad del aire es un factor importante. Una serie de ácaros relevantes (p. ej., *D. farinae*) es capaz de extraer agua del aire si la humedad relativa (HR) es superior a 70 %. En general, una humedad demasiado alta no es adecuada porque el medio de cultivo que no es 100% estéril se destruirá si la humedad es lo bastante alta como para albergar crecimiento bacteriano o fúngico significativo.

[00104] En general, se puede decir que una humedad adecuada podría ser de 70 a 85% HR.

[00105] Un periodo de cultivo adecuado dependerá del ácaro de interés específico. Dependiendo de la especie, el desarrollo de los huevos pasando por larvas, protoninfa, tritoinfa hasta ácaros adultos puede requerir alrededor de un mes en cultivos adecuados,

[00106] La técnica anterior describe que, para algunas condiciones de cultivo, el contenido óptimo de proteínas de ácaros en el cultivo de ácaros (para extracción de alérgenos) se consigue tras 5-16 semanas, por ejemplo para *D. Dermatophagoides*.

[00107] En términos generales y para muchos de los ácaros relevantes del presente documento criados en condiciones de cultivo adecuadas, el periodo de cultivo es de 1 a 24 semanas, normalmente de 4 a 20 semanas.

Características de la bolsa durante el cultivo

[00108] Durante el procedimiento de cultivo de ácaros, el medio de cultivo que comprende los ácaros en crecimiento/cultivados está presente como una capa relativamente fina dentro de la bolsa, para dar una superficie relativamente grande.

5

[00109] En una realización preferida, el medio de cultivo que comprende los ácaros en crecimiento/cultivados está presente como una capa relativamente fina dentro de la bolsa, para dar una superficie relativamente grande, definida como una capa de cultivo de altura inferior a 90 mm, más preferido de altura inferior a 70 mm, incluso más preferido de altura inferior a 60 mm y en su mayoría inferior a 55 mm de altura. En una realización muy preferida, la capa de

10 cultivo tiene una altura de 10 a 50 mm.

[00110] Durante el procedimiento de cultivo de ácaros, la bolsa cerrada comprende al menos 25 g de medio. Como se ha tratado anteriormente, una ventana de usar bolsas en la producción de ácaros se refiere a la posibilidad de realizar una producción industrial de ácaros más eficiente.

15

[00111] De acuerdo con esto, en una realización preferida, la bolsa cerrada comprende al menos 100 g de medio, más preferido al menos 400 g de medio, todavía más preferido al menos 750 g de medio y más preferido al menos 1000 g de medio.

[00112] Como se ha tratado anteriormente, el mejor y más uniforme suministro de oxígeno en las bolsas, que permite un crecimiento eficiente de los ácaros en bolsas con un relativamente poco espacio abierto alrededor del medio en las bolsas. Esto proporciona la posibilidad de tener más bolsas (es decir, más medio) en un cuarto de producción, en comparación con el uso de matraces y, por tanto, se pueden producir muchos más ácaros dentro del mismo cuarto de producción física.

25

[00113] En comparación con un matraz o un bote, una bolsa es más flexible y, por tanto, puede cambiar de forma relativamente más fácil (p. ej., se puede plegar). En el presente contexto, una bolsa puede, por ejemplo, tomar una forma (p. ej., plegarse) alrededor del medio de cultivo del ácaro con el fin de contener relativamente poco espacio libre abierto alrededor del medio dentro de la bolsa (véase, por ejemplo, la figura 3 en el presente documento).

30

[00114] En una realización preferida, durante el cultivo de los ácaros del polvo hay relativamente poco espacio libre dentro de la bolsa cerrada, lo que significa que el medio de cultivo ocupa al menos un 30 % del volumen total de la bolsa cerrada con medio, dado que la bolsa cerrada con medio está físicamente presente en el cuarto de producción durante el cultivo de los ácaros del polvo. Más preferido, el medio de cultivo ocupa al menos un 50% del volumen total de la bolsa cerrada con medio, incluso más preferido, el medio de cultivo ocupa al menos un 70% del volumen total de la bolsa cerrada con medio y más preferido, el medio de cultivo ocupa al menos un 80% del volumen total de la bolsa cerrada con medio, ya que la bolsa cerrada con medio está físicamente presente en el cuarto de producción durante el cultivo de los ácaros del polvo.

