

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 066**

51 Int. Cl.:

A23K 20/189 (2006.01)
A23K 50/40 (2006.01)
C11D 3/386 (2006.01)
C11D 11/00 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61K 39/35 (2006.01)
A61K 38/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2014 PCT/IB2014/066936**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15092663**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2014 E 14821856 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3082849**

54 Título: **Usos de composiciones y métodos para reducir los alérgenos de gato en el ambiente**

30 Prioridad:

19.12.2013 US 201361918420 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.05.2020

73 Titular/es:

SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (100.0%)
Entre-deux-Villes
1800 Vevey, CH

72 Inventor/es:

WELLS, GEORGE;
TISSOT-FAVRE, DELPHINE;
SATYARAJ, EBENEZER;
ECK, JUERGEN;
MEYER, DANIEL;
ERTONGUR-FAUTH, TORSTEN;
PELZER, ALEXANDER;
SHERRILL, SCOTT y
SUN, PEICHUAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 759 066 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

Usos de composiciones y métodos para reducir los alérgenos de gato en el ambiente

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La invención se refiere en general a reducir o prevenir las alergias a los gatos o sus síntomas, y específicamente a composiciones y métodos para reducir el alérgeno principal de los gatos, Fel d 1, del ambiente.

Descripción de la técnica relacionada

15 Los gatos domésticos producen algunos de los desencadenantes más potentes de reacción alérgica, que afectan a personas de todo el mundo. La gravedad de los síntomas varía desde rinitis leve y conjuntivitis hasta respuestas asmáticas potencialmente mortales. El alérgeno más prominente y potente en la caspa de gatos es Fel d 1. Fel d 1 desencadena respuestas de IgE en el 90-95 % de los pacientes con alergia a los gatos (van Ree et al., 1999, J. Allergy Clin. Immunol. 104: 1223-1230) y representa el 60-90 % de la actividad alérgica total en caspa de gato (Kleine-Tebbe, et al., 1993 Int. Arch. Allergy Immunol. 100: 256-262).

20 Se han informado las estructuras tridimensionales de solo unos pocos alérgenos (véase Valenta y Kraft, 2001, Immunol. Rev. 179: 119-127). Las funciones biológicas de estos alérgenos son diversas o desconocidas, sin ninguna característica biológica o estructural particular que parezca predisponer a una proteína a actuar como un alérgeno (véase Aalberse, 2000, J. Allergy Clin. Immunol. 106: 228-238). Las características estructurales de las proteínas que se consideran relevantes para la alergenicidad incluyen solubilidad, estabilidad, tamaño y compacidad de la proteína. Estos aspectos reflejan la dependencia de la alergenicidad en el transporte sobre las barreras mucosas y la susceptibilidad a las proteasas (Aalberse, 2000, *supra*). La modificación postraducciona también puede afectar la alergenicidad, tal como la introducción de nuevos epítomos o la alteración de la solubilidad, estabilidad, tamaño, susceptibilidad a las proteasas y/o la absorción y el procesamiento por las células presentadoras de antígeno (Aalberse, 2000, *supra*). Aunque la glicosilación afecta muchos de estos procesos, no es determinante de alergenicidad en sí misma. Muchos alérgenos no están glicosilados, mientras que algunos están fuertemente glicosilados (Aalberse, 2000, *supra*). Como resultado, la determinación de la base de la alergenicidad puede requerir un estudio estructural detallado del alérgeno, e incluso eso puede no arrojar resultados definitivos.

35 Fel d 1 es una glucoproteína tetramérica de 35 kDa formada por dos heterodímeros. Cada dímero de 18 kDa está compuesto por dos cadenas unidas covalentemente derivadas de dos genes independientes, la cadena 1, que comprende 70 restos, y la cadena 2 (de la cual hay dos isoformas), que comprenden 90 o 92 restos. Se ha determinado la estructura tridimensional de Fel d 1 (Kaiser et al., 2003, J. Biol. Chem. 278: 37730-37735, Kristensen et al., 1997, Biol. Chem. 378: 899-908). Se encontró que el pliegue de la proteína tiene un parecido sorprendente con el de la uteroglobina, una molécula similar a la citocina inducible por esteroides con propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras. La localización relativa de tres epítomos de IgE se determinó en la superficie molecular de Fel d 1, en los restos 15-28 (cadena 2), 117-130 y 138-151 (cadena 1), respectivamente (Kaiser et al., 2003, *supra*).

45 Fel d 1 es producido por las glándulas sebáceas y las células epiteliales escamosas y se transfiere al pelaje lamando y acicalando (Bartholome et al., 1985, J. Allergy Clin. Immunol. 76: 503-506; Charpin et al., 1991, J. Allergy Clin. Immunol. 88: 77-82; Dabrowski et al., 1990, J. Allergy Clin. Immunol. 86: 462-465). Fel d 1 también está presente en las glándulas salivales, perianales y lagrimales (Anderson et al., 1985, J. Allergy Clin. Immunol. 76: 563-569; van Milligen et al., 1990, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 92: 375-378). Por consiguiente, el alérgeno está presente dentro y sobre el animal, y también es transportado por pequeñas partículas en el aire a las superficies dentro del ambiente ocupado por el gato.

50 Las estrategias desarrolladas para controlar las reacciones a tales alérgenos incluyen el establecimiento de tolerancia al alérgeno en un individuo y la simple evitación. Las estrategias de tolerancia implican el establecimiento o restablecimiento de respuestas menos dañinas o más productivas a los alérgenos exógenos. Las estrategias inductoras de tolerancia han implicado tradicionalmente la inmunoterapia con alérgenos, en donde el individuo sensibilizado se expone intencionalmente al alérgeno de manera controlada, por ejemplo, a través de una serie de inyecciones, o mediante absorción oral o nasal. La inmunoterapia ha estado en uso durante más de 100 años y ha tenido éxito, aunque puede llevar años establecer un nivel aceptable de tolerancia. Si bien son potencialmente efectivas en el individuo específico que recibe el tratamiento, las estrategias de tolerancia son costosas, invasivas, requieren mucho tiempo y requieren la administración por expertos tales como médicos, inmunólogos y similares. Los tratamientos para la tolerancia también implican un cierto nivel de riesgo asociado con reacciones adversas y resultados negativos.

65 Evitar Fel d 1 es atractivo en principio, pero difícil de lograr. Un estudio de hogares con gatos indicó que Fel D1 está ampliamente presente, por ejemplo, en el 96,6 % de las camas, el 96,9 % de los suelos de las habitaciones, el 96,1 % de los suelos del salón y el 97,9 % de los sofás. (Geany et al., Pediatrics, 116(2): agosto de 2005). La ropa de los

niños en edad escolar de hogares que tienen gatos se probó fuera del hogar (en las escuelas) y se encontró que contenían antígenos Fel D1.

Por consiguiente, este antígeno ambiental plantea un riesgo sustancial, no solo para las personas sensibilizadas que viven en hogares con gatos, sino para la población humana alérgica en general. (Gerge & Dreborg, *Ped. Allergy Immun.*, 9(1):25-30, 1998). Como resultado, si bien la posesión de gatos está en aumento en los Estados Unidos, las alergias a los gatos se han convertido y siguen siendo la razón principal para el abandono de los gatos a los refugios de animales (Scarlett et al., 1999, *J. Appl. Animal Welfare Sci.* 2:41-57).

Aunque la evitación completa de Fel d 1 puede no ser factible, una reducción en la cantidad de Fel d 1, incluso una reducción mínima, podría tener un impacto sustancial sobre la salud de las personas sensibilizadas. Esto podría minimizar el abandono como resultado de que una persona en el hogar se sensibilice.

Se han realizado intentos para reducir los alérgenos de gato del ambiente. Por ejemplo, el documento US 7.704.532 divulga métodos destinados a mitigar las reacciones alérgicas en seres humanos y otros animales susceptibles poniendo en contacto directamente los alérgenos, incluidos los alérgenos de gato, con una composición que contiene una solución de sal ácida, que incluye sales de aluminio, calcio y/o magnesio, con ropa, superficies, interiores, muebles, ropa de cama, plantas y similares. El documento US 5.826.546 divulga un método sin agua para lavar con champú una mascota que comprende usar una composición de champú espumable en combinación con un dispensador capaz de dispensar la composición como una espuma. La composición puede contener uno o más de: detergentes aniónicos, detergentes no iónicos, detergentes anfotéricos, conservantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes, jabones suaves, tensioactivos, acondicionadores de la piel tal como extractos de aloe vera, fragancias, agentes para tratar infestación por pulgas tal como el aceite de melaleuca, un ajustador de pH tal como el ácido cítrico, dependiendo de la necesidad particular de la mascota. El documento U.S. 2011/0135750 divulga métodos y composiciones destinadas a desnaturalizar alérgenos, tal como Fel d 1 de gato, comprendiendo la composición una combinación de sales de calcio y sales de lantano. El documento US 2004/0007251 divulga toallitas limpiadoras húmedas y secas que comprenden un aditivo, tal como una lectina, una proteasa y/o un inhibidor de enzimas supuestamente capaces de unirse a o escindir un alérgeno, tal como Fel d 1 de gato, y eliminarlo de una superficie. El documento U.S. 2006/0142394 divulga métodos para inhibir las heces de los ácaros del polvo y desnaturalizar la queratina del pelo de los animales y/o el polen o las esporas de las plantas usando una composición que comprende una enzima capaz de descomponer los polipéptidos de modo que no puedan desencadenar un efecto alérgico en los seres humanos. El documento US 8.454.953 divulga métodos para reducir o prevenir alergias o síntomas de reacciones alérgicas a alérgenos que comprenden poner en contacto la fuente del alérgeno con una composición que comprende una molécula capaz de inhibir la capacidad del alérgeno para unirse a los mastocitos en un animal predispuesto a tener una respuesta alérgica. La molécula puede ser un anticuerpo específico para el alérgeno, tal como un anticuerpo específico para el alérgeno Fel d 1 de gato.

El documento WO 2004/007658 A2 se refiere a productos de limpieza para eliminar alérgenos de diversas superficies, incluida la piel y el cabello de seres humanos y animales (véase WO 2004/007658 A2, KIMBERLY CLARK CO [US], 22 de enero de 2004). El documento US 5 679 630 A se refiere a una variedad de composiciones de limpieza que comprenden nuevas enzimas proteasas que son variantes de carbonil hidrolasa (documento US 5 679 630 A, BAECK ANDRE [BE] ET AL., 21 de octubre de 1997). El documento EP 0 425 018 A2 se refiere a métodos y formulaciones para eliminar sustancias que contienen glucósidos, tal como glucoproteínas, de las superficies mediante el tratamiento con endoglicosidasa Tipo II sola o en combinación con otras enzimas y/o detergentes (véase el documento EP 0 425 018 A2, PROCTER & GAMBLE [US], GENENCOR INT [US], 2 de mayo de 1991). El documento US 2007/196353 A1 se refiere a procedimientos médicamente sólidos para la reducción de la alergenicidad ambiental debido a determinados alérgenos en el aire que se sabe que producen asma, rinitis alérgica y eccema atópico tanto en seres humanos como en animales (véase el documento US 2007/196353 A1, PAYTON HUGH W [US], 23 de agosto de 2007). El documento WO 2010/030058 A1 se refiere a un filtro de limpieza de aire que tiene un vehículo con una capa de una enzima proteolítica aplicada al mismo, y un método para fabricarlo (véase el documento WO 2010/030058 A1, LG ELECTRONICS INC [KR], LEE SUNG HWA [KR], 18 de marzo de 2010), YUANXIU WANG ET AL. describe la tecnología de preparación de oligopéptidos de alto valor F a partir de harina de gluten de maíz (véase YUANXIU WANG ET AL., "Preparation of High F-Value Oligopeptides from Corn Gluten Meal and Its Antifatigue Functions", *Biomedical Engineering and Biotechnology (ICBEB)*, 2012, International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology, IEEE, 28 de mayo de 2012, páginas 429-432). SZYMKIEWICZ AGATA ET AL. describe una aplicación de análisis de inmunotransferencia de dos materiales proteicos diferentes (guisante y leche) hidrolizados con enzimas seleccionadas (Alcalasa, pronasa y papaína) (véase SZYMKIEWICZ ET AL., "Examination of immunogenic properties of hydrolysed milk and pea proteins - application of immunoblotting technique", *POLISH JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION SCIENCES*, vol. 12, no. Suppl. 1., 1 de enero de 2003, páginas 79-83).

Varios productos y métodos disponibles comercialmente también pretenden reducir los alérgenos del ambiente. Uno de estos métodos, que se dice que es útil para la prevención o mitigación de reacciones alérgicas en seres humanos, incluidas las provocadas por Fel d 1 de gato, se realiza primero limpiando las superficies del ambiente y después aplicando una solución basada en agua que contiene un ingrediente derivado de extractos de semillas de frutas y verduras, usando un aplicador en aerosol para superficies tales como colchones, moquetas, muebles tapizados, alfombras y tratamientos de ventanas (véase el Informe Especial MASTERBLEND® sobre RESPONSIBLECARE

SYSTEM™ ALLERGY RELIEF TREATMENT™, url masterblend.net). APDC, Inc. (url apdc-inc.com) produce el aerosol anti alérgeno ALLER-RX®, que es una composición líquida que se dice que procede de plantas y compuestos orgánicos de origen natural, que contiene dióxido de cloro. Otro método implica aplicar directamente una composición que comprende champú e ingredientes acondicionadores de la piel directamente a un animal para eliminar los alérgenos, incluido Fel d 1 de gato, sobre el pelaje y la piel del animal (véase ALLERPET®, producido por Allerpet, Inc., Nueva York, NY). Se demostró que la aplicación directa de la composición a un gato reduce la cantidad de Fel d 1 en el pelaje del gato y en la alfombra expuesta a los gatos (LGH Koren, E Janssen, A Willemse, American Academy of Allergy and Immunology March 1995 Annual Meeting, Eindhoven & Utrecht, Netherlands).

Aunque, como se resume anteriormente, determinados métodos y composiciones están disponibles en la técnica, sigue existiendo la necesidad de métodos adicionales y mejorados para reducir Fel d 1 en el ambiente o volverlo menos alergénico o no alergénico. También existe la necesidad de composiciones que permitan un control suficiente del nivel y/o potencia de Fel d 1 para reducir, minimizar o prevenir una respuesta alérgica en individuos predispuestos a tener dicha respuesta.

Sumario de la invención

Es, por lo tanto, un objeto de la presente invención reducir o eliminar Fel d 1 alergénico de un ambiente.

Es un objeto adicional de la invención reducir o eliminar Fel d 1 alergénico de ambientes que comprenden el ambiente local de un individuo que puede sufrir alergias a los gatos.

Es todavía un objeto adicional de la invención reducir o eliminar Fel d 1 alergénico de fuentes del alérgeno, por ejemplo, pelo de gato, piel o pelaje, o saliva de gato.

Se puede lograr uno o más de estos otros objetos utilizando formulaciones, productos, kits y métodos que comprenden enzimas proteasas que interactúan con Fel d 1 y degradan sustancialmente los epítopos alergénicos en el Fel d 1, reduciendo o eliminando de ese modo su alergenicidad.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. SDS-PAGE que muestra que Fel d 1 está completamente degradado por una subtilisina de *Bacillus licheniformis*. Se incubó Fel d 1 natural (1,9 µg) durante la noche con 0,1, 1 o 10 ufr s⁻¹ de actividad de subtilisina de *Bacillus licheniformis* (Alcalase®, Novozymes) a 37 °C en tampón Tris/HCl (200 mM, pH 7,8) o tampón de acetato de amonio (100 mM, pH 4,0). Sirvieron como controles la subtilisina (10 ufr s⁻¹) sin Fel d 1 y Fel d 1 sin la subtilisina.

Figura 2. Histograma que muestra la concentración residual de Fel d 1 después de la degradación catalizada por proteasas como se determina por ELISA. Se incubó Fel d 1 natural (2,5 µg) durante la noche con todas las proteasas comerciales probadas (excepto BLAP) en 20 µl del tampón óptimo en actividades mínimamente necesarias para lograr la degradación completa de Fel d 1 (véase, Tabla 2). Las muestras se diluyeron y analizaron por ELISA con intervalos de tiempo de 20 y 30 minutos. Como resultado de la dilución, se esperaba una concentración inicial de 12 ng ml⁻¹ de Fel d 1 (es decir, en ausencia de degradación). El control negativo (Ctrl. Neg) no contenía Fel d 1, los controles positivos contenían Fel d 1 incubado con los diferentes tampones: Ctrl. Pos 1: tampón Tris/HCl (200 mM, pH 7,8), Ctrl. Pos 2: tampón fosfato sódico (100 mM, pH 7,8), Ctrl. Pos 3: tampón fosfato sódico (100 mM pH 6,0), Ctrl. Pos 4: tampón acetato de amonio (100 mM, pH 4,0). Las degradaciones catalizadas por proteasas se realizaron por duplicado.

Figura 3. Histograma que muestra la actividad hidrolizante de queratina de las proteasas según lo determinado por el ensayo TNBS. El polvo de queratina se incubó durante la noche con las proteasas activas en concentraciones y en condiciones de reacción que se había encontrado que eran óptimas para la degradación de Fel d 1 (véase la Tabla 2). Los productos de degradación de queratina se determinaron espectrofotométricamente a 405 nm en diluciones de 10 veces de las muestras después de la reacción de acoplamiento con ácido picrilsulfónico (TNBS). Los datos representan la diferencia entre la absorbancia determinada en las muestras y en los controles con el mismo tampón pero sin proteasa. El promedio y la desviación estándar se determinaron a partir de tres repeticiones independientes del experimento.

Figura 4. Histograma que muestra el efecto tóxico celular de las proteasas en los queratinocitos humanos según lo determinado por los ensayos con Sulforhodamine B y WST-1. Los queratinocitos humanos primarios cultivados de manera confluyente se incubaron durante la noche con proteasas activas (en medio de cultivo celular) a concentraciones que se identificaron como mínimamente necesarias para degradar 125 µg ml⁻¹ de Fel d 1 (véase la Tabla 2). Después de la incubación, la vitalidad celular restante se determinó para todas las células por pocillo (células adherentes y desprendidas) mediante tinción (de células metabólicamente activas) con WST-1. La vitalidad celular restante de las células adherentes solas se determinó después mediante tinción (de las proteínas de las células vivas) con Sulforhodamine B. Las células que no se incubaron con proteasas sirvieron como control (corresponde al 100% de la vitalidad celular restante). El promedio y la desviación estándar se determinaron a partir de tres repeticiones independientes del experimento.