35

[00115] La expresión “ya que la bolsa cerrada con medio está físicamente presente en el cuarto de producción”, debe entenderse como el experto en la técnica entendería en el presente contexto. Por ejemplo, en una bolsa abierta tal como se ilustra en la figura 5, hay más espacio libre que en una bolsa cerrada, tal como se ilustra en la figura 3. Como entiende el experto en la técnica en el presente contexto, una bolsa abierta tal como se ilustra en la figura 5 no es una bolsa cerrada como está físicamente presente en el cuarto de producción.

45

Uso de una serie de bolsa para cultivo de ácaros

[00116] Como se ha tratado anteriormente, las bolsas, tal como se describe en el presente documento, pueden apilarse con relativa facilidad en, por ejemplo, un estante organizador, tal como se muestra en la figura 4, y, en consecuencia, es posible tener numerosas bolsas apiladas en una estancia de producción industrial relevante (véase, por ejemplo, la figura 4). El resultado final es que el uso de las bolsas aumenta significativamente la capacidad de producción en un cuarto (puede contener más medio para ácaros y, por tanto, ácaros) en comparación con el uso de matraces;

50

[00117] De acuerdo con esto, en una realización preferida, el cuarto de producción comprende al menos 10 bolsas, más preferido al menos 50 bolsas, incluso más preferido al menos 1000 bolsas y, más preferido, al menos 10.0000 bolsas.

55

[00118] Por motivos prácticos, es difícil imaginar que un cuarto de producción puede ser tan grande que puede comprender más de 1.000.000 bolsas.

60

[00119] Las bolsas están apiladas encima unas de otras en un sistema organizador adecuado, en el que la superficie superior de una bolsa de abajo no toca la superficie inferior de una bolsa de encima.

[00120] De acuerdo con lo anterior, se prefiere que las bolsas se apilen en un sistema organizador como se ilustra en la figura 4.

[00121] En una realización preferida, el cuarto de producción comprende un sistema organizador adecuado con al menos 2 bolsas apiladas encima una de la otra, más preferido con al menos 5 bolsas apiladas una encima de otra y
5 incluso más preferido el cuarto de producción comprende un sistema organizador adecuado con al menos 8 bolsas apiladas encima una de la otra.

[00122] Una ventaja de tener las bolsas apiladas una encima de otra es que un contenedor común/sencillo en la parte inferior del estante organizador es suficiente para atrapar ácaros que puedan escapar de las bolsas. Un
10 ejemplo de esto se muestra en la figura 4, en la que el contenedor de atrapamiento es una bandeja metálica. El contenedor de atrapamiento puede comprender de forma ventajosa un material de atrapamiento, tal como, por ejemplo, parafina o lanolina.

[00123] Cuando se usan matraces, dicho contenedor de atrapamiento tiene que colocarse alrededor de cada
15 matraz individual, ya que los matraces no se apilan fácilmente uno encima de otro.

[00124] De acuerdo con esto, en una realización preferida, el sistema de estante organizador adecuado con al menos 2, 5 u 8 bolsas apiladas una encima de otra comprende un contenedor común/sencillo en la parte inferior del estante organizador para atrapar ácaros que puedan escapar de una bolsa. Un ejemplo de dicho contenedor de
20 atrapamiento es una bandeja tal como, por ejemplo, una bandeja de plástico o metálica. En una realización preferida, el contenedor de atrapamiento comprende un material de atrapamiento, tal como, por ejemplo, parafina o lanolina.

[00125] En una realización preferida, el cuarto de producción comprende al menos 2 sistemas de estante organizador, como se ha descrito anteriormente, más preferido al menos 10 sistemas de estante organizador, como se ha descrito anteriormente, incluso más preferido al menos 20 sistemas de estante organizador, como se ha descrito anteriormente y, más preferido, al menos 100 sistemas de estante organizador, como se ha descrito anteriormente.

Por motivos prácticos, es difícil imaginar que un cuarto de producción puede ser tan grande que puede comprender
30 más de 200.000 sistemas de estante organizador como se ha descrito anteriormente.

Aislamiento/extracción de alérgenos de ácaros

[00126] Un objetivo principal de la producción industrial en masa de ácaros relevante es aislar/extraer alérgenos de
35 ácaros para preparar extractos alergénicos usados en formulaciones para alergia para usar en, por ejemplo, pruebas de alergia in vivo o in vitro, o en preparaciones de desensibilización administradas a pacientes.