Figura 5. Histograma que muestra el efecto del isopropanol sobre la degradación catalizada por proteasas de Fel d 1. Las proteasas activas se incubaron durante la noche con 0, 2,5 %, 5,0 %, 7,5 %, 10,0 % y 12,5 % de

isopropanol en concentraciones y en condiciones de reacción que se encontraron óptimas para la degradación de Fel d 1 (véase la Tabla 2). Las muestras se diluyeron y analizaron por ELISA con intervalos de tiempo de 20 minutos. La concentración residual de Fel d 1 indicada representa el porcentaje de Fel d 1 determinado para las muestras en comparación con el Fel d 1 para los controles de tampón respectivos con una concentración máxima de isopropanol pero sin proteasa. El promedio y la desviación estándar se determinaron a partir de tres repeticiones independientes del experimento.

Figura 6. Gráfico que muestra el efecto de Tween® 20 sobre la degradación catalizada por proteasas de Fel d 1. Las proteasas activas se incubaron durante la noche con 0, 10 %, 20 % y 30 % de Tween® 20 en concentraciones y en condiciones de reacción que se encontraron óptimas para la degradación de Fel d 1 (véase la Tabla 2). Las muestras se diluyeron y analizaron por ELISA con intervalos de tiempo de 20 minutos. La concentración residual de Fel d 1 indicada representa el porcentaje de Fel d 1 determinado para las muestras en comparación con el Fel d 1 para los controles de tampón con las concentraciones de Tween® 20 respectivas pero sin proteasa. El promedio y la desviación estándar se determinaron a partir de tres repeticiones independientes del experimento.

Figura 7. Histograma que muestra el efecto de la cisteína y las diferentes concentraciones de leche desnatada en la degradación catalizada por papaína de diferentes concentraciones de Fel d 1 en saliva artificial de gato durante la incubación durante la noche a 37 °C. Se incubaron 1,25, 12,5 y 125 µg ml⁻¹ de Fel d 1 natural durante la noche con 4,65 µg ml⁻¹ de papaína (corresponde a 60 ufr s⁻¹ en 20 µl de mezcla de reacción, véase la Tabla 2) a 37 °C en saliva artificial de gato con 0, 71, 714 y 7140 µg ml⁻¹ de leche desnatada con y sin 40 mM de cisteína. Después de la incubación, las muestras se diluyeron y analizaron por ELISA con intervalos de tiempo 30 minutos. Como resultado de la dilución, se esperaba una concentración máxima de 12 ng ml⁻¹ de Fel d 1 (es decir, en ausencia de degradación). El promedio y la desviación estándar se determinaron a partir de dos repeticiones independientes del experimento.

Figura 8. Histograma que muestra la determinación de Fel d 1 por ELISA después de la incubación durante 1 hora y durante la noche a 37 °C con diferentes concentraciones de subtilisina de *Bacillus licheniformis* (Protex® 6L) en saliva artificial de gato (condiciones extremas). Se incubaron 125 µg ml⁻¹ de Fel d 1 natural durante 0 minutos, 1 hora o 20 horas (durante la noche) con 0, 9,5, 95, 950 y 9500 µg ml⁻¹ de la subtilisina a 37 °C en saliva artificial de gato (condiciones extremas). La reacción se detuvo mediante la adición de PMSF 1 mM. Las muestras se diluyeron y analizaron por ELISA con intervalos de tiempo 30 minutos. Como resultado de la dilución, se esperaba una concentración máxima de 12 ng ml⁻¹ de Fel d 1 (es decir, en ausencia de degradación). El promedio y la desviación estándar se determinaron a partir de dos repeticiones independientes del experimento.

Figura 9. Histograma que muestra los resultados de las pruebas de papaína y subtilisina de *Bacillus licheniformis* (Protex® 6L) a concentraciones 1000 veces mayores para la degradación de Fel d 1 en la saliva artificial del gato después de la incubación durante 5 a 60 min. Se incubaron 4,5 mg ml⁻¹ de papaína y 9,5 mg ml⁻¹ de la subtilisina durante 0, 5, 10, 15 y 60 minutos con Fel d 1 en saliva artificial de gato a 37 °C en condiciones normales y extremas. La reacción se detuvo mediante la adición de E64 100 µM (para papaína) y PMSF 1 mM (para subtilisina). Las muestras se diluyeron y analizaron por ELISA con intervalos de tiempo 30 minutos. La concentración residual de Fel d 1 indicada representa el porcentaje de Fel d 1 determinado para las muestras en comparación con el Fel d 1 para los controles de tampón respectivos sin proteasa. El promedio y la desviación estándar se determinaron a partir de tres repeticiones independientes del experimento. Abr.: n.d., no determinado.

Figura 10. Histograma que muestra los resultados de probar diferentes combinaciones de concentraciones de papaína y subtilisina de *Bacillus licheniformis* (Protex® 6L) (en proporción constante) para la degradación de Fel d 1 en saliva artificial del gato después de la incubación durante 0 a 60 min. Las diferentes combinaciones de concentraciones de papaína y subtilisina (4,5 y 9,5 µg ml⁻¹; 45 y 95 µg ml⁻¹; 450 y 950 µg ml⁻¹; 4500 y 9500 µg ml⁻¹ de papaína y subtilisina, respectivamente) se incubaron durante 0, 5, 10, 15 y 60 min con Fel d 1 en saliva artificial de gato a 37 °C en condiciones normales y extremas. La reacción se detuvo mediante la adición de E64 100 µM y PMSF 1 mM. Las muestras se diluyeron y analizaron por ELISA con intervalos de tiempo 30 minutos. La concentración residual de Fel d 1 indicada representa el porcentaje de Fel d 1 determinado para las muestras en comparación con el Fel d 1 para los controles de tampón respectivos sin proteasa. El promedio y la desviación estándar se determinaron a partir de dos repeticiones independientes del experimento.

Figura 11. Histograma que muestra los resultados de probar diferentes combinaciones de concentraciones de papaína y subtilisina de *Bacillus licheniformis* (Protex® 6L) (con concentración de papaína constante) para la degradación de Fel d 1 en saliva artificial del gato después de la incubación durante 0 a 10 min. Las diferentes combinaciones de concentraciones de papaína y subtilisina (4500 y 1188 µg ml⁻¹; 4500 y 2375 µg ml⁻¹; 4500 y 4750 µg ml⁻¹; 4500 y 9500 µg ml⁻¹ de papaína y subtilisina, respectivamente) se incubaron durante 0, 5, y 10, min con Fel d 1 en saliva artificial de gato a 37 °C en condiciones normales y extremas. La reacción se detuvo mediante la adición de E64 100 µM y PMSF 1 mM. Las muestras se diluyeron y analizaron por ELISA con intervalos de tiempo 30 minutos. La concentración residual de Fel d 1 indicada representa el porcentaje de Fel d 1 determinado para las muestras en comparación con el Fel d 1 para los controles de tampón respectivos sin proteasa. El promedio y la desviación estándar se determinaron a partir de dos repeticiones independientes del experimento.

Figura 12. Histograma que muestra los resultados de probar diferentes combinaciones de concentraciones de papaína y subtilisina de *Bacillus licheniformis* (Protex® 6L) (con concentración de subtilisina constante) para la degradación de Fel d 1 en saliva artificial del gato después de la incubación durante 0 a 10 min. Las diferentes combinaciones de concentraciones de papaína y subtilisina (565 and 1188 µg ml⁻¹; 1125 y 1188 µg ml⁻¹; 2250 y 1188 µg ml⁻¹; 4500 y 1188 µg ml⁻¹ de papaína y subtilisina, respectivamente) se incubaron durante 0, 5 y 10 min con Fel d 1 en saliva artificial de gato a 37 °C en condiciones normales y extremas. La reacción se detuvo mediante la adición de E64 100 µM y PMSF 1 mM. Las muestras se diluyeron y analizaron por ELISA con intervalos de

tiempo 30 minutos. La concentración residual de Fel d 1 indicada representa el porcentaje de Fel d 1 determinado para las muestras en comparación con el Fel d 1 para los controles de tampón respectivos sin proteasa. El promedio y la desviación estándar se determinaron a partir de dos repeticiones independientes del experimento.

5 Descripción detallada de la invención

Definiciones

10 Como se usa en el presente documento, el término "alergia" es sinónimo de "respuesta alérgica" o "reacción alérgica". Cada una de las expresiones se refiere a un estado de respuesta inmunitaria en un animal específico a un antígeno exógeno (o "alergeno") que de otro modo no es perjudicial para el animal. Un "síntoma" de una respuesta alérgica se refiere a cualquier medida de la respuesta inmunitaria mencionada anteriormente, por ejemplo, a nivel molecular (incluida la medición de una actividad o expresión de una proteína, transcrito o gen), a nivel celular, a nivel de órganos, a nivel sistémico o a nivel de organismo. Tales síntomas pueden comprender uno o más de tales niveles. Los síntomas 15 pueden incluir fenómenos generalizados tales como inflamación, problemas respiratorios, hinchazón o malestar típicamente asociados con alergia, rinitis, edema y trastornos alérgicos de la piel que incluyen, pero sin limitación, dermatitis atópica (por ejemplo, eccema), urticaria (por ejemplo, ronchas) y angioedema y dermatitis alérgica de contacto. Los fenómenos más específicos que son "síntomas" de una respuesta alérgica incluyen cualquier cambio medible u observable, por ejemplo a nivel celular, incluidos, pero sin limitación, cambios locales o sistémicos en las 20 poblaciones celulares, eosinofilia, reclutamiento y/o activación de células inmunitarias, incluyendo, por ejemplo, mastocitos y/o basófilos, cambios en las células presentadoras de antígeno (incluidas, pero sin limitación, células dendríticas portadoras de FcεRI), cambios intracelulares o moleculares, que incluyen la medición u observaciones de una o más etapas en una cascada inmunitaria, liberación de compuestos intracelulares que median una respuesta alérgica (por ejemplo, mediadores), y cambios en una o más citocinas (por ejemplo, IL-3, IL-5, IL-9, IL-4 o IL-13) o 25 compuestos relacionados o antagonistas de los mismos. El experto en la materia entenderá que determinados síntomas, tal como se definen en el presente documento, se miden más fácilmente que otros, y algunos se miden mediante una evaluación subjetiva o autoevaluación del síntoma. Para otros síntomas, existen ensayos o mediciones convenientes o rápidos para evaluar objetivamente los cambios.

30 El término "ambiente", como se usa en el presente documento, tiene tres componentes relacionados con el alérgeno Fel d 1 de gato. A veces se les conoce como "alrededor del gato", "sobre el gato" y "en el gato". El ambiente "alrededor del gato" se refiere al ambiente local de un individuo que puede sufrir alergias a los gatos, y/o un ambiente local habitado por un gato. Por ejemplo, una casa, habitación, coche, oficina, hotel, patio, garaje y similares, podrían ser "ambientes" como se usa en el presente documento. Cualquier superficie inanimada sobre la que se pueda colocar un 35 alergeno se considera parte del ambiente. Las partículas en el aire que contienen el alergeno también se consideran parte del ambiente. Aunque los ambientes alrededor del gato son con frecuencia interiores, nada en el presente documento excluye que un área limitada parcial o completamente abierta o al aire libre sea un ambiente, por ejemplo, un patio, terraza, rellano, veranda, cenador, porche o similares pueden constituir un ambiente para los fines del presente documento. El entorno también puede comprender una parte o la totalidad de un animal que es la fuente de 40 un alérgeno, por ejemplo, la piel, el pelaje o la saliva del gato sobre la piel o el pelaje del gato ("sobre el gato") o la cavidad bucal o la saliva del gato en el mismo ("en el gato").

45 Como se usa en el presente documento, un "individuo" significa un animal individual de cualquier especie o tipo, incluyendo un ser humano.

Con respecto a los kits, el término "paquete único" significa que los componentes de un kit están físicamente asociados en uno o más envases y se consideran una unidad para su fabricación, distribución, venta o uso. Los envases incluyen, aunque sin limitación, bolsas, cajas o cartones, botellas, paquetes de cualquier tipo, diseño o material, envoltura, envoltura retráctil, componentes fijados (por ejemplo, grapados, adheridos o similares), o combinaciones de cualquiera 50 de los anteriores. Por ejemplo, un kit de un solo paquete puede proporcionar envases de composiciones individuales y/o composiciones alimenticias físicamente asociadas de modo que se consideren una unidad para la fabricación, distribución, venta o uso.

La expresión "paquete virtual" significa que los componentes de un kit están asociados por instrucciones en uno o más 55 componentes físicos o virtuales del kit que le indican al usuario cómo obtener los otros componentes, por ejemplo, en una bolsa u otro envase que contiene un componente y las instrucciones que instruyen al usuario a visitar un sitio web o aplicación de dispositivo personal ("aplicación"), escuchar un mensaje grabado o un servicio de devolución de fax, ver un mensaje visual o ponerse en contacto con un cuidador o instructor para obtener, por ejemplo, instrucciones sobre cómo usar el kit, o información de seguridad o técnica sobre uno o más componentes de un kit. Ejemplos de 60 información que se pueden proporcionar como parte de un kit virtual incluyen instrucciones de uso; información de seguridad tal como hojas de datos de seguridad del material; información de control de envenenamiento; información sobre posibles reacciones adversas; resultados de estudios clínicos; información dietética tal como composición de alimentos o composición calórica; información general sobre actividad física, ejercicio, metabolismo, resistencia y similares.

65 Todos los porcentajes expresados en el presente documento son en peso de la composición sobre una base de

materia seca a menos que se indique específicamente lo contrario. El experto en la materia apreciará que la expresión "base de materia seca" significa que la concentración o porcentaje de un ingrediente en una composición se mide o determina después de que se haya eliminado cualquier humedad libre en la composición.

5 Los intervalos se usan en el presente documento en forma abreviada, para evitar tener que exponer en longitud y describir todos y cada uno de los valores dentro del intervalo. Se puede seleccionar cualquier valor apropiado dentro del intervalo, cuando sea adecuado, como el valor superior, el valor inferior o el extremo del intervalo.

10 Donde se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" indica que el valor dado, se pretende más o menos 20 % o 15 % o 10 % o 5 % o 1 %. Por lo tanto, "aproximadamente" se usa como una forma abreviada para reflejar el reconocimiento de que pequeñas variaciones del valor literal establecido todavía están dentro del alcance de la invención.

15 Como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, la forma singular de una palabra incluye el plural y viceversa, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por consiguiente, las referencias "un", "una/o" y "el/la" generalmente incluyen los plurales de los términos respectivos. Por ejemplo, la referencia a "un gato", "un método" o "un producto" incluye una pluralidad de tales "gatos", "métodos" o "productos". De forma análoga, las palabras "comprende", y "que comprende" deben interpretarse de manera inclusiva en lugar de exclusivamente. Del mismo modo, los términos "incluye", "incluyendo" y "o" deben interpretarse como inclusivos, a menos que dicha construcción esté claramente prohibida en el contexto. Como se usa en el presente documento, "ejemplos", o "por ejemplo", particularmente cuando va seguido de una lista de términos, es meramente ejemplar e ilustrativo, y no debe considerarse exclusivo o completo.

20 La expresión "que comprende" pretende incluir realizaciones abarcadas por los términos "que consiste esencialmente en" y "que consiste en". De forma análoga, la expresión "que consiste esencialmente en" pretende incluir realizaciones abarcadas por la expresión "que consiste en".

25 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos, términos de la técnica y acrónimos utilizados en el presente documento tienen los significados comúnmente entendidos por un experto en la materia en el(los) campo(s) de la invención, o en el(los) campo(s) donde se usa el término. Aunque cualquier composición, método, artículo de fabricación u otros medios o materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica de la presente invención, se describen las composiciones, métodos, artículos de fabricación preferidos u otros medios o materiales descritos en el presente documento.

35 Realizaciones de la invención

Se proporcionan usos de composiciones y métodos para reducir o eliminar el alérgeno de gato Fel d 1 del ambiente como se define en las reivindicaciones. La invención surge en parte del descubrimiento de los presentes inventores de que determinadas enzimas, particularmente las enzimas proteolíticas (proteasas), pueden degradar los epítomos antigénicos de Fel d 1, reduciendo o eliminando de este modo, su efecto alérgico.

40 Un aspecto de la invención presenta el uso de una formulación para reducir o eliminar la alergenicidad de Fel d 1, que comprende proteasas que interactúan con Fel d 1 y degradan sustancialmente los epítomos alérgicos en Fel d 1, en donde las proteasas comprenden al menos la serina proteasa Subtilisina de *B. licheniformis* y papaína. Generalmente, las proteasas eficaces pueden provenir de serina proteasas, tiol proteasas, aspartil proteasas, metaloproteasas de zinc o cualquier combinación de las mismas.

45 Generalmente, las serina proteasas adecuadas pueden incluir subtilisina, proteinasa K, tripsina, alfa-quimotripsina, endoproteinasa Glu-C y endoproteinasa Lys-C. Si se usa subtilisina, puede provenir de una especie de *Bacillus* seleccionada de *B. licheniformis*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. lentus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* o cualquier combinación de las mismas. Las tiol proteasas pueden incluir bromelaína, papaína y ficina, que se obtienen de fuentes vegetales, por ejemplo, plantas de piña, papaya e higo. Las aspartil proteasas pueden incluir quimosina bovina, endotiasepsina (por ejemplo, de *Chryphonectria parasitica*), mucorpepsina/renina (por ejemplo, de *Mucor miehei*), pepsina (por ejemplo, de origen porcino) y aspergillopepsina (por ejemplo, de *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*). Las metaloproteasas de zinc pueden incluir termolisina (por ejemplo, de *Bacillus thermoproteolyticus rokko* o *Geobacillus* sp.) Y endoproteinasa Asp-N, (por ejemplo, de *Flavobacterium meningosepticum*).

60 La Tabla 1 a continuación expone proteasas adecuadas para su uso en la presente invención. Las proteasas pueden purificarse de una fuente biológica o pueden obtenerse de fuentes comerciales. Determinadas fuentes comerciales ejemplares se muestran en la tabla; muchas otras están disponibles.

Tabla 1

Clase Funcional	Nombre comercial de Proteasas Ejemplares	Origen, Fuente Natural	Nombre recomendado (IUPAC)	N.º de Clasificación de Enzimas (IUPAC)	N.º EINECS	N.º CAS
Serina Proteasa	Alcalase® 2.4L (NZ)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Subtilisina	3.4.21.62	232-752-2	9014-01-1
	Savinase® 16.0L; Everlase® 16.0L (NZ)	<i>Bacillus clausii</i>	Subtilisina	3.4.21.62	231-752-2	9014-01-1
	Esperase® 8.0L (NZ)	<i>Bacillus haloturans</i>	Subtilisina	3.4.21.62	231-752-2	9014-01-1
	Purafect® (G)	<i>Bacillus lentus</i>	Subtilisina	3.4.21.62	232-752-2	9014-01-1
	Protex® 6L; Protex® 8L (G)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Subtilisina	3.4.21.62	231-752-2	9014-01-1
	Protex® 7L (G)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Subtilisina	3.4.21.62	232-752-2	9014-01-1
	Protex® 30L; Protex 89L (G)	<i>Bacillus subtilis</i>	Subtilisina	3.4.21.62	232-752-2	9014-01-1
	Protex® 40L (G)	<i>Bacillus subtilis</i>	Subtilisina	3.4.21.62	231-752-2	9014-01-1
		<i>Tritirachium album</i>	Proteinasa K	3.4.21.62		
		Origen porcino	Tripsina	3.4.4.4	232-650-8	9002-07-7
Tiol Proteasa		Origen bovino	Alfa-Quimotripsina	3.4.21.1	232-671-2	9004-07-3
		<i>Staphylococcus aureus</i>	Endoproteinasa Glu-C	3.4.21.19		
		<i>Lysobacter enzymogenes</i>	Endoproteinasa Lys-C	3.4.21.50		
		Piña	Bromelaina	3.4.22.33	232-572-4	9001-00-7
		<i>Carica papaya</i> (Papaya)	Papaina	3.4.4.10	232-627-2	9001-73-4
		Látex de higuera	Ficina	3.4.4.12	232-599-1	9001-33-6
		Origen bovino	Quimosina	3.4.23.4		
		Origen bovino	Quimosina	3.4.23.4		
		<i>Cryphonectria parasitica</i>	Endotiapsina	3.4.23.22		
		<i>Mucor miehei</i>	Mucorpepsina/Rennina	3.4.23.23		
Aspartil proteasas		Origen porcino	Pepsina	3.4.23.1	232-629-3	9001-75-6
	Protex® 15L (G)	<i>Trichoderma reesei</i>	Aspergillopepsina	3.4.23.18	232-796-2	9025-49-4
	Protex® 26L (G)	<i>Aspergillus niger</i>	Aspergillopepsina	3.4.23.18	232-796-2	9025-49-4
	Protex® 51FP (G)	<i>Aspergillus oryzae</i> var. rokko	Aspergillopepsina	3.4.23.18	232-796-2	9025-49-4
		<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	Termolisina	3.4.24.27	232-973-4	9073-78-2
Metaloproteasa de Zinc	Protex® 14L (G)	<i>Geobacillus</i> sp.	Termolisina	3.4.24.27	232-973-4	9073-78-3
		<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	Endoproteinasa Asp-N	3.4.24.33		

(G) = Dupont Industrial Bioscience (anteriormente Genencor), (NZ) = Novozymes, (CH) = Christian Hansen A/S

- 5 La proteasa, o combinación de proteasas, en la formulación puede reducir la unión de Fel d 1 a los anticuerpos anti-Fel d 1 en al menos un 50% en condiciones aplicables a la proteasa o combinación de las mismas, como se describe en los Ejemplos, medida por uno o más de ELISA, SDS-PAGE, o cualquier otro método conocido para detectar la presencia del antígeno y/o epítomos antigénicos o la unión del antígeno a los anticuerpos específicos de Fel d 1. Por ejemplo, las proteasas pueden incluir una o más de subtilisina, proteinasa K, alfa-quimotripsina, tripsina, endoproteinasa Lys-C, bromelaína, papaína, ficina, quimosina, endotiapepsina, mucorpepsina/rennina, pepsina, aspergillopepsina, termolisina y endoproteinasa Asp-N.
- 10 Más particularmente, la proteasa, o combinación de proteasas, en la formulación puede reducir la unión de Fel d 1 a los anticuerpos anti-Fel d 1 en al menos un 90 % en condiciones aplicables a la proteasa o combinación de las mismas, como se describe en los Ejemplos, medida por uno o más de ELISA, SDS-PAGE, o cualquier otro método conocido para detectar la presencia del antígeno y/o epítomos antigénicos o la unión del antígeno a los anticuerpos específicos de Fel d 1. Por ejemplo, las proteasas pueden incluir una o más de subtilisina (por ejemplo, de *Bacillus licheniformis*,
- 15 *B. clausii*, *B. lentus*, *B. amyloliquefaciens* y/o *B. subtilis*), tripsina (por ejemplo, porcina), alfa-quimotripsina (por ejemplo, bovina), bromelaína, papaína, ficina, quimosina (por ejemplo, bovina), endotiapepsina, mucorpepsina/rennina, pepsina, aspergillopepsina (por ejemplo, de *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*), termolisina y endoproteinasa Asp-N.
- 20 Proteasas adecuadas en general pueden incluir una o más de papaína, subtilisina de *B. licheniformis*, aspergillopepsina de *A. oryzae*, endoproteinasa Asp-N, bromelaína, ficina, alfa-quimotripsina, endotiapepsina de *Cryphonectria parasitica*, pepsina y termolisina de *Geobacillus sp.* Las proteasas de la composición de la invención incluyen papaína y subtilisina de *B. licheniformis*.
- 25 Los presentes inventores han determinado que determinadas proteasas pueden ser particularmente adecuadas para su uso en composiciones que contienen alcohol o determinados detergentes. Por ejemplo, la proteasa, o combinación de proteasas, puede reducir la unión de Fel d 1 a anticuerpos anti-Fel d 1 en al menos un 50 % en presencia de hasta un 7,5 % de isopropanol en condiciones de reacción como se establece para las clases respectivas de enzimas en la Tabla 2. Estas proteasas pueden incluir una o más de ficina, bromelaína, papaína, aspergillopepsina de *Aspergillus*
- 30 *oryzae*, o endoproteinasa Asp-N. En otro aspecto, la proteasa, o combinación de proteasas, reduce la unión de Fel d 1 a anticuerpos anti-Fel d 1 en al menos un 50 % en presencia de detergente no iónico, por ejemplo, polisorbato 20 (Tween® 20) hasta en un 10 %, en condiciones de reacción como se establece en la Tabla 2. Estas proteasas pueden incluir una o más de aspergillopepsina de *A. oryzae*, endoproteinasa Asp-N, subtilisina de *B. licheniformis*, papaína, bromelaína y ficina. La formulación puede comprender además un aditivo que potencia la eficacia de la enzima en la degradación del Fel d 1. En determinadas realizaciones, el aditivo es cisteína o sales/iones de calcio (Ca²⁺), o una combinación de cisteína y sales/iones de calcio, o compuestos que forman cisteína o sales/iones de calcio *in situ*.
- 35 En diversas realizaciones, la formulación se dispone dentro de una composición seleccionada de, por ejemplo: agente de limpieza líquido, sólido o en polvo, aerosol, paño húmedo, toallita, esponja, pastilla soluble en agua, filtro, alimento, suplemento de aceite o de agua, filtro de aspiradora o aditivo, gránulo, detergente, desodorizador de alfombras y habitaciones, arena, aditivo para arena, guante, aditivo para productos no de tejido, saco para lavadora (pastilla), pastillas líquidas multicámara. De manera adicional, Las formulaciones se pueden disponer en una preparación oral. En un aspecto, la formulación puede disponerse en un juguete, por ejemplo, un juguete para gatos, incluyendo juguetes comestibles y no comestibles.
- 45 En determinadas realizaciones, la formulación puede comprender un gránulo, polvo o comprimido que se reconstituye con un líquido (por ejemplo, agua, tampón u otro líquido) antes de su uso. La formulación puede comprender un líquido o aerosol que se puede aplicar a una superficie o al animal. Preferentemente, el aerosol no se pulveriza. Los aerosoles adecuados que no se pulverizan pueden hacerse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.
- 50 En determinadas realizaciones, las formulaciones contienen enzimas que generalmente se reconocen como seguras para su uso en alimentos y cosméticos. Dichas formulaciones son particularmente adecuadas para su uso en jabones, champús, espumas/muses, polvos, aerosoles, acondicionadores, enjuagues, geles, lociones, collares, dispersantes, guantes húmedos, toallitas húmedas, dentífricos y/o enjuagues bucales, o cualquier otra composición adecuada para aplicar sobre la piel, el cabello, pelaje o cavidad oral, o dispuesta dentro de una composición comestible, o formulada para añadirse a cualquiera de tales composiciones.
- 55 En determinadas realizaciones, la proteasa sustancialmente no tiene interacción con sustancias que incluyen queratina, colágeno, elastina, fibronectina, otras proteínas y fibras o tejidos (en ropa, alfombras, tapicerías, cortinas y ropa de cama). Proteasas adecuadas que son inactivas en tales proteínas incluyen, pero sin limitación, papaína y pepsina.
- 60 En otras realizaciones, la proteasa puede ser activa contra la queratina y puede ser útil para reducir la acumulación de queratina que puede producirse cuando la mascota se lava con champú. Por ejemplo, se encontró que bromelaína, ficina aspergillopepsina, endotiapepsina determinadas subtilisinas, termolisina, endoproteinasa Asp-N y alfa-quimotripsina degradan la queratina (Ejemplo 2).
- 65

Otro aspecto de la invención presenta un método de producir una formulación para reducir o eliminar la alergenicidad de Fel d 1. En general, el método comprende combinar al menos una proteasa que interactúa con el Fel d 1 y degrada sustancialmente los epítomos alergénicos en el Fel d 1 con un medio en el que la proteasa está activa o puede activarse antes de su uso. El medio puede ser cualquier medio que satisfaga el requisito mencionado anteriormente, incluyendo, pero sin limitación, líquidos, sólidos, gránulos, polvos, paños húmedo, toallitas húmedas, guantes, esponjas, comprimidos solubles en agua, filtros, alimentos, suplementos dietéticos, bebidas, concentrados a añadir a alimentos o bebidas, filtros de aspiradora o aditivos, detergentes, desodorizadores de alfombras tapicerías y habitaciones, arenas, aditivo para arenas, guantes, sacos para lavadora (pastilla), por nombrar solo algunos.

Las proteasas pueden incluir cualquiera de las proteasas analizadas anteriormente, o cualquier combinación de las mismas, en una cantidad adecuada para degradar el Fel d 1 lo suficiente como para inhibir que se una a los anticuerpos anti-Fel d 1 durante el tiempo que la formulación está expuesta al Fel d 1 en el ambiente (alrededor del gato, sobre el gato o en el gato). Por ejemplo, las formulaciones destinadas a aplicarse a un ambiente y eliminarse poco después del mismo (por ejemplo, en minutos u horas), tal como un agente de limpieza, champú para mascotas o producto oral, deben contener una concentración de proteasa(s) suficiente para degradar Fel d 1 dentro de ese periodo de tiempo. Los análisis cinéticos analizados en los Ejemplos proporcionan intervalos de concentración de las proteasas para lograr dicho resultado. Por ejemplo, el análisis cinético de papaína y subtilisina de *B. licheniformis* en saliva artificial de gato reveló que, en condiciones normales de saliva de gato, más del 80 % de Fel d 1 se degradó en 5 minutos por papaína a 4,5 mg ml⁻¹ y por la subtilisina a 9,5 mg ml⁻¹. Las formulaciones destinadas a permanecer en su lugar durante un tiempo prolongado (por ejemplo, varias horas o durante la noche), como un aerosol para tapicería o tela o una espuma, gel, champú o aerosol sin enjuague, requerirían una menor concentración de proteasa(s).

El experto en la materia puede medir la degradación de Fel d 1 por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la degradación de Fel d 1 se puede medir mediante ELISA y/o SDS-PAGE, o combinaciones de los mismos. Los ensayos ELISA se utilizan para determinar la cantidad de unión de Fel d 1 a los anticuerpos específicos de Fel d 1 después de la exposición a la(s) proteasa(s).

Además, la actividad de proteasas se mide y normaliza usando un ensayo de proteasas convencional. Usando dicho ensayo, las actividades de proteasa pueden normalizarse a través de proteasas y condiciones de ensayo. Un sistema de ensayo de actividad de proteasa típico incluye un sustrato de proteasa y un tampón adecuado para soportar la actividad de proteasa, y también puede incluir diluyentes o disolventes y otros agentes útiles para la actividad de proteasas (por ejemplo, cisteína). Por lo general, el sustrato está diseñado de tal manera que la escisión del sustrato por la proteasa genera un producto detectable. Por ejemplo, un tipo de ensayo de proteasas utiliza una proteína, por ejemplo, caseína, derivatizada para contener fluoróforo que se inactiva hasta que la proteasa escinde la proteína. Tras la escisión por la proteasa, el fluoróforo se separa del inactivador y produce una señal de fluorescencia cuantitativamente detectable.

También son adecuados para su uso otros tipos de ensayos de actividad de proteasa. Por ejemplo, un ensayo puede utilizar una proteína succinilada, tal como la caseína, como sustrato. La hidrólisis de este sustrato en presencia de proteasa da como resultado la liberación de fragmentos peptídicos con grupos amino terminales libres. Estos péptidos se hacen reaccionar con ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS), seguido de la medición del aumento de absorbancia que resulta de la formación de aductos de péptido TNB de color amarillo.

Las actividades enzimáticas determinadas por un ensayo de proteasas pueden expresarse generalmente como unidades de producto relativas por segundo y normalizarse a la cantidad de preparación enzimática (upr s⁻¹ g⁻¹). En el caso de un ensayo basado en fluorescencia como el uno descrito anteriormente, las actividades enzimáticas pueden expresarse como unidades de fluorescencia relativas por segundo y normalizarse a la cantidad de preparación enzimática (ufr s⁻¹ g⁻¹).

El método comprende combinar la cantidad necesaria de la proteasa con el medio. La cantidad de proteasa a incluir en la formulación dependerá de si está preparada en forma "lista para usar" o como un concentrado para su posterior dilución.

Otro aspecto de la invención presenta un método para reducir o eliminar Fel d 1 alergénico del ambiente. El método comprende poner en contacto un elemento del ambiente donde Fel d 1 está presente con una formulación que comprende al menos una proteasa que interactúa con el Fel d 1 y degrada sustancialmente los epítomos alergénicos en el Fel d 1, reduciendo o eliminando, de este modo, el Fel d1 alergénico del ambiente.

En determinadas realizaciones, el ambiente es "alrededor del gato". En una realización, Fel d 1 está presente en una superficie inanimada y la formulación se aplica a la superficie. Las superficies típicas pueden incluir mostradores, suelos, paredes, muebles, tapicería y ropa, por citar algunos. En otra realización, Fel d 1 está en el aire y la formulación se pone en contacto con el aire. Por ejemplo, la formulación se puede disponer dentro de un filtro a través del cual pasa el aire, tal como un filtro de aire para un ventilador, calentador o aire acondicionado, o un filtro de aspiradora.

Asimismo, el ambiente puede estar "sobre el gato" y la formulación se puede aplicar a la porción del animal en la que

está presente el Fel d 1. Por ejemplo, el Fel d 1 puede estar presente en el pelo, pelaje o piel externa del animal, o en la saliva depositada en el pelo, pelaje o piel del animal. Además, el ambiente puede estar "en el gato", generalmente en la boca del animal donde se produce la saliva que contiene Fel d 1, y la formulación se puede aplicar como un dentífrico, enjuague, alimento, golosina, película o tira de espuma o aerosol o bebida.

5 Otro aspecto puede ser un artículo de fabricación (también denominado en el presente documento "producto") que comprende una formulación que incluye al menos una proteasa que interactúa con el Fel d 1 y degrada sustancialmente los epítomos alérgicos en el Fel d 1, y las instrucciones para su uso para reducir o eliminar Fel d1 alérgico del ambiente. El producto se puede formular como un agente de limpieza líquido, sólido o en polvo, aerosol, paño húmedo, toallita, esponja, pastilla soluble en agua, detergente, desodorizador de alfombras o telas, arena, aditivo para arena, guante, aditivo para productos no de tejido o de tejido, saco para lavadora (pastilla), pastilla de líquido multicompartimento, para su aplicación a una superficie inanimada. Además, el producto puede formularse como un aditivo de filtro de aire para poner en contacto con Fel d 1 del aire.

15 El producto puede formularse para su aplicación o administración a un animal que produce el Fel d 1. Por ejemplo, el producto se puede formular como un champú, acondicionador, enjuague, mouse, gel, aerosol, loción o polvo para su aplicación al pelo, pelaje o piel externa del animal. De manera alternativa, el producto se puede formular como un dentífrico, alimento, golosina o aditivo a la comida o agua del animal, para su aplicación en la boca del animal.

20 Dichos productos y artículos de fabricación como se divulgan en el presente documento pueden ser eficaces para inactivar Fel d 1 en un ambiente. Los productos y/o artículos pueden reducir o inactivar Fel d 1 en al menos un 10 % en sus respectivos ambientes. En algunos aspectos, Fel d 1 puede inactivarse por los productos y/o artículos en al menos un 50 %. En otros aspectos, Fel d 1 puede inactivarse en al menos un 1 %, 5 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o incluso en al menos un 95 %.