[00127] La extracción se puede realizar en el cultivo entero, en el que se obtienen los alérgenos de los ácaros y de las partículas fecales de los ácaros. Se sabe que las partículas fecales de los ácaros son una fuente importante de
40 alérgenos de ácaros del polvo domésticos.

[00128] Los ácaros se pueden separar del medio de cultivo y/o las partículas fecales por medio de procedimientos físicos, tales como tamizado o flotación en varias soluciones.

[00129] El material bruto alergénico sufre, en general, un procedimiento de extracción en solución acuosa (p. ej., solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución de bicarbonato amónico, 0,05-0,125 mol/l etc.) con agitación, a un pH de 5-9. De este modo, las proteínas alergénicas se disuelven en el sobrenadante, mientras que la mayoría de los componentes del cultivo no se disuelven.

[00130] El sobrenadante se recupera (p. ej., tras centrifugación) y se aíslan los alérgenos con un tamaño adecuado en kDa (normalmente mayor que 5 kDa). Dicho en otras palabras, las "impurezas" de bajo peso molecular (en general inferior a 5kDa) se eliminan mediante, por ejemplo, diálisis sobre una membrana con un punto de corte de 5 kDa, ultrafiltración o cromatografía por tamiz molecular.

[00131] La actividad alergénica de los alérgenos aislados puede determinarse mediante una serie de procedimientos conocidos, tales como ELISA o inhibición Rast.

[00132] Por último, el producto alergénico del ácaro se formula con la adición de, por ejemplo, excipientes adecuados y, después, se puede someter a filtración estéril y liofilización. Normalmente, el extracto contiene de 5-60
60 % de alérgenos del Grupo 1 (respecto al contenido total de proteínas) y habitualmente también contiene alérgenos del Grupo 2, 3 y otros en proporciones menores. Aparte del extracto alergénico liofilizado, una composición farmacéutica final adecuada puede contener excipientes farmacéuticos relevantes. La composición farmacéutica puede ser, por ejemplo, una solución inyectable o una composición para administración oral.

[00133] Por supuesto, se puede purificar adicionalmente el extracto alergénico de ácaros para obtener muestras más puras que contienen, por ejemplo, alérgenos relevantes purificados del Grupo 1, tal como los alérgenos Der p1 (Dermatophagoides pteronyssinus), Der f1 (D. farinae), Eur m1 (Euroglyphus maynei), Der s1 (D. siboney).

5 [00134] En una realización, la invención se refiere al procedimiento, tal como se describe en el presente documento, en el que el procedimiento se sigue de etapas posteriores adecuadas con el fin de aislar una composición alergénica de ácaros adecuada que después se incorpora en una composición farmacéutica adecuada.

EJEMPLOS

10 Ejemplo 1 – cultivo de ácaros en bolsas

Materiales:

Especie de ácaros: D. farinae

15

[00135] *Medio:* El medio era un medio de cultivo de ácaros estándar que comprende, esencialmente, hidrolizados de proteínas, levaduras, vitaminas y minerales.

20 [00136] *Bolsa:* Una bolsa para la esterilización de materiales en un autoclave, en la que un lateral está hecho de material de papel permeable al oxígeno y el otro lateral está hecho de material plástico transparente. El tamaño de la bolsa es 300 mm (anchura) x 500 (longitud) con una posibilidad de extenderse a una altura de 65 mm. La bolsa está comercialmente disponible en Westfield Medical Ltd, Reino Unido.

Procedimiento de cultivo:

25

[00137] En cada bolsa se introdujeron 500 g de medio (ilustrado en la figura 5). El medio se sembró con una muestra de cultivos de siembra convencionales de *D. farinae* y la bolsa se selló/cerró después (una bolsa cerrada se ilustra en la figura 3).

30 [00138] El cultivo tuvo lugar en un cuarto de producción a una temperatura de 23 °C (± 2) a una humedad relativa (HR) de 80% (± 5 %).

[00139] Usando un microscopio estereoscópico se inspeccionó la madurez del cultivo de ácaros mediante inspección visual a través del material plástico transparente.