25 En determinadas realizaciones, el producto comprende un alimento u otra composición comestible para reducir o eliminar la alergenicidad del alérgeno Fel d 1. En un aspecto, el producto alimenticio es un alimento seco para mascotas o una golosina para mascotas que comprende una formulación que contiene proteasa. Por ejemplo, la formulación se puede aplicar espolvoreando o recubriendo la formulación sobre la composición alimenticia seca antes del envasado o envío. Debido a que el producto alimenticio está seco, la actividad de las proteasas se puede preservar durante el envío y el almacenamiento. La formulación también se puede proporcionar como un concentrado que se disuelve antes de la alimentación, o una bolsita o bolsa que contiene una preparación de proteasa en polvo o granular que se puede rociar sobre una composición alimenticia o mezclar en agua u otras bebidas líquidas. La formulación puede proporcionarse como una formulación líquida que puede aplicarse, por ejemplo, directamente a una composición alimenticia (seca, húmeda o intermedia), o al agua u otras bebidas líquidas.

35 En un aspecto adicional, se pueden proporcionar kits para reducir o eliminar la alergenicidad del alérgeno de gato Fel d 1. En general, estos kits comprenden una de las formulaciones e instrucciones que contienen proteasa mencionadas anteriormente para su uso en la eliminación del Fel d 1 alérgico del ambiente.

40 En un aspecto, el kit puede comprender una composición para limpiar o de otro modo eliminar Fel d 1 del ambiente alrededor del gato, tal como la superficie de un objeto inanimado. Estas incluyen, por ejemplo, un agente de limpieza líquido, sólido o en polvo, aerosol, paño húmedo, toallita, esponja, desodorizador de alfombras y habitaciones, gránulo o detergente, comprendiendo dicha composición la formulación que degrada Fel d 1, junto con instrucciones de uso. Además, las formulaciones de proteasa pueden proporcionarse en forma concentrada y las instrucciones contendrán instrucciones para la dilución. En otros aspectos, se puede proporcionar un kit multicomponente. Por ejemplo, un kit de limpieza puede comprender un agente de limpieza en un envase y una formulación de proteasa en otro, y las instrucciones pueden dirigir al usuario sobre cómo combinar los componentes antes de su uso. Eso puede ser particularmente beneficioso si las proteasas en la formulación son sensibles a los ingredientes en el agente limpiador, de modo que el agente limpiador las inactivaría con una exposición prolongada.

50 De manera análoga, el kit puede comprender una composición para lavar tela, tal como un líquido, sólido o polvo, pastilla soluble en agua o saco para lavadora (pastilla), comprendiendo dicha composición la formulación que degrada Fel d 1, junto con instrucciones de uso. En otro aspecto, el kit comprende un filtro de aire, tal como un filtro o aditivo para aspiradora, que comprende la formulación degradante de Fel d 1, junto con instrucciones de uso. Las formulaciones de proteasa de nuevo pueden proporcionarse en forma concentrada y las instrucciones pueden contener instrucciones para la dilución. Además, se puede proporcionar un kit multicomponente. Por ejemplo, un kit de lavado puede comprender un detergente de lavado en un envase y una formulación de proteasa en otro, y las instrucciones pueden dirigir al usuario sobre cómo combinar los componentes antes de su uso. Un kit de filtro de aire puede comprender el filtro de aire y la formulación de proteasa, e instrucciones para combinar los dos para reducir o eliminar Fel d 1 en el aire.

65 Además, el kit comprende tratamientos para "sobre el gato" por ejemplo, pelaje, pelo o piel. Tales kits puede incluir un jabón, champú, polvo, aerosol, acondicionador, enjuague, mouse, gel, loción, collar, guante o toallita dispersante o húmeda adecuada para aplicar sobre la piel, pelo o pelaje o formulada para agregar a cualquiera de tales composiciones, junto con instrucciones de uso. La formulación que contiene proteasa puede incluirse dentro de la

composición de tratamiento de pelaje/pelo, o puede proporcionarse por separado, como un concentrado o de otro modo, y mezclarse con el tratamiento de pelaje/pelo antes de su uso. Los kits también pueden contener una combinación de tratamientos de pelaje/ pelo. Por ejemplo, un kit puede comprender un guante o paño para limpiar el pelaje y una formulación de proteasa líquida. Las instrucciones pueden proporcionar instrucciones sobre cómo impregnar el guante o paño con el líquido y aplicarlo al gato. Como otro ejemplo, un kit puede comprender un champú y un enjuague, aerosol, gel o mousse en donde el champú es un champú para mascotas convencional que no contiene la formulación de proteasa y el enjuague, aerosol, gel o mousse contiene la formulación de proteasa.

Un kit comprende una composición oral, tal como un líquido, sólido o polvo, paño húmedo, toallita, dentífrico o enjuague bucal, comprendiendo dicha composición la formulación que degrada Fel d 1, que puede ser adecuada para aplicar a la cavidad oral, o formulada para agregar a cualquiera de tales composiciones, junto con instrucciones de uso. Además, el kit puede comprender un kit dental que comprende un comprimido soluble en agua que puede administrarse al animal, tal como disolviéndolo en agua potable.

En otro aspecto, el kit comprende una forma comestible de una composición descrita en el presente documento en una bolsita o bolsa junto a o recomendada para usarse junto con una composición alimenticia, tal como un paquete de alimentos para mascotas, junto con instrucciones para mezclar la composición comestible en el alimento, agregando el composición al alimento, o disolviendo, mezclando o agregando la composición a un fluido que se va a administrar al animal que recibe el alimento, tales como agua potable. En otro aspecto, el kit puede comprender al menos una composición alimenticia descrita en el presente documento que comprende la formulación degradante de Fel d 1, junto con instrucciones de uso. En otro kit, se proporciona una forma concentrada de la composición, y también se proporciona una herramienta o dispositivo para medir convenientemente una cantidad adecuada del concentrado para mezclar con, agregar a, diluir o disolver con un alimento o líquido para proporcionar al animal. En un kit, la composición en forma comestible se proporciona en una dosis conveniente en una serie de paquetes idénticos, de modo que un paquete de la composición se agrega a un paquete (por ejemplo, lata) de alimento para mascotas sin un requisito de medición. Dichos kits se pueden proporcionar de manera que para cada paquete de alimentos para mascotas en un paquete de punto de venta, se proporcione un paquete de formulación degradante de Fel d 1. Por ejemplo, doce latas de comida y doce paquetes de composición se empaquetan en un solo kit.

En vista de lo anterior, el kit puede comprender una composición, en forma concentrada o en otra forma, instrucciones de uso, incluyendo, si así se requiere, instrucciones para la preparación de una dilución adecuada, y opcionalmente uno o más de un diluyente o extensor, una herramienta o dispositivo de medición para preparar una dilución adecuada y un aplicador como un rociador, un paño, una toallita o similares. Dichos kits pueden ser útiles para composiciones formuladas para tratar superficies, para tratar el aire en un ambiente o para tratar un animal con una composición para uso externo.

Para todos estos kits, los kits pueden incluir dispositivos, aplicadores, diluyentes y similares que son automáticos o que automatizan la dosificación, dilución, mezcla, adición o aplicación de la composición para un uso apropiado. Para cualquiera de los kits descritos en el presente documento, se pueden proporcionar como sobres o se pueden combinar con otros productos para maximizar la conveniencia, el cumplimiento y la eficacia del uso y la compra. Por consiguiente, los kits pueden incluir, o pueden combinarse con cualquiera o todos los alimentos para la mascota, ropa de cama para mascota, champú o artículos cosméticos para la mascota, medicamentos para la mascota.

Cualquiera de los kits anteriores, así como otros, también se pueden proporcionar como kits virtuales. Cuando el kit comprende un paquete virtual, el kit proporciona instrucciones en un entorno virtual en combinación con uno o más componentes físicos del kit, tal como los descritos anteriormente. El kit contiene al menos una composición descrita en el presente documento, y otros componentes, incluidos componentes opcionales. Los kits pueden contener los componentes del kit en cualquiera de varias combinaciones y/o mezclas. En un aspecto, el kit contiene un paquete que contiene una o más composiciones y un envase de alimentos para el consumo de un animal. El kit puede contener elementos adicionales tales como un dispositivo para mezclar las composiciones e ingredientes o un dispositivo para contener la mezcla, por ejemplo, un tazón de comida. En otro aspecto, las composiciones se mezclan con suplementos nutricionales adicionales tales como vitaminas y minerales que promueven la buena salud en un animal. Se proporciona más información e instrucciones en el entorno virtual que se proporciona al comprador, es decir, instrucciones para un sitio web, un servidor de devolución de fax o un dispositivo legible por ordenador incluido, como un CD-ROM y/o una aplicación ("app") para un dispositivo.

En otro aspecto, puede proporcionarse un medio de comunicación, o un medio para comunicar información o instrucciones para una o más de las formulaciones, método, composiciones, artículos de fabricación, productos y/o kits descritos en el presente documento para reducir la alergenicidad o la cantidad de Fel d 1 alergénico del ambiente. La información puede referirse a formulaciones, composiciones, artículos de fabricación o productos como se describe en el presente documento o la información puede referirse a métodos o kits útiles para practicar β

descritos en el presente documento. En otro aspecto, la información puede relacionarse con combinaciones de cualquiera de los anteriores.

Los medios de comunicación comprenden uno o más de información de texto, información de audio, imágenes fijas o

en movimiento, incluidas animaciones o vídeo. Los medios de comunicación pueden comprender uno o más de un documento impreso, un documento electrónico estático o dinámico, por ejemplo un documento de hipertexto, un medio de almacenamiento legible por ordenador o digital, incluyendo, pero sin limitación, medios electrónicos, ópticos o magnéticos de cualquier tipo, información de audio, una pantalla o presentación de audio, audiovisual o visual, o información de video, sin embargo codificada, en donde el medio de comunicación muestra o contiene información o instrucciones que comprenden cualquiera de los mencionados anteriormente. Los medios de comunicación pueden comprender un sitio web, una página o archivo de preguntas frecuentes (FAQ), un archivo electrónico o una colección de dos o más archivos electrónicos del mismo tipo o diferentes, un correo electrónico o un archivo de correo electrónico, una pantalla visual, quiosco, folleto, anuncio, paquete o etiqueta del producto, paquete o inserto del producto, prospecto, anuncio público, cinta de audio o archivo de audio electrónico incorporado en cualquier medio legible por máquina o legible por ordenador, una cinta de video, disco de video o archivo de video electrónico incorporado en cualquier archivo legible por máquina o medio legible por ordenador, DVD, CD-ROM, aplicación o similar, o cualquier combinación de los anteriores que contenga dicha información o instrucciones. La información útil incluye uno o más de (1) métodos y técnicas para combinar y administrar las moléculas específicas de alérgenos y/u otros componentes, (2) información de contacto para animales alérgicos o sus guardianes o cuidadores para usar si tienen alguna pregunta sobre el kit, la composición o su uso; (3) información nutricional sobre composiciones alimenticias y otros componentes proporcionados en cualquier kit, (4) información de seguridad que incluye, por ejemplo, información de emergencia y otros contactos en caso de reacción adversa; control de intoxicaciones, hojas de seguridad de datos de materiales, (5) información útil para reordenar, por ejemplo a través de sistemas de cumplimiento automático; (6) información general sobre alergias, alérgenos ambientales y métodos para minimizar o eliminar alérgenos ambientales específicos. Instrucciones útiles pueden incluir cantidades para mezclar y cantidades de administración y frecuencia. Los medios de comunicación pueden ser útiles para instruir sobre los beneficios de usar y comunicar los métodos aprobados para administrarlo a un animal.

Otro aspecto puede proporcionar un paquete que comprende una cualquiera o más de las formulaciones, composiciones, productos y/o kits descritos en el presente documento. El paquete tiene pegada una etiqueta que contiene una palabra o palabras, imagen, símbolo, diseño, acrónimo, lema, frase u otro dispositivo, o una combinación de los mismos (la etiqueta "dispositivo"), que indica que el contenido del paquete contiene una formulación de proteasa para reducir o eliminar Fel d 1 alérgico del ambiente.

Ejemplo 1

Se analizó un conjunto de 32 proteasas, en combinación con agentes químicos tales como cisteína, para determinar su capacidad para degradar Fel d 1. Sin pretender limitarse a un mecanismo particular, la justificación de la inactivación catalizada por enzimas de Fel d 1 era determinar qué proteasas podrían degradar Fel d 1 de modo que los anticuerpos IgE no pudieran reconocer y unirse a Fel d 1, dando como resultado el fracaso de montar una respuesta inmunitaria y una reacción alérgica. Las proteasas candidatas se seleccionaron de varias familias diferentes de proteasas, que incluyen serina proteasas, tiol proteasas, proteasas de ácido aspártico y metaloproteasas de zinc.

Para normalizar las actividades e identificar las condiciones de reacción óptimas para cada proteasa candidata, se usó el kit de ensayo de proteasas ENZCHEK® (fluorescencia verde) de Invitrogen, Inc. (Carlsbad CA), que se basa en caseína como sustrato, derivatizada para contener fluoróforo que se inactiva hasta la escisión por la proteasa. Las actividades enzimáticas determinadas por un ensayo de proteasas pueden expresarse como unidades de fluorescencia relativas por segundo y normalizarse a la cantidad de preparación enzimática ($\text{ufr s}^{-1} \text{g}^{-1}$). Para identificar las condiciones de reacción apropiadas para las diferentes clases de enzimas, se probaron diferentes tampones y condiciones de pH a 37 °C. La Tabla 2 proporciona el pH del tampón con el mejor rendimiento y la actividad (aumento de fluorescencia por segundo, ufr s^{-1}) por cantidad de preparación de proteasas (g^{-1}) según lo determinado por el Ensayo de Proteasas ENZCHEK®.

La mayoría de las proteasas probadas (serina proteasas, tiol proteasas y metaloproteinasas de zinc) mostraron una actividad óptima en tampones de reacción a pH 7,8. Las proteasas de ácido aspártico fueron óptimamente activas a pH 4,0 o pH 6,0. Algunas serinas proteasas y proteasas de ácido aspártico se activaron mediante la adición de sal/iones de calcio (Ca^{2+}). Las tiol proteasas fueron significativamente más activas cuando se añadió cisteína al tampón de reacción. La endoproteinasa Lys-C fue la única proteasa que no estuvo activa en el Ensayo de Proteasas ENZCHEK® en las condiciones analizadas.

Para caracterizar la degradación de Fel d 1, se incubaron diferentes concentraciones de proteasas candidatas con Fel d 1 a 37 °C durante la noche (~ 18 horas), seguido de separación de proteínas por electroforesis en gel (SDS-PAGE en condiciones no reductoras) y tinción con COOMASSIE®. Una mezcla de reacción típica para analizar la degradación de Fel d 1 contenía 2,5 μg de Fel d 1 natural (se obtuvo Fel d 1, Fel d 1 Natural LOTOX® de Indoor Biotechnologies (LTN-FD1-1)) y concentraciones variables de proteasas candidatas en un volumen de reacción total de 20 μl (concentración final de Fel d 1 de 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Se ha informado que Fel d 1 es una glucoproteína tetramérica de 35 kDa formada por dos heterodímeros de 18 kDa. Por lo tanto, La degradación de Fel d 1 se evaluó por el grado de desaparición de la banda de proteína Fel d 1 a aproximadamente 18 kDa. Para la mayoría de las proteasas, las condiciones se optimizaron para promover la degradación completa de Fel d 1 con una actividad proteasa mínima. Para todas las proteasas probadas, la actividad mínima (ufr s^{-1}) así como la cantidad correspondiente de enzima (μg)

que se requería para degradar completamente 2,5 µg de Fel d 1 en 20 µl de tampón (con pH óptimo para la proteasa respectiva) se estimó basándose en la ausencia de la banda Fel d 1 en el gel de SDS-PAGE. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

5 Tabla 2: Caracterización y actividad de proteasas

Nombre o nombre comercial	Descripción/Fuente ^a	Actividad Fabricante ^b	EnzChek ^{®c} [rfu s ⁻¹ g ⁻¹]	pH opt. ^d	Actividad min. Req ^e [rfu s ⁻¹]	[µg]
Serina proteasas						
Alcalase [®] 2,4l	Subtilisina de <i>B. licheniformis</i>	≥ 2,4 U g ⁻¹	2,39 * 10 ⁷	pH 7,8	1-10	0,04-0,42
Savinase [®] 16,0l	Subtilisina de <i>Bacillus</i> sp.	≥ 16 U g ⁻¹	5,34 * 10 ⁸	pH 7,8	-100	-0,19
Everlase [®] 16,0l	Subtilisina de <i>Bacillus</i> sp.	≥ 16 U g ⁻¹	9,92 * 10 ⁷	pH 7,8	100-1000	1,0-10
Esperase [®] 8,0l	Subtilisina de <i>Bacillus</i> sp.	≥ 8 U g ⁻¹	1,08 * 10 ⁹	pH 7,8	-1000	-0,93
Purafect [®]	n. a.	n. a.	2,40 * 10 ⁸	pH 7,8	> 100	> 0,42
Protex [®] 6l	Subtilisina de <i>B. licheniformis</i>	7670 U g ⁻¹	5,33 * 10 ⁸	pH 7,8	10-100	0,02-0,19
Protex [®] 7l	Subtilisina de <i>B. amyloliquefaciens</i>	265 U g ⁻¹	1,51 * 10 ⁵	pH 7,8	< 1	< 6,6
Protex [®] 8l	Subtilisina de <i>B. licheniformis</i>	4760 U g ⁻¹	4,44 * 10 ⁸	pH 7,8	-100	-0,22
Protex [®] 30l	Subtilisina de <i>B. subtilis</i>	1745 U g ⁻¹	2,01 * 10 ⁷	pH 7,8	10-100	0,50-5,0
Protex [®] 40l	Subtilisina de <i>B. subtilis</i>	3525 U g ⁻¹	4,97 * 10 ⁸	pH 7,8	-100	-0,20
Protex [®] 89l	Subtilisina de <i>B. subtilis</i>	1930 U g ⁻¹	1,53 * 10 ⁷	pH 7,8	10-100	0,65-6,5
BLAP (Henkel)	Subtilisina de <i>B. lentus</i>	n. a.	2,40 * 10 ⁸	pH 7,8	> 100	> 0,42
Proteína K	Subtilisina de <i>Trichachium album</i>	38,4 U g ⁻¹	3,22 * 10 ⁷	pH 7,8	-1000	-31
Tripsina	páncreas de cerdo	1-2 MU g ⁻¹	1,95 * 10 ⁷	pH 7,8 Ca	10-100	0,51-5,1
α-quimiotripsina	páncreas de cerdo	≥40 kU g ⁻¹	2,35 * 10 ⁸	pH 7,8 Ca	10-100	0,04-0,42
Endoproteína Glu-C	V8 proteasa de <i>S. aureus</i>	~ 750 kU g ⁻¹	5,95 * 10 ⁶	pH 7,8	no activa	(> 16 µg)
Endoproteína Lys-C	<i>Lysobacter enzymogenes</i>	n. a.	no activa		no activa	(> 0,5 µg)
Tiol proteasas						
Bromelaina	piña	500 U g ⁻¹	7,35 * 10 ⁸	pH 7,8 Cys	270-2700	0,37-3,7
Papaina	papaya	> 3 * 10 ⁷ U g ⁻¹	6,40 * 10 ⁸	pH 7,8 Cys	-60	-0,093
Ficina	látex de higuera	200 U g ⁻¹	1,69 * 10 ⁹	pH 7,8 Cys	460-4600	0,28-2,8
Proteasas de ácido aspártico						
CHY-MAX [®]	Quimosina	n. a.	1,58 * 10 ⁴	pH 4,0 Ca	>10	>630
CHY-MAX [®]	Quimosina	n. a.	3,96 * 10 ³	pH 4,0	no activa	(>2,5 mg)
Thermolase [®]	Quimosina de <i>C. parasitica</i>	n. a.	1,59 * 10 ⁶	pH 4,0 Ca	-10	-6,3
Mucorpepsina	Quimosina de <i>Mucor miehei</i>	120 U g ⁻¹	4,07 * 10 ⁶	pH 4,0,4,07-41	1,0-10	
Pepsina	páncreas de cerdo	800 U g ⁻¹	2,55 * 10 ⁶	pH 4,0,2,55-26	1,0-10	
Protex [®] 15l	<i>Trichoderma reesei</i>	31 U g ⁻¹	3,40 * 10 ⁶	pH 4,0-10	2,9	
Protex [®] 26l	<i>Aspergillus niger</i>	190 U g ⁻¹	5,94 * 10 ⁶	pH 4,0-10	1,7	
Protex [®] 50FP	<i>Aspergillus oryzae</i> var.	105 U g ⁻¹	2,39 * 10 ⁶	pH 4,0-1	0,42	
Protex [®] 51FP	<i>Aspergillus oryzae</i> var.	1355 U g ⁻¹	2,21 * 10 ⁷	pH 6,0-100	4,5	
Metaloproteasas de Zinc						
Termolisina	<i>B. thermoproteolyticus rokko</i>	50-100 kU g ⁻¹	2,13 * 10 ⁸	pH 7,8	no activa	(>4,7 µg)
Protex [®] 14l (Gr)	Termolisina de <i>Geobacillus</i> sp.	38 U g ⁻¹	2,92 * 10 ⁶	pH 7,8	-500	-171
Endoproteína Asp-N	Flavastacina	25 kU g ⁻¹	2,24 * 10 ⁷	pH 7,8 ^f	-50	2,2

^aNombre de abrev. de microorganismos: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus lentus*, *Staphylococcus aureus*, *Cryphonectria parasitica*, *Bacillus thermoproteolyticus rokko*

^bActividad de la proteasa lot como se indica en la hoja de datos del fabricante. Las actividades (en U g⁻¹) se determinan por métodos variables y, por lo tanto, no se pueden comparar directamente

^cActividad (aumento de la fluorescencia por segundo, ufr s⁻¹) por cantidad de preparación de proteasa (g⁻¹) como se determina por el ensayo de proteasas EnzChek[®](Invitrogen, E6638)

^dpH del tampón de reacción al que se determinaron las mayores actividades mediante el ensayo de proteasas EnzChek[®]. Ca: adición de calcio. Cys, adición de cisteína

^eActividad mínima (como se determina en el ensayo de proteasas EnzChek[®](en ufr s⁻¹) y la correspondiente cantidad de preparación de proteasas (en µg) que se necesita para completar la degradación de 2,5 µg de Fel d 1 natural en 20 µl de mezcla de reacción como se determina por SDS-PAGE (véase el texto para los detalles)

^f Se usó el tampón suplementado por el fabricante para el ensayo de proteasas EnzChek[®] así como para la degradación de Fel d 1.

10 Se probaron varias serina proteasas candidatas para determinar su capacidad para degradar Fel d 1. Por ejemplo, se determinó la actividad proteolítica de Fel d 1 de una subtilisina de *B. licheniformis* (bl) (ALCALASE[®] 2.4L, Novozymes A/S Bagsvaerd, Dinamarca). Se incubó Fel d 1 natural (1,9 µg) con 0,1, 1 o 10 ufr s⁻¹ de la subtilisina de bl durante la noche a 37 °C en 20 µl de tampón Tris/HCl (200 mM, pH 7,8) o de tampón de acetato de amonio (100 mM, pH 4,0). Sirvieron como controles la subtilisina (10 ufr s⁻¹) sin Fel d 1 y Fel d 1 sin la subtilisina. Fel d 1 se degradó completamente por 10 ufr s⁻¹ de la subtilisina de bl en tampón Tris/HCl, pero no en condiciones de tampón de acetato de amonio como se determinó mediante SDS-PAGE y tinción con COOMASSIE[®] (Figura 1). Estos experimentos
15 revelaron que la cantidad mínima de subtilisina de bl necesaria para degradar completamente 1,9 µg de Fel d 1 en 20 µl de tampón Tris/HCl es 1-10 ufr s⁻¹ (0,04-0,42 µg).

Las subtilisinas de *B. clausii* (bc) (SAVINASE[®] 16.0L, EVERLASE[®] 16.0L, Novozymes) y *B. halodurans* (bh) (ESPERASE[®] 8.0L, Novozymes) también se evaluaron para determinar la cantidad mínima de proteasa necesaria

para degradar Fel d 1. En estos experimentos, se incubó Fel d 1 natural (2,5 µg) con 100 o 1000 ufr s⁻¹ de la subtilisina respectiva durante la noche a 37 °C en 20 µl de tampón de fosfato de sodio (100 mM, pH 7,8). Sirvieron como controles la proteasa (1000 ufr s⁻¹) sin Fel d 1 y Fel d 1 sin proteasa. Las cantidades mínimas de las proteasas respectivas necesarias para la degradación de 2,5 µg Fel d 1 en 20 µl se muestran en la Tabla 2.

Las tiol proteasas vegetales bromelaína, papaína y ficina de las plantas comestibles piña, papaya e higuera, respectivamente, se analizaron para determinar la degradación de Fel d 1. Para los experimentos de SDS-PAGE, Fel d 1 natural (2,5 µg) se incubó durante la noche a 37 °C con diferentes cantidades de papaína, bromelaína o ficina en tampón de fosfato de sodio (100 mM, pH 7,8) que contenía cisteína 40 mM. El tampón con cisteína sola, enzima sin Fel d 1 en tampón sin cisteína y Fel d 1 sin enzima (con y sin cisteína) sirvieron como controles. Las tiol proteasas bromelaína, papaína y ficina pudieron degradar completamente Fel d 1 según se determinó por SDS-PAGE y tinción con COOMASSIE®. Como se muestra en la Tabla 2, las condiciones óptimas para bromelaína, papaína y ficina determinadas por el Ensayo de Proteasas ENZCHEK® incluyen un pH de 7,8 en presencia de cisteína. De manera específica, la adición de cisteína 40 mM aumentó las actividades de cada una de bromelaína, papaína y ficina por factores de 270, 60 y 460, respectivamente, como se determinó por el Ensayo de Proteasas ENZCHEK®. La Tabla 2 muestra las cantidades mínimas de estas proteasas necesarias para la degradación de 2,5 µg de Fel d 1 en 20 µl de tampón que contiene cisteína.

Además, las proteasas de ácido aspártico endotiapepsina de *Cryphonectria parasitica* (THERMOLASE®, Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca) y la quimosina de origen bovino (CHY-MAX®, Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca) fueron ambas óptimamente activas a pH 4,0 en presencia de sales/iones de calcio (Ca²⁺) (Tabla 2). Se incubó Fel d 1 natural (2,5 µg) durante la noche a 37 °C con 0,1, 1 o 10 ufr s⁻¹ de las proteasas en 20 µl de tampón de acetato de amonio (100 mM, pH 4,0) que contenía cloruro de calcio 10 mM. El tampón sin Fel d 1 y Fel d 1 sin enzima sirvieron como controles en este experimento. La Tabla 2 muestra las cantidades de proteasas mínimamente necesarias para la degradación de 2,5 µg de Fel d 1 en 20 µl de tampón para las dos proteasas de ácido aspártico.

Se probó la capacidad de algunas de las proteasas candidatas para degradar 2,5 µg de Fel d 1 natural en 20 µl de tampón de reacción óptimo a 37 °C en puntos cortos de tiempo de incubación añadiendo un inhibidor de proteasa después de una o dos horas para detener la reacción. Las reacciones se visualizaron por SDS-PAGE seguido de tinción con COOMASSIE®. Se descubrió que 50 ufr s⁻¹ (2,1 µg) de una subtilisina *bl* (ALCALASE® 2.4L) era suficiente para degradar completamente Fel d 1 dentro de una hora de incubación cuando se usó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM como inhibidor. Además, 600 ufr s⁻¹ (0,93 µg) de papaína degradaron la mayoría de Fel d 1 después de una hora de incubación cuando se usó E64 10 µM como inhibidor. 500 ufr s⁻¹ (171 µg) de termolisina de *Geobacillus sp.* (PROTEX® 14L, DuPont Industrial Biosciences) fue suficiente para degradar completamente 2,5 µg de Fel d 1 después de la incubación durante la noche, pero solo se produjo una degradación parcial después de dos horas de incubación cuando se usó ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mM como inhibidor. Los estudios cinéticos que usan inhibidores de proteasas revelaron que la degradación completa de Fel d 1 generalmente se puede lograr en un tiempo más corto aumentando la concentración de proteasas. De manera análoga, podrían degradarse mayores cantidades de Fel d 1 aumentando la concentración de proteasas.

Para resumir, los resultados de los experimentos de proteólisis de Fel d 1 utilizando el conjunto de 32 candidatas de proteasas revelaron que las proteasas de todas las clases pudieron degradar completamente Fel d 1. Como se muestra en la Tabla 2, las proteasas candidatas exhibieron diversos grados de actividades de degradación de Fel d 1. La mayoría de las proteasas candidatas fueron capaces de degradar 2,5 µg de Fel d 1 en 20 µl a una actividad inferior a 100 ufr s⁻¹.

A continuación, la capacidad de los anticuerpos específicos de Fel d 1 para reconocer y unirse a Fel d 1 después de la proteólisis se determinó mediante ELISA. Los anticuerpos específicos para Fel d 1 natural y Fel d 1 se obtuvieron de Indoor Biotechnologies Ltd (Indoor Biotechnologies Ltd (Cardiff, Gales). Las condiciones de ELISA se determinaron de manera tal que fue posible una cuantificación confiable de Fel d 1 natural en un intervalo de concentraciones de 0,3 a 12 ng ml⁻¹. Varias proteasas candidatas, como se indica en la Figura 2, se incubaron con Fel d 1 (2,5 µg) durante la noche en 20 µl del tampón óptimo en actividades mínimamente necesarias para lograr la degradación completa de Fel d 1 (véanse las condiciones optimizadas indicadas en la Tabla 2). Las muestras se diluyeron hasta una concentración final de Fel d 1 teórica de 12 ng ml⁻¹ (concentración inicial de sustrato) y se analizaron mediante ELISA en dos momentos de lectura de ensayo diferentes (20 y 30 minutos). Después de incubar Fel d 1 con una proteasa candidata, se utilizaron placas recubiertas con anticuerpo anti-Fel d 1 para capturar Fel d 1. A continuación, se agregó un anticuerpo de detección ligado a enzimas que se une a Fel d 1, seguido de la adición de sustrato, que se convirtió enzimáticamente en una señal detectable. En el caso de que las proteasas degraden Fel d 1, de modo que los epítopos Fel d 1 necesarios para la unión al anticuerpo anti-Fel d 1 ya no estén presentes y/o no sean accesibles, los anticuerpos anti-Fel d 1 no se unirán a Fel d 1 y no se detectaría ninguna señal por ELISA. Como control para verificar que la actividad de las proteasas no estaba interfiriendo con el ensayo ELISA, el ELISA se repitió pero con la adición de una cantidad definida de Fel d 1. Los experimentos de SDS-PAGE descritos anteriormente se realizaron en todas las proteasas probadas para confirmar la degradación de Fel d 1 y los resultados de ELISA.

Los resultados se muestran en la Figura 2. Tal como se puede observar, la supresión completa de la unión de Fel d 1 a los anticuerpos específicos de Fel d 1 se logró con varias de las subtilisina serina proteasas, así como con la tripsina

y la alfa-quimotripsina; las tiol proteasas papaína, bromelaína y ficina; las proteasas de ácido aspártico mucorpepsina/renina, pepsina, aspergillopepsina, endotiapepsina y quimosina; y las metaloproteasas de zinc termolisina (de *Geobacillus*) y endoproteinasa Asp-N. La degradación de Fel d 1 hasta su finalización podría lograrse aumentando la concentración de otras proteasas diferentes. SDS-PAGE confirmó además que estas proteasas degradaron Fel d 1. Tomados en conjunto, Los experimentos ELISA y SDS-PAGE demuestran que la unión del anticuerpo se correlaciona con la degradación de Fel d 1. Para todas las proteasas probadas, el grado de degradación de Fel d 1, según lo estimado por SDS-PAGE, correspondió a la concentración residual de Fel d 1, según se determinó por ELISA. Sin pretender limitarse a un mecanismo particular, estos resultados sugieren que los productos de degradación de Fel d 1 ya no contienen epítomos que se unen a los anticuerpos específicos de Fel d 1, y que la degradación catalizada por proteasas de Fel d 1 da como resultado la supresión de la unión de Fel d 1 a anticuerpos de Fel d 1 específicos de epítomos. Por lo tanto, se espera que la degradación de Fel d 1 por las proteasas pueda suprimir las reacciones alérgicas mediadas por IgE. La mayoría de las proteasas probadas fueron capaces de degradar completamente Fel d 1 y suprimir la unión de los productos de degradación resultantes a anticuerpos específicos de epítomos. Las proteasas representativas de estos experimentos capaces de degradar completamente Fel d 1 (denominadas a continuación como proteasas "activas") incluyen papaína, subtilisina de *B. licheniformis* (subtilisina bl, PROTEX® 6L), aspergillopepsina de *A. oryzae* (aspergillopepsina ao, PROTEX® 50FP), endoproteinasa Asp-N, bromelaína, ficina, alfaquimotripsina, endotiapepsina de *Cryphonectria parasitica* (endotiapepsina cp, THERMOLASE®), pepsina y termolisina de *Geobacillus* sp. (PROTEX® 14L). La Tabla 3 resume las propiedades de estas proteasas de "activas", con detalles proporcionados en los siguientes Ejemplos.

Tabla 3: Resumen de propiedades de proteasas "activas"^a

Nombre/nombre comercial/tipo	Hidrólisis de queratina ^b		Vitalidad de los queratinocitos ^c		Hidrol de celulosa ^c	Inactivación de proteasas. DL ₅₀ ^e	
	Keratin azure	TNBS Ac. 405 nm	WST-1	Sulforhodamin B	Ac. Cellulose azure 575 nm	Isopropanol	Tween 20®
Grupo 1 de proteasas activas							
Papaína (tiol)	9,0 % ±7,4 %	0 ± 0,01	103,4 % ±19,9 %	99,1 % ± 2,4 %	0,00 ± 0,01	10,0 %- 12,5 %	10 %- 20 %
Protex® 6L. (serina)	34,0 % ±33,5 %	0,32 ± 0,02	110,5 % ± 40,1 %	107,5 % ± 3,3 %	0,00 ± 0,01	2,5 %-5,0 %	> 30 %
Protex® SOFP (aspartilo)	0,0 % ± 0,1 %	0,36 ± 0,06	92,8 % ± 17,8 %	108,2 % ± 2,0 %	0,08 ± 0,00	7,5 %- 10,0 %	> 30 %
Endoproteinasa Asp-N (metalo)	0,43 % ^f	0,68 ± 0,03	24,7 % ±4,6 %	3,7 % ± 3,0 %	n.d. ^g	7,5 %- 10,0 %	> 30 %
Grupo 2 de proteasas activas							
Bromelaína (tiol)	43,2 % ±23,3 %	0,28 ± 0,02	25,6 % ±5,2 %	6,7 % ±1,4 %	0,00 ± 0,02	> 25 %	20 %- 30 %
Ficina (tiol)	33,1 % ± 8,5 %	0,21 ± 0,02	23,3 % ±4,0 %	6,7 % ±0,5 %	0,00 ± 0,03	> 25 %	20 %- 30 %
Pepsina (aspartilo)	0,1 % ± 0,6 %	0 ± 0,04	92,4 % ±19,6 %	100,9 % ± 3,5 %	0,01 ± 0,01	5,0 %-7,5 %	n.d. ^g
Protex® 14L(metalo)	6,4 % ±13,6 %	1,75 ± 0,04	23,5 % ±4,6 %	5,1 % ± 0,7 %	0,00 ± 0,02	5,0 %-7,5 %	n.d. ^g
α-quimotripsina (serina)	22,3 ± 17,8 %	0,63 ± 0,01	95,8 % ± 22,8 %	101,3 % ± 2,9 %	0,00 ± 0,01	5,0 %-7,5 %	n.d. ^g
Thermolase® (aspartilo)	0,0 % ± 0,2 %	0,21 ± 0,04	89,1 % ± 18,5 %	101,8 % ± 5,2 %	0,00 ± 0,01	2,5 %-5,0 %	n.d. ^g

(continuación)

Nombre/nombre comercial/tipo	Hidrólisis de queratina ^b		Vitalidad de los queratinocitos ^c		Hidrol de celulosa ^c	Inactivación de proteasas. DL ₅₀ ^e	
	Keratin azure	TNBS Ac. 405 nm	WST-1	Sulforhodamin B	Ac. Cellulose azure 575 nm	Isopropanol	Tween 20®

^aPara todas las pruebas, se usaron concentraciones de proteasas mínimamente necesarias para degradar 125 µg ml⁻¹ de Fel d 1 en condiciones óptimas (véase la Tabla 2) y la incubación tuvo lugar durante la noche a 37 °C

^b La hidrólisis de queratina por proteasas se determinó con keratin azure como sustrato sustituto o directamente sobre queratina, mientras que los productos de hidrólisis se determinaron mediante el ensayo TNBS (datos extraídos de la Figura 12). La actividad sobre keratin azure se determinó como porcentaje de la cantidad máxima de sustrato hidrolizable. La actividad en el ensayo TNBS se determinó por la absorbancia del producto de acoplamiento formado a 405 nm. Véase texto para detalles experimentales.