35

[00140] Cuando se consideró que la madurez era óptima, se recogió el cultivo.

[00141] El cultivo se usó para obtener alérgenos de los cuerpos y heces de los ácaros. Las dos fracciones (heces y cuerpos) se separaron mediante tamizado.

40

[00142] Al preparar los extractos de las dos fracciones (heces y cuerpos), el material bruto alergénico se extrajo en solución salina con un homogeneizador (Ultraurax) durante 10-20 minutos a 6 °C. De este modo, las proteínas alergénicas se disolvieron en el sobrenadante.

45 [00143] El sobrenadante se recuperó tras centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Los alérgenos con un tamaño kDa mayor que 5 kDa se aislaron mediante ultrafiltración.

[00144] La actividad alergénica total de los alérgenos aislados se analizó mediante inhibición de Rast. La actividad alergénica específica se midió mediante ELISA.

50

[00145] Los resultados del análisis de la actividad alergénica en la fracción del cuerpo fueron 2700 µg/g de Der f 1.

[00146] En este cultivo de ejemplo se usó medio de 200 bolsas, lo que significa que se cultivaron 200 x 500 g= 100 kg. Después de tamizar se obtuvieron 3710 g de cultivo de ácaros (ácaros y heces). La cantidad total de Der f 1 obtenida es 2700 µg x 3710 g= 10,017 g de alérgeno purificado de 200 bolsas. De acuerdo con esto, la actividad alergénica por gramo de medio purificado fue 2700 µg/g, pero la cantidad total de alérgeno con 200 bolsas fue 10,017 g.

60 Ejemplo 2 – cultivo de ácaros en matraz- para comparación

[00147] *Matraz:* Matraz Erlenmeyer de 250 ml que comprendía 30 g de medio y se cerró con un tapón de algodón.

[00148] Todas las condiciones de cultivo de ácaros fueron idénticas a las condiciones usadas en la bolsa del ejemplo 1. Se usaron el mismo medio de crecimiento, las mismas condiciones de crecimiento, el mismo periodo de tiempo y el mismo cuarto de producción.

- 5 **[00149]** Se inspeccionó la madurez del cultivo de ácaros y cuando se considera que la madurez era óptima, se recogió el cultivo.

[00150] La extracción y aislamiento de los alérgenos se realizó como en el Ejemplo 1. La actividad alérgica se analizó como en el Ejemplo 1.

10

[00151] Los resultados del análisis de la actividad alérgica fueron 2563 µg/g de Der 1. En este ejemplo se usó medio de 600 matraces, lo que significa que se usaron 300 x 30 g= 18 kg para cultivar ácaros. Después de tamizar se obtuvieron 710 g. La cantidad total de Der f 1 obtenida es 2563 µg x 3710 g= 1,82 g de alérgeno purificado de 600 matraces.

15

[00152] De acuerdo con esto, la actividad alérgica por gramo de medio purificado fue 2563 µg/g, pero la cantidad total de alérgeno con 600 bolsas fue 1,82 g.

Conclusiones derivables del Ejemplo 1 (bolsas) y del Ejemplo 2 (matraz)

20

[00153] La actividad alérgica por gramo de medio fue la misma para la producción de ácaros en bolsas (ejemplo 1) como para la producción de matraces Erlenmeyer (ejemplo 2).

25 **[00154]** Como se ha tratado en el presente documento y se ilustra en los ejemplos de uso de bolsas, en comparación con el uso de matraces, hace posible tener mucho más medio para ácaros dentro del mismo cuarto de producción y, de este modo, la producción total de alérgenos de ácaros por cuarto de producción física es mucho más elevada cuando se usan las bolsas tal como se ha descrito en el presente documento en comparación con el uso de matraces.