^c La vitalidad de los queratinocitos en presencia de proteasas se determinó como se describe en el texto. Se aplicaron dos métodos diferentes de tinción de toxicidad celular (WST-1 y Sulforhodamin B) y se determinó la vitalidad como porcentaje de la vitalidad de los queratinocitos que no se incubaron con proteasas.

^d La hidrólisis de celulosa por proteasas se determinó con cellulose azure como sustrato sustituto. El ensayo se realizó por duplicado y según lo propuesto por el fabricante (véase el texto para más detalles). La actividad de hidrólisis de celulosa corresponde a la liberación del colorante azul, que se determinó espectrofotométricamente a 575 nm. Como control positivo sirvieron 2,5 unidades de celulasa de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich. C1184), que resistió en una absorción de 0,28 ± 0,01.

^e La inactivación de las proteasas por isopropanol y Tween 20® se determinó mediante la estimación del intervalo de concentración en el que la degradación de Fel d 1 por las proteasas se redujo en más del 50 % (DL₅₀). Véase texto para detalles.

^f Determinado solo por un único experimento

^g n.d., no determinado

Ejemplo 2

- 5 En todas las aplicaciones que emplean degradación mediada por proteasas de Fel d 1, el gato y el usuario estarían expuestos a la actividad de proteasas. Los filamentos de la proteína queratina son abundantes en los queratinocitos en la capa cornificada de la epidermis (piel), así como en el cabello y las uñas de seres humanos y gatos. Por lo tanto, la identificación de las proteasas de Fel d 1 candidatas con actividad proteolítica reducida contra la queratina sería útil para abordar los problemas de seguridad en el desarrollo de productos destinados a aplicaciones en seres humanos y en animales.

15 Para caracterizar la especificidad de sustrato de las proteasas candidatas activas contra proteínas fisiológicamente relevantes, se determinó la capacidad de las proteasas activas de Fel d 1 candidatas para hidrolizar queratina. Keratin azure (Sigma-Aldrich, K8500) está compuesta de queratina de lana de oveja impregnada con colorante azul y se usa como un sustrato de queratina para cuantificar la actividad de las proteasas. Keratin azure se incubó durante la noche con proteasas activas en condiciones óptimas (como se determinó en el ensayo de proteasas ENZCHEK®) y a concentraciones de proteasas que se descubrió que degradaban por completo 125 µg ml⁻¹ de Fel d 1 (Tabla 2). Después se determinó la degradación de keratin azure. En tres repeticiones, una actividad de degradación significativa solo se podía determinar de manera reproducible con este ensayo para las tiol proteasas bromelaína y ficina, que degradaron 43,2 % ± 23,3 % y 33,1 ± 8,5 % de keratin azul aplicado, respectivamente (Tabla 3). Las aspartil proteasas aspergillopepsina de *A. oryzae* (aspergillopepsina ao, PROTEX® 50FP), endotiapepsina de *Cryphonectria parasitica* (endotiapepsina cp, THERMOLASE®) y pepsina no estaban activas, ya que en promedio degradaron menos del 1 % de keratin azure (Tabla 3).

25 Para caracterizar aún más la actividad degradante de queratina de las proteasas activas, se realizó un ensayo que detecta colorimétricamente los productos de degradación de queratina mediante el uso de una reacción de acoplamiento con reactivo de ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS). Este ensayo permitió la determinación de la actividad hidrolizante de todas las enzimas probadas usando polvo de queratina de lana de oveja como sustrato. La papaína y la pepsina no mostraron actividad degradante de queratina. Todas las otras proteasas activas fueron activas contra el sustrato de queratina. La actividad degradante de queratina de termolisina de *Geobacillus* fue al menos dos veces mayor en comparación con todas las otras proteasas probadas (Figura 3). Los resultados del ensayo de keratin azure descrito anteriormente se correlacionaron con los resultados del ensayo de queratina basado en TNBS, con la excepción de las dos proteasas de ácido aspártico aspergillopepsina ao y endotiapepsina cp (Tabla 3). Para estas dos proteasas de ácido aspártico y Endoproteinasa Asp-N, las condiciones del tampón pueden haber afectado las mediciones de la actividad degradante de la queratina según lo determinado por el ensayo TNBS. Esto se debe a que el tampón de acetato de amonio (100 mM, pH 4,0), así como el tampón Endoproteinasa Asp-N (que fue suplementado por el fabricante) mostraron un nivel basal de actividad degradante de queratina en el ensayo en ausencia de proteasa. Además, el ensayo basado en TNBS determina la proteólisis directamente sobre la queratina, mientras que el ensayo de keratin azul usa un sustrato de queratina derivatizado, lo que podría explicar aún más las inconsistencias entre los resultados de los dos ensayos para algunas de las proteasas activas probadas.

Como modelo para las células vivas de la piel, se probaron los efectos citotóxicos de las proteasas activas en los queratinocitos. Se cultivó una línea celular primaria de queratinocitos humanos para confluencia en microplacas y se analizó la viabilidad celular después de la incubación durante la noche con las proteasas activas a concentraciones mínimas encontradas para degradar completamente 125 µg ml⁻¹ de Fel d 1 (Tabla 2). Debido a que las células de mamíferos cultivadas son altamente susceptibles a los cambios en la composición y el pH del medio de cultivo celular, las proteasas se diluyeron directamente en el medio de cultivo celular. Después de la incubación durante la noche con las proteasas, se añadió tetrazolio soluble en agua WST-1 al cultivo celular (capa confluyente y medio) (reactivo de proliferación celular WST-1, Roche Diagnostics). El WST-1 incoloro se reduce a un tinte de color amarillo (formazán) debido a la transferencia de electrones catalizada por las deshidrogenasas mitocondriales de las células vitales. Por consiguiente, la formación de tinte color amarillo indica la vitalidad celular de las células tanto adherentes como desprendidas. La vitalidad celular de las células adherentes solas se determinó mediante tinción con Sulforhodamin B después de la incubación durante la noche con proteasas. La formación del color rojo es una medida de la concentración de proteínas, que se correlaciona con la concentración de células adherentes. Las células que no se incubaron con proteasas sirvieron como control. Para todas las proteasas probadas, se obtuvieron resultados comparables para ambos ensayos (Figura 4, Tabla 3). Como se puede observar, se determinó un efecto citotóxico relativamente alto (baja vitalidad celular restante) para bromelaína, ficina, termolisina de *Geobacillus* y endoproteinasa Asp-N. Todas las demás proteasas activas (papaína, aspergillopepsina *ao*, pepsina, endotiapepsina *cp*, subtilisina *bl* y alfa-quimotripsina) no tuvieron un efecto significativo sobre la vitalidad celular en comparación con las células no tratadas (cuya vitalidad celular correspondía al 100%).

Para las proteasas que provocaron efectos citotóxicos sobre los queratinocitos, los efectos irritantes de la piel no pueden predecirse con certeza porque los queratinocitos de la piel están protegidos por varias capas de queratina. Sin embargo, para las proteasas que no provocaron efectos citotóxicos, los efectos irritantes de la piel son poco probables.

Los resultados del ensayo de citotoxicidad (Figura 4) fueron menos graduales en comparación con los resultados del ensayo de degradación de queratina TNBS (Figura 3). Las proteasas tuvieron un efecto citotóxico significativo o no lograron provocar citotoxicidad. No obstante, estaban presentes las correlaciones entre los resultados de los dos ensayos. Por ejemplo, papaína y pepsina no mostraron efecto en ninguno de los ensayos. Por otro lado, los efectos citotóxicos de bromelaína, ficina, termolisina de *Geobacillus* y endoproteinasa Asp-N sobre los queratinocitos se confirmaron por el ensayo TNBS.

Para evaluar adicionalmente la actividad de la papaína, los queratinocitos se incubaron en medio de cultivo celular durante la noche con papaína en concentraciones 1000 veces mayores en comparación con la concentración mínima de proteasa necesaria que se muestra en la Tabla 2. Esto dio lugar a efectos citotóxicos significativos, con un 31 % y 8 % de vitalidad celular según lo determinado por los ensayos con WST-1 y sulfurohodamin B, respectivamente. La mayoría de las aplicaciones cosméticas no requieren incubación durante la noche. La microscopía reveló que no se produjo un desprendimiento de células significativo después de la primera hora de incubación, incluso en presencia de una concentración de papaína 1000 veces mayor, lo que indica la ausencia de efectos citotóxicos en este punto temporal anterior.

El efecto de las preparaciones de proteasas sobre las fibras de celulosa se probó con cellulose azure (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), que es un sustrato análogo a keratin azure. Este experimento se realizó para estimar el efecto de las preparaciones de proteasas activas en textiles de algodón. La hidrólisis proteolítica de celulosa se determinó usando cellulose azure como sustrato sustituto. El ensayo se realizó por duplicado y según lo propuesto por el fabricante. La actividad de hidrólisis de celulosa corresponde a la liberación del colorante azul, que se determinó espectrofotométricamente a 575 nm. Como control positivo, se midieron 2,5 unidades de celulasa de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, C1184), lo que dio como resultado en una absorción de $0,28 \pm 0,01$. De las diez proteasas activas, solo aspergillopepsina *ao* (PROTEX® 50FP) mostró actividad significativa durante la incubación durante la noche en el tampón de degradación óptimo de Fel d 1 (Tabla 2), correspondiente al $28 \% \pm 2 \%$ de la actividad del control positivo (Tabla 3). La actividad de celulasa de esta (o cualquier) proteasa fue inesperada porque las proteasas generalmente no aceptan polisacáridos como sustrato. Presumiblemente, esta preparación de proteasa es un extracto en bruto de *Aspergillus oryzae* que sobreproduce proteasa y, por lo tanto, contiene otras enzimas que se originan a partir del hospedador de expresión, tal como las celulosas.

La mayoría de las proteasas activas mostraron ninguna o solo poca actividad queratinolítica o efectos citotóxicos (Figuras 3 y 4 y Tabla 3). Excepto por la preparación de aspergillopepsina *ao* (PROTEX® 50FP), las proteasas activas no estaban activas en cellulose azure, lo que indica su incapacidad para degradar los textiles de algodón. Además, el uso de altas concentraciones de proteasas como la papaína en productos cosméticos indica que su uso en aplicaciones para degradar Fel d 1 puede ser seguro tanto para el usuario como para el gato.

Ejemplo 3

Las posibles aplicaciones incluyen agentes de limpieza o toallitas, tales como para la limpieza de muebles u otras superficies contaminadas con Fel d 1. Los agentes de limpieza típicos contienen disolventes, tales como etanol o isopropanol desnaturalizado, como desinfectantes y para disolver aceite y grasa. La concentración de isopropanol de

un limpiador de bañera típico es del 10 al 15 %. Sin embargo, los disolventes como el isopropanol pueden inactivar enzimas como las proteasas. Por lo tanto, se evaluó la actividad de las proteasas activas en medios que contienen isopropanol. Debido a que los agentes de limpieza se diluyen generalmente en agua, la actividad degradante de Fel d 1 de las proteasas activas se probó en presencia de isopropanol a concentraciones entre 0 y 12,5 %.

Las proteasas activas se incubaron durante la noche con 0, 2,5 %, 5,0 %, 7,5 %, 10,0 % y 12,5 % de isopropanol en concentraciones y en condiciones de reacción óptimas para la degradación de Fel d 1 (Tabla 2). Las muestras se diluyeron y analizaron por ELISA con intervalos de tiempo de lectura de 20 minutos. Como se muestra en la Figura 5, la concentración residual de Fel d 1 representa el porcentaje de Fel d 1 determinado para las muestras en comparación con el Fel d 1 para los controles de tampón respectivos con una concentración máxima de isopropanol pero en ausencia de proteasa. La Figura 5 muestra promedios y desviaciones estándar de tres repeticiones independientes.

Con la excepción de la bromelaína y la ficina, la actividad de todas las proteasas se redujo en al menos un 50 % en presencia de un 12,5 % de isopropanol. Las tiol proteasas fueron las menos sensibles a isopropanol. Incluso en presencia de 12,5 % de isopropanol, papaína, bromelaína y ficina degradaron aproximadamente del 40 % al 70 % del Fel d 1 añadido (Figura 5). En un experimento adicional con 25 % de isopropanol, bromelaína y ficina degradaron más del 50 % de Fel d 1. Por el contrario, las proteasas de ácido aspártico fueron las más sensibles a isopropanol. Aspergillopepsina *ao* (PROTEX® 50FP), pepsina y endotiapepsina *cp* se inactivaron en más del 90 % en presencia de 12,5 % de isopropanol. Como control, los experimentos ELISA revelaron que no se encontró que el isopropanol solo redujera significativamente la concentración de Fel d 1. Dado esto, bromelaína o ficina parecen ser proteasas especialmente adecuadas para degradar Fel d 1 presente en el polvo o en superficies, utilizando un agente de limpieza que contiene isopropanol. Estas proteasas degradan activamente Fel d 1, incluso en concentraciones de isopropanol que exceden las de las aplicaciones de limpieza típicas.

Debido a que el contacto con la piel, el cabello y el pelaje es mínimo y transitorio, no se espera que las actividades queratinolíticas más altas de la bromelaína y la ficina, en comparación con las otras proteasas probadas, sean perjudiciales. Además, la bromelaína y la ficina generalmente se consideran seguras cuando se usan en cosméticos (véase anteriormente) o en el procesamiento de la nutrición (por ejemplo, como ablandador de carne).

Ejemplo 4

Las posibles aplicaciones para reducir la concentración de Fel d 1 en el pelaje del gato incluyen champús o polvos secos, mousses/ espumas que contienen proteasas entre otras composiciones. Se ha estimado un total de 67 mg de Fel d 1 por gato. Aunque solo una pequeña fracción del alérgeno pasa al aire, la gran cantidad de Fel d 1 presente en el gato indica el beneficio significativo que se obtiene al reducir la cantidad de Fel d 1 en el pelaje y/o la piel del gato. Se ha informado que el uso de champús para mascotas convencionales en gatos reduce la concentración de Fel d 1 en el pelaje, así como la concentración de Fel d 1 en el aire en el hogar del gato. La eficacia de los champús convencionales puede aumentarse mediante la adición de proteasas como se describe en el presente documento.

La mayoría de las formulaciones de champú contienen una mezcla de diferentes tensioactivos, de los cuales los tensioactivos aniónicos son la clase más grande. Los tensioactivos no iónicos son la segunda clase más grande de tensioactivos y tienen poliéter o polihidroxilo como grupo polar para aumentar la solubilidad en agua. Los tensioactivos no iónicos se usan ampliamente en aplicaciones tópicas porque, tienen una capacidad reducida para provocar irritación en comparación con los tensioactivos aniónicos. Esta propiedad hace que los tensioactivos no iónicos sean atractivos para los champús para mascotas que contienen proteasas. TWEEN® 20 (polisorbato 20) se usa con frecuencia como tensioactivo no iónico en nutrientes y cosméticos. Está registrado como un aditivo alimentario aprobado (E-432) en la Unión Europea y también en el índice INCI (Nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos). Debido a que es un aditivo alimentario aprobado, TWEEN® 20 puede usarse como ingrediente de champú y no plantearía problemas de seguridad si el gato ingiere accidentalmente parte de él durante el procedimiento de lavado.

El efecto de TWEEN® 20 sobre la actividad degradante de Fel d 1 de las proteasas activas se probó después de la incubación durante la noche con 0, 10 %, 20 % y 30 % de TWEEN® 20 y a concentraciones de proteasa y en condiciones de reacción óptimas para la degradación de Fel d 1 como se muestra en la Tabla 2. Las muestras se diluyeron y analizaron por ELISA con intervalos de tiempo de lectura de 20 minutos. La concentración residual de Fel d 1 indicada representa el porcentaje de Fel d 1 determinado para las muestras comparadas con el Fel d 1 para los controles de tampón con las concentraciones de TWEEN® 20 respectivas pero sin proteasa. Los promedios y las desviaciones estándar se determinaron a partir de tres repeticiones independientes. Todas las proteasas activas probadas mostraron tolerancia a TWEEN® 20. Incluso a la concentración más alta probada de TWEEN® 20 al 30 %, ninguna de ellas fue completamente inactivada. Al TWEEN® 20 al 10 %, más del 50% de los 125 µg ml⁻¹ Fel d 1 se degradó para todas las proteasas (Figura 6, Tabla 3). Debido a que una formulación típica de champú contiene aproximadamente TWEEN® 20 al 40 % y sufre una dilución de aproximadamente 20 veces durante la aplicación, las proteasas tendrían que ser activas en concentraciones de aproximadamente TWEEN® 20 al 2 % para retener la actividad de degradación de Fel d 1. En consecuencia, se predice que todas las proteasas activas son adecuadas para aplicaciones de champú.

Un producto para la piel con pH neutro tiene un pH de aproximadamente 5,5, que corresponde al pH en la piel. La

actividad degradante de Fel d 1 de la proteasa de ácido aspártico aspergillopepsina *ao* (PROTEX® 50FP) no se vio afectada por TWEEN® 20 incluso a la concentración más alta probada del 30 % (Figura 6). Aunque, se descubrió que esta proteasa tenía la mayor actividad a pH 4,0 (véase la Tabla 2), aún conservaba el 46 % de actividad a pH 6,0 en el ensayo de proteasa ENZCHEK®. Además, La aspergillopepsina *ao* (PROTEX® 50FP), que no mostró actividad de degradación cuando se usó keratin azure como sustrato (Tabla 3), mostró solo una actividad mínima contra la queratina (Figura 3) y no tuvo citotoxicidad significativa hacia los queratinocitos (Figura 4). Estas propiedades sugieren que aspergillopepsina *ao* (PROTEX® 50FP) es adecuada para su uso en un champú que contiene proteasas para la reducción de Fel d 1.

La papaína también puede ser una alternativa adecuada a aspergillopepsina *ao* (PROTEX® 50FP) en aplicaciones de champú. Aunque la papaína es menos tolerante a TWEEN® 20 que aspergillopepsina *ao* (PROTEX® 50FP), permanece activa a las concentraciones de TWEEN® 20 esperadas de 2 % durante la aplicación (Figura 6). La papaína mostró una actividad de degradación de Fel d 1 comparable a pH 7,4 y pH 6,0, por lo que es probable que sea adecuada para su uso en un champú con pH neutro. La papaína no fue activa contra la queratina en el ensayo TNBS (Figura 3) y no indujo una citotoxicidad significativa contra los queratinocitos (Figura 4). La papaína no era activa en el sustrato de cellulose azure y, por lo tanto, es probable que no muestre actividad de degradación contra los textiles de algodón (Tabla 3). La papaína también se usa en altas concentraciones en nutrientes (ablandador de carne, salsas para barbacoa) y cosméticos (peeling de con enzimas) sin necesidad de inactivación por calor antes de su uso. La papaína es probablemente aplicable como ingrediente del champú, incluso si el gato ingiere accidentalmente el champú durante el procedimiento de lavado.

Ejemplo 5

Otra aplicación es un producto que contiene proteasas para usar en la boca de un gato, incluyendo dentífricos, enjuagues, bebidas, alimentos o golosinas, tiras o películas. Dichos productos pueden reducir la concentración de Fel d 1 en la boca del gato, que es una fuente importante del alérgeno. Para probar la actividad de las proteasas en condiciones similares a la aplicación, se estableció un modelo para la saliva del gato. La preparación de saliva artificial de gato se basó en preparaciones de saliva humana artificial publicadas (McKnight-Hanes & Whitford, 1992, Caries Res. 26: 345-350) (Tabla 4).

Tabla 4: Composición de saliva artificial de gato

Ingredientes	Contenidos por litro ^a
Metil- <i>p</i> -hidroxibenzoato	2 g
Carboximetilcelulosa sódica	10 g
KCl	625 mg
MgCl ₂ x 6H ₂ O	59 mg
CaCl ₂ x 2H ₂ O	166 mg
K ₂ hpo ₄	804 mg
KH ₂ PO ₄	326 mg
L-cisteína	4,85 g
Suplementos para "condiciones extremas"	
Fel d 1	125 mg
Leche desnatada	7,14 g
Suplementos para "condiciones normales"	
Fel d 1	12,5 mg
Leche desnatada	4,50 g

^a Los componentes se disuelven en agua y el pH se ajusta a 7,5 con solución de KOH

^b Las condiciones extremas y normales son puntos de referencia que se refieren a las concentraciones de alérgenos y proteínas, que están por encima de lo esperado y en los niveles promedio, respectivamente (véase el texto para más detalles)

El pH se ajustó a 7,5, que es el pH de la saliva de gato. Se determinó que la concentración de Fel d 1 en la saliva del gato era de entre 0,3 a 45 µg/ml (población total de gatos) y de 2,2 a 12,4 µg/ml para un grupo intermedio, que está representado por un tercio de la población total. La concentración máxima de Fel d 1 en la saliva artificial de gato se definió como 125 µg ml⁻¹, ya que esta concentración se usó en todos los experimentos anteriores, aunque excedía la concentración máxima prevista de Fel d 1 en la saliva de gato en un factor de 2 a 3.

Se usó leche desnatada, que contiene aproximadamente 35 % de proteína, para simular el contenido de proteína en la saliva. La leche desnatada también contiene otros componentes, tales como carbohidratos, que están relacionados con la composición compleja de la saliva real y, por lo tanto, se prevé que el modelo sea más realista. Se ha informado que la saliva humana de diferentes individuos contiene entre 0,67 y 2,37 mg ml⁻¹ de proteína (según lo determinado por diferentes técnicas con albúmina de suero bovino como patrón). Esta estimación se utilizó como una aproximación para el contenido de proteínas en la saliva de gato. Se definió un contenido máximo de proteína de 2,5 mg ml⁻¹ para la saliva artificial de gato, que estaba representada por 7,14 mg ml⁻¹ de leche desnatada. Como se analiza anteriormente, se ha encontrado que la cisteína activa determinadas proteasas para la degradación de Fel d 1. El efecto fue más prominente para las tiol proteasas, tal como la papaína, la bromelaina y la ficina (véase arriba).

Los efectos de diferentes concentraciones de Fel d 1 y leche desnatada, así como el requerimiento de cisteína para la degradación de Fel d 1 en saliva artificial, se probaron utilizando la proteasa papaína activa con incubación durante la noche a 37 °C (Figura 7). Se usó papaína a la concentración mínima necesaria para degradar completamente 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de Fel d 1 en condiciones óptimas, es decir, en tampón de fosfato de sodio a pH 7,8 (Tabla 2). Similar a los experimentos previos realizados en tampón, se demostró que L-cisteína 40 mM es esencial para la degradación eficaz de Fel d 1 por la papaína en la saliva artificial de gato (Figura 6); sin embargo, este requisito podría ser satisfecho por otros componentes de la formulación, especialmente en composiciones comestibles tales como alimentos, bebidas o golosinas.

Aunque, las condiciones de reacción en la saliva artificial de gato diferían significativamente de las condiciones de reacción óptimas indicadas en la Tabla 2, la mayoría de los 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de Fel d 1 agregados se degradaron durante la incubación durante la noche (en presencia de cisteína) para concentraciones de leche desnatada de hasta 714 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Figura 7). No obstante, la actividad de degradación de Fel d 1 disminuyó con el aumento de la concentración de leche desnatada, probablemente debido al aumento de la concentración de proteínas. Las proteínas de la leche desnatada consisten principalmente en caseína, y se demostró que la caseína se hidroliza con papaína mediante el ensayo de proteasas ENZCHEK®, que utiliza caseína marcada como sustrato (Tabla 2). La caseína y Fel d 1 representan, por lo tanto, sustratos competitivos para la degradación por papaína. Por lo tanto, sería necesario aumentar la concentración de papaína para degradar completamente Fel d 1 a la concentración más alta de leche desnatada (y en presencia de cisteína). Además, un aumento en la concentración de papaína probablemente daría como resultado una degradación de Fel d 1 más rápida, que sería preferida para degradar Fel d 1 en la saliva dentro del marco de tiempo en el que el gato consume el alimento o bebida para mascotas que contiene proteasas, o está de otro modo expuesto oralmente a una formulación que contiene proteasas.

Se desarrollaron dos tipos de saliva artificial de gato para pruebas adicionales (Tabla 4). El primer tipo representaba "condiciones extremas", y contenía 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de Fel d 1 (concentración de 2 a 3 veces mayor que la concentración máxima determinada en la saliva de gato) y 7140 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de leche desnatada (correspondiente al contenido de proteína máximo determinado en saliva humana). Estas concentraciones de alérgenos y proteínas están por encima de los niveles esperados y se proporcionan para estimar la actividad excedente de las proteasas en una aplicación de alimentos para mascotas. El segundo tipo representaba "condiciones normales", y contenía 12,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de Fel d 1 (que representa el límite superior de las concentraciones de Fel d 1 según lo determinado en el grupo de gatos intermedios) y 4,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de leche desnatada (correspondiente a la concentración promedio de proteínas en la saliva humana de 1,6 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Estas concentraciones de alérgenos y proteínas representan un nivel promedio esperado en la saliva de la mayoría de los gatos.

Para identificar la actividad de las proteasas necesaria para degradar Fel d 1 en la saliva artificial de gato (en condiciones normales y extremas) en un período de tiempo relativamente corto, las proteasas activas papaína, subtilisina *bl* (PROTEX® 6L), aspergillopepsina $\alpha\alpha$ (PROTEX® 50FP) y la endoproteinasa Asp-N se evaluaron mediante análisis cinético adicional a actividades enzimáticas superiores. Los experimentos preliminares revelaron que se requiere hasta un aumento de 1000 veces de papaína, de 4,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (correspondiente a la concentración mínima necesaria para degradar completamente Fel d 1 en condiciones óptimas durante una incubación durante la noche, Tabla 2) a 4500 $\mu\text{g ml}^{-1}$, para degradar completamente Fel d 1 en saliva artificial de gato en condiciones extremas dentro de 1 hora de incubación.

Por lo tanto, para la subtilisina *bl*, se probaron cantidades que fueron 10 veces, 100 veces y 1000 veces mayores que 9,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de subtilisina *bl*, que era la concentración mínima de proteasa necesaria para degradar 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de Fel d 1 en condiciones óptimas durante una incubación durante la noche (Tabla 2) en saliva artificial de gato en condiciones extremas para la degradación de Fel d 1 después de una y 20 horas de incubación a 37 °C (Figura 8). Por consiguiente, se incubaron 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de Fel d 1 natural durante 0 minutos, 1 hora o 20 horas (durante la noche) con 0, 9,5, 95, 950 y 9500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de subtilisina *bl* a 37 °C en saliva artificial de gato (condiciones extremas, véase la Tabla 4). La reacción se detuvo mediante la adición de PMSF 1 mM. Las muestras se diluyeron y analizaron por ELISA con intervalos de tiempo de lectura de 30 minutos. Teniendo en cuenta la dilución, se esperaba una concentración máxima de 12 ng ml^{-1} de Fel d 1 (es decir, sin tener en cuenta la posibilidad de degradación). Los promedios y las desviaciones estándar se determinaron a partir de dos repeticiones independientes del experimento. Similar a los experimentos preliminares con papaína, se requirió una concentración de subtilisina *bl* 1000 veces mayor para degradar completamente Fel d 1 en 1 hora en saliva artificial de gato en condiciones extremas (Figura 8).

Para determinar aún más la eficacia de las proteasas en un exceso de 1000 veces, se analizó cinéticamente la degradación de Fel d 1 por papaína y subtilisina *bl* en saliva artificial de gato en condiciones normales y extremas en tiempos de incubación más cortos (Figura 9). Se incubó papaína y 9,5 mg ml^{-1} de subtilisina *bl* durante 0, 5, 10, 15 y 60 min con Fel d 1 en saliva artificial de gato a 37 °C en condiciones normales y extremas (Tabla 4). Las reacciones se detuvieron mediante la adición de E64 100 μM (para papaína) y PMSF 1 mM (para subtilisina *bl*). Las muestras se diluyeron y analizaron por ELISA con intervalos de tiempo de lectura de 30 minutos. La concentración residual de Fel d 1 representa el porcentaje de Fel d 1 determinado para las muestras en comparación con el Fel d 1 para los controles de tampón respectivos sin proteasa. Los promedios y las desviaciones estándar se determinaron a partir de tres repeticiones independientes. La mayor parte del Fel d 1 ya se había degradado después de 5 minutos con subtilisina

bl (9,5 mg ml⁻¹) en saliva artificial de gato en condiciones normales y extremas. Los experimentos revelaron que subtilisina *bl* era algo más eficaz que la papaína. Sin embargo, en condiciones normales, que corresponden a la composición promedio de saliva de gato, más del 80 % de Fel d 1 fue degradado por papaína (4.5 mg ml⁻¹) en 5 minutos (Figura 9). La actividad aparente de degradación de Fel d 1 en estas condiciones a los 0 min podría explicarse posiblemente por la actividad residual a pesar de la adición inmediata de inhibidor E64 para terminar la reacción. Este efecto se evitó en los siguientes experimentos mediante la adición de ambos inhibidores, E64 y PMSF, para terminar la actividad de las combinaciones de papaína y subtilisina *bl* (Figuras 10-12).

En el contexto de una aplicación de alimentos para mascotas, donde un gato con una concentración promedio de Fel d 1 y proteína en la saliva tarda alrededor de cinco a diez minutos para comer, se pronostica que tanto la papaína como la subtilisina *bl*, presente en las concentraciones probadas, degradarán el alérgeno en más del 80 % en 5 minutos. Ambas concentraciones probadas, 4,5 mg ml⁻¹ de papaína y 9,5 mg ml⁻¹ de subtilisina *bl*, respectivamente, están presentes en concentraciones que están en exceso masivo sobre el Fel d 1 aplicado (125 µg ml⁻¹). Sin embargo, este exceso de enzima promueve la degradación acelerada de Fel d 1, de modo que la mayor parte se degrada en pocos minutos.

Se probaron diferentes combinaciones de papaína y subtilisina *bl* para identificar efectos sinérgicos sobre la degradación de Fel d 1, lo que permitiría una disminución en la concentración total de proteasas, mientras se mantiene la eficacia de la degradación de alérgenos comparable a la de una proteasa única en la aplicación final de alimento para gatos. La tiol proteasa papaína y la subtilisina *bl* pertenecen a diferentes familias mecanicistas de proteasas y, por lo tanto, tienen diferentes especificidades de sustrato. Sin pretender limitarse a un mecanismo particular, se cree que las dos proteasas podrían actuar sinérgicamente al descubrir mutuamente nuevos sitios de escisión en la cadena del polipéptido Fel d 1, lo que da como resultado una degradación más rápida y más eficaz en comparación con la degradación lograda mediante el uso de una sola proteasa.

Las dos proteasas se probaron en combinación para determinar su capacidad de degradar sinérgicamente Fel d 1 en saliva artificial de gato a las concentraciones previamente probadas para cada proteasa sola (4500 µg ml⁻¹ de papaína y 9500 µg ml⁻¹ de subtilisina *bl*, Figura 9). Además, la degradación de Fel d 1 se probó a concentraciones de proteasas reducidas en un factor de 10, 100 y 1000. Se requirieron mínimamente 450 µg ml⁻¹ de papaína y 950 µg ml⁻¹ de subtilisina *bl* para degradar completamente Fel d 1 en una hora (Figura 10). En la combinación con las concentraciones de proteasas probadas más altas (4500 µg ml⁻¹ de papaína y 9500 µg ml⁻¹ de subtilisina *bl*), se logró la degradación completa de Fel d 1 después de 10 minutos (Figura 10). Este efecto fue comparable al efecto de 9500 µg ml⁻¹ de subtilisina *bl* sola (Figura 9).

Para evaluar la contribución de la subtilisina *bl*, se varió su concentración de 1188 a 9500 µg ml⁻¹ mientras se mantuvo constante la concentración de papaína (a 4500 µg ml⁻¹) (Figura 11). Solo se observó una pequeña diferencia en la degradación de Fel d 1 cuando se combinaron 4500 µg ml⁻¹ de papaína con 9500 o 4750 µg ml⁻¹ de subtilisina *bl*. Por lo tanto, sería suficiente una combinación de 4500 µg ml⁻¹ de papaína y 4750 µg ml⁻¹ de subtilisina *bl* para degradar la mayoría de Fel d 1 presente en saliva de gato en 10 minutos, incluso en condiciones extremas. En condiciones normales, como es el caso de la mayoría de los gatos, la combinación con la concentración de subtilisina *bl* más baja (1188 µg ml⁻¹) es suficiente para degradar aproximadamente el 90 % de Fel d 1 en 10 minutos.

Para evaluar la contribución de la papaína, se varió su concentración de 565 a 4500 µg ml⁻¹ mientras se mantuvo constante la concentración de subtilisina *bl* a la menor concentración probada anteriormente (1188 µg ml⁻¹) (Figura 12). En condiciones extremas, solo se logró una reducción del 80 % de Fel d 1 en 10 minutos cuando se combinó con 4500 µg ml⁻¹ de papaína (Figura 12). Por el contrario, en condiciones normales, la concentración de papaína probada no influyó significativamente en la degradación de Fel d 1 después de 10 minutos de incubación. Por lo tanto, la combinación mínima de proteasas de 565 µg ml⁻¹ de papaína y 1188 µg ml⁻¹ de subtilisina *bl* sería suficiente para reducir el contenido de Fel d 1 en la saliva de un gato promedio en aproximadamente un 80 % dentro de los 10 minutos posteriores a la incubación, por ejemplo, mientras el gato está comiendo el alimento o golosina para mascotas, o bebiendo una bebida que contiene las proteasas, o de otra manera expuesto oralmente a la formulación que contiene proteasas.

Ejemplo 6

Se desarrolló un prototipo de toallita que contenía proteasas funcionales y se probó para determinar la inactivación de Fel d 1. Se fabricó un lote de toallitas de algodón (20 cm x 20 cm) que contenía PROTEX® 6L activa y se probó para determinar la inactivación de Fel d 1. La toallita fue exitosa en la degradación de Fel d 1. Los detalles se analizan en detalle a continuación.

En primer lugar, se determinó la concentración de PROTEX® 6L necesaria para la toallita. La concentración de enzima necesaria depende de la cantidad de Fel d 1 que el prototipo debe inactivar. Según los datos proporcionados por Nestlé Purina, la cantidad de Fel d 1 en el ambiente que debe ser digerida por el prototipo de toallita es de aprox. 25 ng/cm² (= 0,25 mg/m²).

Para un prototipo de toallita, no es posible establecer simplemente la concentración de enzima deseada ya que la

capacidad de unión para la enzima podría estar limitada por los sitios de unión/reticulación disponibles del material sólido. Por lo tanto, el objetivo era maximizar la cantidad de PROTEX® 6L inmovilizada.

La Tabla 5 resume las propiedades relevantes para la aplicación y la seguridad de las proteasas activas analizadas en el presente documento basándose en los datos de la Tabla 3. Se descubrió que la proteasa PROTEX® 6L combina todas las características necesarias para el desarrollo de prototipos de aplicación, incluidas las de los Ejemplos 6-10: Muestra solo efectos débiles sobre la hidrólisis de queratina, sin efectos sobre la viabilidad de los queratinocitos, sin actividad de celulosa pero alta tolerabilidad hacia los detergentes no iónicos. Por lo tanto, PROTEX® 6L se utilizó para el desarrollo de los prototipos actuales (toallitas, arena para gatos, champú, líquido limpiador).