30 REFERENCES

1: Documento EP1236394B1 (Stallergenes – familia con el documento US2003/0059445A1)

35

2: T. Batard y col. (Int Arch Allergy Immunol 2006; 140:295-305)

3: F.C. Yi et al (Asian Pacific J. of Allergy and Immunology (1999) 17: 189-194)

4: J. Miyamoto (Japón, J. Exp. Med. Vol, 45, 2. p. 133-138, 1975)

40

5: J. Med Ent. Vol 12, nº 6: 577-621,1976)

6. Ivanov and Petrova describes in Medisinskaja Parazitologija i Parazitarnye Bolezni, 46-49, 1985

45

7. Crop Protection, 5(2): 122-124, 1986

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para cultivar y producir ácaros, que comprende cultivar los ácaros en un medio de crecimiento sólido adecuado, en condiciones adecuadas y durante un periodo de tiempo adecuado en un cuarto de producción
5 adecuado, de modo que los ácaros se seleccionan entre *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides microceras*, *Dermatophagoides siboney*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Lepidoglyphus destructor*, *Glycyphagus domesticus*, *Acarus siro*, *Euroglyphus maynei*, *Blomia kulagini*, *Blomia tropicalis* y *Pyroglyphus africanus* y los ácaros se cultivan en un medio comprendido dentro de una bolsa cerrada, en la que:
 - 10 i: la bolsa tiene una permeabilidad al oxígeno que es suficiente para permitir el crecimiento de los ácaros;
 - ii: la bolsa comprende un área que es transparente para permitir la inspección del crecimiento de los ácaros;
 - iii: el medio de cultivo que comprende los ácaros en crecimiento/cultivados está presente en una capa relativamente fina de una altura inferior a 110 mm; y
 - 15 iv: la bolsa cerrada comprende al menos 25 g de medio y donde las bolsas están apiladas encima unas de otras en un sistema organizador adecuado, en el que la superficie superior de una bolsa de abajo no toca la superficie inferior de una bolsa de encima.
2. El procedimiento de la reivindicación 1,
 - 20 en el que la bolsa es una bolsa permeable a oxígeno que tiene una permeabilidad al aire de al menos 150 ml/min, medida de acuerdo con la norma ISO 5636-3, método de Bendtsen; o
 - en el que la bolsa tiene una permeabilidad al oxígeno de al menos 10 cm³ de oxígeno por bolsa al día, medida de acuerdo con el procedimiento de ensayo estándar conocido para el índice de transmisión de oxígeno a través de envases secos usando un sensor colorimétrico mediante el estándar conocido del Instituto Nacional Estadounidense
25 de Estándares documento/estándar ASTM F1307-02; o en el que la bolsa tiene una permeabilidad al oxígeno que es suficiente para proporcionar al menos el mismo rendimiento de ácaros por g de medio en la bolsa en comparación con el rendimiento en un matraz Erlenmeyer de 250 ml que comprende 30 g de medio y está cerrada con un tapón de algodón, en el que la bolsa y el matraz Erlenmeyer se cultivan en condiciones idénticas.
- 30 3. El procedimiento para cultivar y producir ácaros de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la bolsa es una bolsa adecuada para esterilizar material en autoclave.
4. El procedimiento para cultivar y producir ácaros de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la bolsa es una bolsa de grado médico, en la que la porosidad es lo bastante baja como para evitar que la atraviesen
35 bacterias y microorganismos.
5. El procedimiento de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el medio de cultivo ocupa al menos un 70 % del volumen total de la bolsa cerrada con el medio, ya que la bolsa cerrada con medio está físicamente presente en el cuarto de producción durante el cultivo de los ácaros del polvo.
- 40 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la bolsa está hecha de al menos un material seleccionado del grupo de materiales que consiste en un material de celulosa (p. ej., papel), un material plástico y un textil (tejido o no tejido); y en el que la bolsa estará hecha de un material en el que los ácaros dentro de la bolsa cerrada esencialmente no puedan salir a través del material como tal.
- 45 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que
 - 1: un lado de la bolsa consiste esencialmente en un material de celulosa (preferentemente papel); y
 - 2: el otro lateral de la bolsa consiste esencialmente en un material plástico transparente.
- 50 8. El procedimiento de las reivindicaciones 6 ó 7, en el que el tamaño de la bolsa es de 50 mm a 1000 mm (anchura) x de 100 mm a 1.500 mm (longitud) x con una posibilidad de extenderse a una altura adecuada con el fin de que la bolsa pueda comprender una cantidad relevante del medio de cultivo para ácaros tal como se especifica en el punto (iii) de la reivindicación 1, y en el que la bolsa cerrada comprende al menos 400 g de medio.
- 55 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el ácaro es un ácaro del polvo doméstico o el ácaro es un ácaro de bodega.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las condiciones de cultivo de los
60 ácaros son:
 - a: La temperatura es de 23 °C ± 5 °C;
 - b: La humedad es de 70 a 85% de humedad relativa (HR);
 - c: el periodo de cultivo es de 1 a 24 semanas, normalmente de 4 a 20 semanas.

11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio de cultivo que comprende los ácaros en crecimiento/cultivados está presente en una capa relativamente fina de una altura inferior a 60 mm.
- 5 12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el cuarto de producción comprende al menos 50 bolsas.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el cuarto de producción comprende al menos 10 sistemas de estante organizador adecuados, en el que cada sistema de estante organizador es un sistema organizador con al
- 10 menos 5 bolsas apiladas una encima de otra.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el sistema de estante organizador es un estante que comprende un contenedor de atrapamiento en la parte inferior del estante para atrapar los ácaros que se pueden escapar de una bolsa.
- 15 .
15. E procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento se sigue de etapas posteriores adecuadas con el fin de aislar una composición alérgica de ácaros adecuada que después se incorpora en una composición farmacéutica adecuada.

Figura 1
Matraz Erlenmeyer de 250 ml

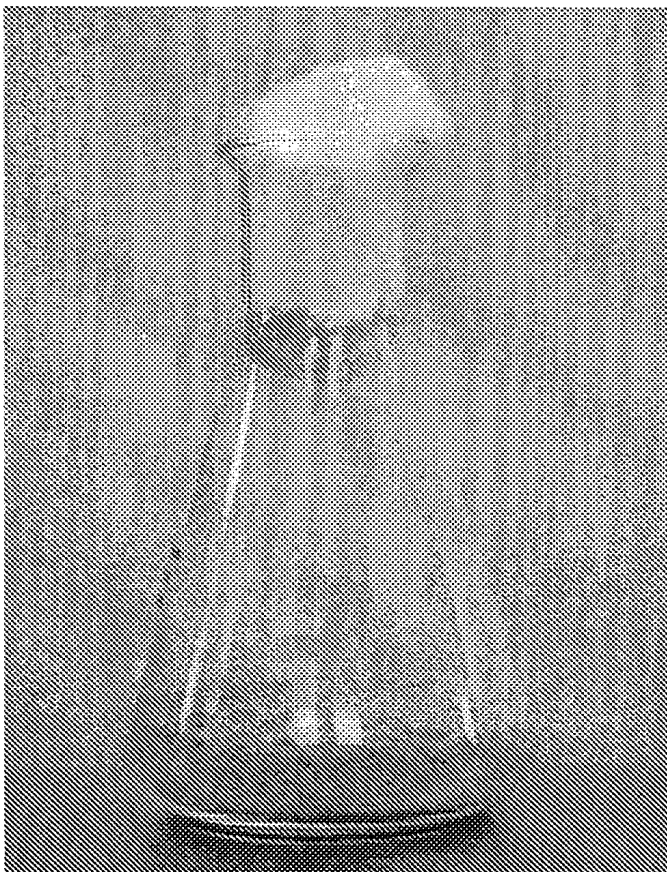


Figura 2

Frasco de cultivo de Roux con cuello desplazado. Capacidad 1000 ml



Figura 3
Ejemplo de bolsa cerrada con medio para ácaros

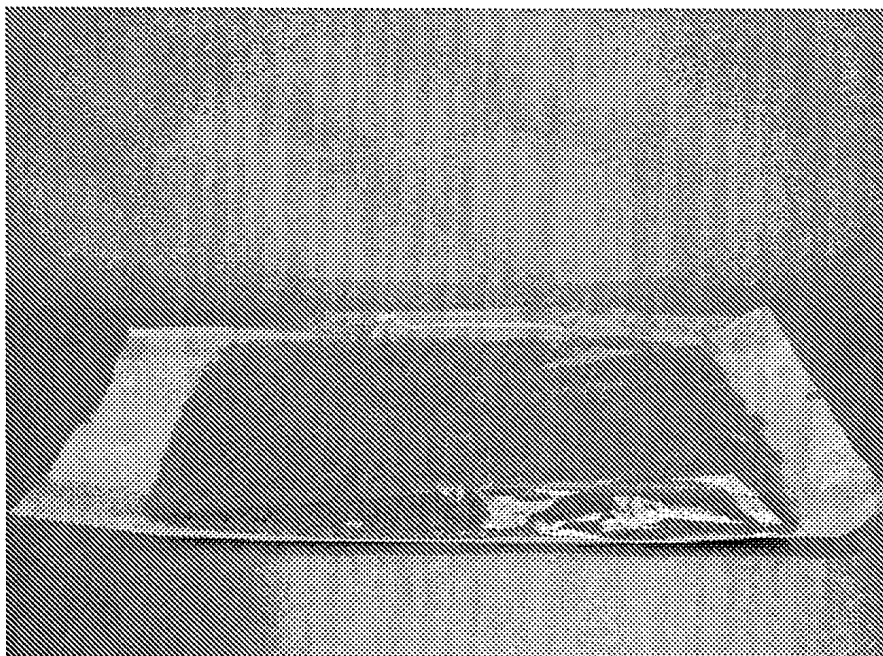


Figura 4
Ejemplo de bolsas apiladas en un estante organizador.



Figura 5:
Ejemplo de bolsa abierta cargada con medio.

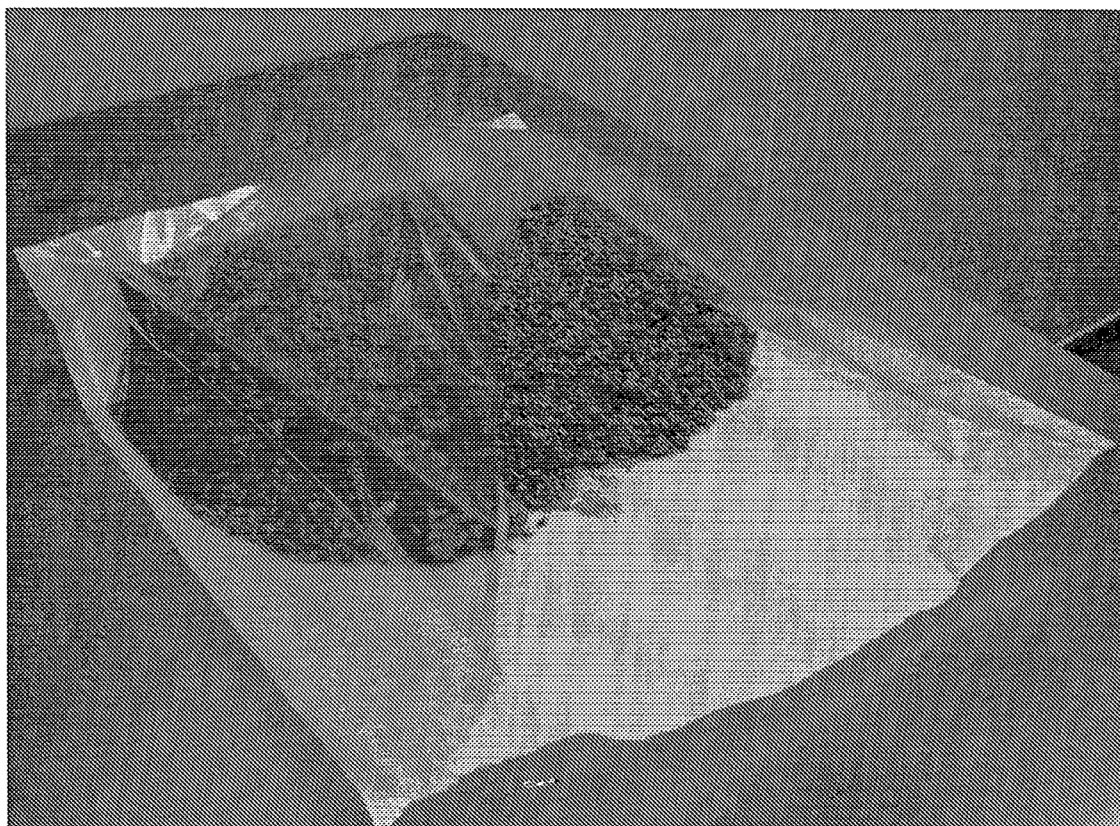
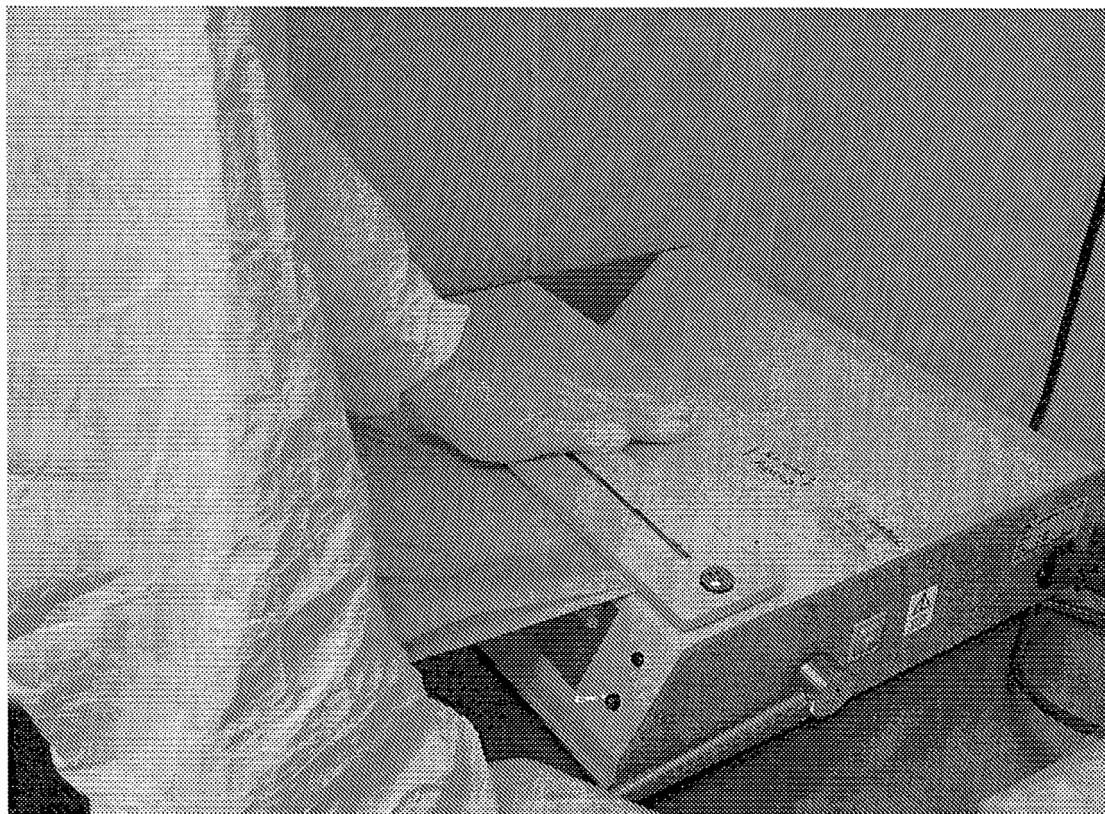


Figura 6:
Ejemplo del sellado de una bolsa.



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden
 5 excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- EP 1236394 B1 [0006] [0155]
- US 20030059445 A1 [0006] [0155]
- GB 2168680 A [0016]
- WO 2008015393 A [0081]
- GB 2393890 A [0098]
- WO 2006057552 A [0098]
- WO 08015393 A [0099]

10

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- T. Batard et al. *Int Arch Allergy Immunol*, 2006, vol. 140, 295-305 [0007] [0155]
- F.C. Yi et al. *Asian Pacific J. of Allergy and Immunology*, 1999, vol. 17, 189-194 [0008] [0155]
- J. Miyamoto. *Japan, J. Exp. Med.*, 1975, vol. 45 (2), 133-138 [0009] [0155]
- *J. Med Ent.*, 1976, vol. 12 (6), 577-621 [0011] [0155]
- *Crop Protection*, 1986, vol. 5 (2), 122-124 [0014] [0155]
- McMurtry et al. *Annual Review of Entomology*, vol. 42, 291-321 [0080]
- Ramakers et al. *Bulletin-SROP*, vol. 6 (3), 203-206 [0098]
- Nomikou et al. *Experimental and Applied Acarology*, vol. 27 (1-2), 57-68 [0098]
- Steiner et al. *Australian Journal of Entomology*, vol. 42, 124-130 [0098]
- Ivanov ; Petrova. *Medisinskaja Parazitologija i Parazitarnye Bolezni*, 1985, 46-49 [0155]