Tabla 5: Resumen de propiedades de proteasas activas

Enzima	Hidrólisis de queratina	Citotoxicidad en queratinocitos	Tolerabilidad a Detergentes	Hidrólisis de celulosa
Papaína	No	No	Baja	No
Protex® 6L	Baja	No	Alta	No
Protex® 50FP	Baja	No	Alta	Media
Endoproteinasa Asp-N	Media	Fuerte	Alta	No
Bromelaína	Baja	Fuerte	Media	No
Ficina	Baja	Fuerte	Media	No
Pepsina	No	No	n.d.	No
Protex® 14L	Fuerte	Fuerte	n.d.	No
Alfa-quimotripsina	Media	No	n.d.	No
Thermolase®	Baja	No	n.d.	No
n.d.: no determinado				

Inmovilización de PROTEX® 6L en toallitas de algodón

Fabricación de toallitas de algodón

De los numerosos tipos de telas de algodón, se eligió molton para la fabricación de las toallitas. El tejido Molton está compuesto por fibras de algodón 100 %. Su superficie rugosa y su alta absorción de agua lo convierten en un tejido de limpieza versátil. El tamaño de una toallita final es de aprox. 20 cm x 20 cm.

Sistemas de reticulación para inmovilizar PROTEX® 6L

En teoría, la inmovilización de enzimas sobre material sólido se puede lograr mediante el acoplamiento covalente de la enzima a través de una reacción química. Sin embargo, no hay protocolos bien establecidos disponibles que describan el acoplamiento de PROTEX® 6L a las fibras de algodón.

Una primera exploración de las condiciones para la inmovilización de PROTEX® 6L utilizó no solo la enzima y el vehículo (toallita de algodón) sino también dos agentes de reticulación, ya que el material del vehículo (algodón) no posee grupos que formen fácilmente enlaces covalentes. El agente de reticulación utilizado es un sistema de 2 componentes: una diamina (pentaetilenhexamina, PEHA) y un dialdehído (glutaraldehído, GA). Se combinan en una proporción fija y se hace referencia principalmente a la concentración de glutaraldehído para indicar la cantidad utilizada en proporción a la enzima.

El sistema de reticulación de 2 componentes tiene que coincidir con la cantidad de proteína. Se descubrió que la cantidad utilizada en proporción a PROTEX® 6L es crítica ya que cantidades demasiado bajas no reticularán toda la enzima o darán como resultado formulaciones inestables. Cantidades demasiado altas darán enlaces cruzados reduciendo la libertad de conformación y, posteriormente, reduciendo la actividad de la enzima.

Ensayo enzimático para determinar la eficacia de inmovilización

Para controlar el éxito de las diferentes condiciones y protocolos de reticulación, se determinó la actividad enzimática después de la reticulación y el lavado. En esa etapa, es inconveniente y lento determinar directamente la actividad degradante de Fel d 1 de PROTEX® 6L reticulada mediante ELISA. Para permitir una exploración mucho más rápida de las condiciones de reticulación, se eligieron otros dos ensayos enzimáticos: El ensayo NPA, que se basa en la hidrólisis del sustrato p-nitrofenilacetato por la proteasa o la prueba ELU, que se basa en la hidrólisis del lactato de etilo. Después de establecer el protocolo final para la reticulación de PROTEX® 6L en toallitas de algodón pequeñas, se realizarán inmovilizaciones a gran escala en toallitas enteras. Después, la capacidad de degradar Fel d 1 y la estabilidad enzimática se probarán directamente en el Fel d 1 del sustrato diana por ELISA.

Producción final de PROTEX® 6L inmovilizada en toallitas de algodón

Las cantidades y condiciones del agente de reticulación, así como las cantidades y condiciones de las cargas

enzimáticas se determinaron experimentalmente. Después de esto, se realizaron reacciones a gran escala para reticular PROTEX® 6L en toallitas completas (20 cm x 20 cm). En concreto, PROTEX® 6L líquida (9,24 ml de 4600 ELU/ml de PROTEX® 6L) se mezcló con 83,2 ml de tampón fosfato (100 mM, pH 6,5) y se añadió glutaraldehído (concentración final de 133 mM). La reticulación de la enzima se produjo incubando la toallita en la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiente. La toallita se lavó con agua y el líquido se exprimió y se lavó nuevamente con agua y PEG al 3 %. Finalmente, la toallita se seca con una corriente de aire (21 °C) durante 5 h.

En resumen, PROTEX® 6L se inmovilizó en 10 toallitas de algodón, se produjeron otras 10 toallitas de control de la misma manera, con la excepción de que no se añadió enzima a la mezcla de reacción. Las toallitas se probaron para su aplicación. Se determinó la capacidad de inactivación de Fel d 1 y se mostró en el Ejemplo 10 (Tabla 6).

Ejemplo 7

Se desarrollaron prototipos de arena para gatos que contenían proteasas funcionales y se probó para determinar la inactivación de Fel d 1. De manera específica, se fabricaron 260 g de arena para gatos (perlita) que contenía PROTEX® 6L activa y se probó para determinar la inactivación de Fel d 1. La arena para gatos fue exitosa en la degradación de Fel d 1. Los detalles se analizan en detalle a continuación.

En primer lugar, se determinó la concentración de PROTEX® 6L necesaria para el prototipo. La concentración de enzima necesaria depende de la cantidad de Fel d 1 que el prototipo debe inactivar. Según los datos proporcionados por Nestlé Purina, la cantidad de Fel d 1 que debe ser inactivada por la arena para gatos es de aprox. 250 mg.

En el caso de la arena para gatos, no es posible establecer simplemente la concentración de enzima deseada ya que la capacidad de unión para la enzima podría estar limitada por los sitios de unión/reticulación disponibles del material sólido. Por lo tanto, el objetivo era maximizar la cantidad de PROTEX® 6L inmovilizada.

Inmovilización de PROTEX® 6L en arena para gatos

Inmovilización en bentonita

"La acción instantánea de la arena para gatos sin aglomeración de Purina Tidy Cats" se probó para la inmovilización de PROTEX® 6L. La arena para gatos se basa en el mineral de arcilla bentonita. PROTEX® 6L se diluyó con agua y se añadió a bentonita para verificar las posibles condiciones de inmovilización y absorción de la enzima. Sin embargo, añadir agua a PROTEX® 6L diluye el 50 % de glicerol presente en esta mezcla de enzimas y hace que la bentonita se desmorone.

Se realizó otra prueba de inmovilización con bentonita con un uso mínimo de líquido. Para este fin, se añadieron directamente a la bentonita pequeñas cantidades de PROTEX® 6L que podrían absorberse fácilmente. Además se añadieron los dos agentes de reticulación de la enzima y el vehículo, ya que los materiales portadores no poseen grupos que formen fácilmente enlaces covalentes. El agente de reticulación utilizado es un sistema de 2 componentes: una diamina (pentaetilenhexamina, PEHA) y un dialdehído (glutaraldehído, GA), que se combinan en una proporción fija. Resultó que una carga máxima es de 150 a 200 µl de líquido por gramo de bentonita. El líquido tiene que administrarse individualmente a cada partícula. Debido al hecho de que las partículas se desmoronan, no es posible realizar un tratamiento después de la inmovilización. Este no es un inconveniente inmediato, si no que el polvo con enzima se transportará al aire después de que la bentonita se haya mojado y secado nuevamente. Sin embargo, PROTEX® 6L en este vehículo perdió toda actividad después de un par de días, incluso cuando se secó. En conclusión, la arena para gatos probada no era adecuada para la inmovilización de PROTEX® 6L.

Inmovilización en arena

Se probó arena con un tamaño de partícula de 1,2 mm como otro vehículo que podría mezclarse principalmente con bentonita. De nuevo se usaron dos agentes de reticulación además de la enzima. Se usó arena para demostrar la viabilidad del enfoque donde la enzima se inmoviliza en un segundo vehículo (arena), que después se puede mezclar con otras partículas de arena para gatos. Se usó una carga máxima de 200 µl de PROTEX® 6L por gramo de arena. Sin embargo, la actividad y la recuperación fueron relativamente bajas, muy probablemente porque la arena carece de poros y tiene un área superficial pequeña. La lixiviación de la enzima es baja y, por lo tanto, la arena es en principio un material adecuado para la unión covalente.

Inmovilización en perlita

La perlita se eligió como un tercer vehículo. Debido a su tamaño de partícula de 2,8 - 6 mm, también podría mezclarse principalmente con bentonita. Nuevamente, se usaron dos agentes de reticulación (GA y PEHA) además de la enzima para inducir la unión covalente. Los primeros experimentos de inmovilización mostraron que la recuperación, así como la lixiviación de la enzima PROTEX® 6L, es relativamente buena para las cargas enzimáticas en el intervalo inferior. Las cargas enzimáticas superiores a 500 µl/g dan una coloración significativa de las partículas de perlita pero con cargas en el intervalo inferior mantiene un color blanco brillante.

Producción final de PROTEX® 6L inmovilizada en perlita

5 De manera clara, para la reticulación de PROTEX® 6L al material de arena para gatos, la perlita resultó ser superior a la arena y la bentonita. La perlita permite una alta carga de enzimas, mientras mantiene baja la lixiviación de enzimas. Además, su tamaño de partícula permite una mezcla homogénea con otro material de arena para gatos. Por lo tanto, se encontró que la perlita era un material excelente para la reticulación de PROTEX® 6L y finalmente se produjeron 260 g de perlita que contenía PROTEX® 6L.

10 En concreto, se mezcló PROTEX® 6L líquida (60 ml de 4600 ELU/ml de PROTEX® 6L) con 472,8 ml de agua fría, PEHA (ajustado a pH 7,0, concentración final 20 mM, 4 °C) y se añadió glutaraldehído (concentración final 133 mM), bien mezclado y agregado a 300 g de perlita. La reticulación de la enzima se produjo incubando las partículas de perlita en la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiente. La perlita se lavó con agua, tampón fosfato 5 mM y agua con PEG al 3 %. Finalmente, las partículas de perlita se secaron durante la noche a temperatura ambiente.

15 En resumen, PROTEX® 6L se inmovilizó en 260 g de perlita, se produjo otra pequeña muestra de control (1 g de perlita) de la misma manera, con la excepción de que no se añadió enzima a la mezcla de reacción. La perlita se probó después para su aplicación. Se determinó la capacidad de inactivación de Fel d 1 y se mostró en el Ejemplo 10 (Tabla 6).

Ejemplo 8

25 Se desarrollaron prototipos de líquidos limpiadores que contenían proteasas funcionales y se probaron para determinar la inactivación de Fel d 1. De manera específica, 1 litro de líquido limpiador y 50 ml de concentrado enzimático que contenía PROTEX® 6L activa se fabricaron y probaron para determinar la inactivación de Fel d 1. Los prototipos fueron exitosos en la degradación de Fel d 1. Los detalles se analizan en detalle a continuación.

30 En primer lugar, se determinó la concentración de PROTEX® 6L necesaria para cada prototipo. La concentración de enzima necesaria depende de la cantidad de Fel d 1 que se debe inactivar por el respectivo prototipo. Según los datos proporcionados por Nestlé Purina, la cantidad de Fel d 1 en el ambiente que debe ser digerida por los prototipos de es de aprox. 25 ng/cm² (= 0,25 mg/m²).

35 Para la determinación de la concentración de PROTEX® 6L que se necesita para la digestión total de Fel d 1, se analizó la actividad de una serie de diluciones de PROTEX® 6L mediante ELISA. 3,8 U/ml de PROTEX® 6L (las unidades se basan en el ensayo de etil-L-lactato (ELU), determinadas por el fabricante Genencore) son capaces de digerir completamente 2,5 µg de Fel d 1 en condiciones de reacción óptimas (tampón Tris-HCl, pH 7,8). Basándose en estos cálculos, incluyendo los cálculos iniciales para el champú en el Ejemplo 9, la concentración de PROTEX® 6L se ajustó en consecuencia para los líquidos limpiadores.

Desarrollo de Limpiador de Superficies que contiene PROTEX® 6L

45 Basado en la concentración de Fel d 1 en superficies duras, se determinó la cantidad necesaria de PROTEX® 6L y se incorporó a la formulación líquida de limpiador básica (KAR-001). En concreto, se añadió agua (960 g) a un vaso de precipitados, después se añadieron y agitaron 10 g de fenoxietanol (conservante), seguido de 30 g de Zusolat 1008/85 (alcohol graso disponible de Zschimmer & Schwarz GmbH & Co KG) y 10 g de EUXYL® PE 9010. Cuando fue necesario, el pH tuvo que ajustarse a 8,0 usando NaOH. A esta formulación básica (KAR-001) se añadió PROTEX® 6L (9 ml de 4600 ELU/ml de PROTEX® 6L) (KAR-001+E). Finalmente, se produjeron 1 litro de limpiador de superficie KAR-001 que contenía PROTEX® 6L (KAR-001+E), así como 2x 1 litro de limpiador de superficie sin PROTEX® 6L (KAR-001-E) y se probaron para su aplicación. Se determinó la capacidad de inactivación de Fel d 1 y se muestra en el Ejemplo 10 (Tabla 6).

Desarrollo de un concentrado de enzimas que contiene PROTEX® 6L

55 Además del limpiador de superficies listo para usar, que ya contiene PROTEX® 6L, se podría imaginar otra aplicación, que se basa en mezclar enzimas y limpiadores de superficies líquidos justo antes de su uso.

60 La ventaja es que la enzima podría mezclarse con cualquier otro limpiador de superficie, que podría proporcionar el cliente. Además, almacenar la enzima en una formulación líquida optimizada y no en una formulación limpiadora de superficies podría estabilizar la enzima y conducir a una mayor estabilidad enzimática. Por lo tanto, se desarrolló un concentrado enzimático que consta de 20 x PROTEX® 6L más concentrado (en comparación con el limpiador de superficie KAR-001+E listo para usar) y estabilizador enzimático propilenglicol. Se determinó la capacidad de inactivación de Fel d 1 (después de la dilución del 20 x KAK-001+E en 1 x limpiador de superficie) y se muestra en el Ejemplo 10 (Tabla 6).

65 Ejemplo 9

5 Se desarrollaron prototipos de champús que contenían proteasas funcionales y se probaron para determinar la inactivación de Fel d 1. De manera específica, se fabricaron dos champús para gatos (formulación sin aclarado, 1 litro cada uno), que contenían PROTEX® 6L activo, y se probaron para determinar la inactivación de Fel d 1. Todos los prototipos fueron exitosos en la degradación de Fel d 1. Los detalles para cada prototipo se analizan en detalle a continuación.

10 En primer lugar, se determinó la concentración de PROTEX® 6L necesaria para el prototipo. La concentración de enzima necesaria depende de la cantidad de Fel d 1 que el prototipo debe inactivar. La cantidad de Fel d 1 en el gato es de aprox. 2 µg/mg de pelo de gato (datos proporcionados por Nestlé Purina). Debido a que el peso del pelo por gato es en promedio 121 g (Avner DB et al., J Allergy Clin Immunol, 1997), la cantidad total de Fel d 1 en el gato que el champú debe inactivar es de aprox. 250 mg.

15 Para la determinación de la concentración de PROTEX® 6L que se necesita para la digestión total de Fel d 1, se analizó la actividad de una serie de diluciones de PROTEX® 6L mediante ELISA. 3,8 U/ml de PROTEX® 6L (las unidades se basan en el ensayo de etil-L-lactato (ELU), determinadas por el fabricante Genencore) son capaces de digerir completamente 2,5 µg de Fel d 1 en condiciones de reacción óptimas (tampón Tris-HCl, pH 7,8). A continuación, se analizó la actividad de PROTEX® 6L en el champú para gatos KFS-002 (véase a continuación) para determinar la actividad de PROTEX® 6L en una formulación de champú. Se eligió KFS-002 como modelo para los cálculos iniciales de la actividad de PROTEX® 6L en una formulación líquida. Se determinó mediante ELISA que en KFS-002 se necesitan 38,4 U/ml de PROTEX® 6L para la inactivación total de Fel d 1 (que es aproximadamente 10 veces mayor que en el tampón de reacción óptimo).

25 Desarrollo de champús que contienen PROTEX® 6L

Se probaron varias formulaciones espumosas basadas en cocamidopropilbetaína anfótera (betaína), lauriletersulfato de sodio aniónico (SLE), lauroil sarcosinato de sodio aniónico (SLS), cocoil glutamato de sodio/disodio aniónico y decil glucósido no iónico, pero no todas las formulaciones dieron resultados aceptables.

30 Basado en la concentración de Fel d 1 en el gato, se determinó la cantidad necesaria de PROTEX® 6L y se incorporó a dos formulaciones de champú básicas (KFS-002 y KFS-004a).

35 En concreto, se añadió agua (980 g) a un vaso de precipitados, después se añadieron y agitaron 10 g de fenoxietanol (conservante), seguido de 10 g de betaína (KFS-002) o 10 g de SLS (KFS-004a) y 10 g de PERLASTAN® L30. Cuando fue necesario, el pH tuvo que ajustarse a 5,5 (KFS-002) o 7,5 (KFS-004a) usando NaOH. A esta formulación básica (KFS-002/004a) se añadieron 9 ml de PROTEX® 6L (de 4600 ELU/ml de PROTEX® 6L) (KFS-002/004a+E). Finalmente, se produjeron y probaron para su aplicación 1 litro de champú KFS-002 y 1 litro de champú KFS-004a que contiene PROTEX® 6L (KFS-002/004a+E), así como 2 x 1 litro de champús sin PROTEX® 6L (KFS-002/004a-E). Se determinó la capacidad de inactivación de Fel d 1 y se muestra en el Ejemplo 10 (Tabla 6).

40 Ejemplo 10

45 Los prototipos de los Ejemplos 6-9 se estudiaron para determinar la inactivación de Fel d 1. Los datos se presentan en la tabla 6. De manera clara, todos los prototipos desarrollados son capaces de inactivar cantidades de Fel d 1 relevantes para la aplicación.

Tabla 6

Prototipo	Capacidad de inactivación de Fel d 1
Conc. de enzima KAK-001.	~ 57 - 71 mg de Fel d 1/10 ml
Limpiador de superficies KAR-001	~ 150 - 203 mg de Fel d 1/10 ml
Champú KFS-002	~ 105 - 156 mg de Fel d 1/10 ml
Champú KFS-004a	~ 18 - 23 mg de Fel d 1/10 ml
Toallita	~ 1,09 mg de Fel d 1/toallita/ uso
Arena para Gatos	~ 9,3 mg de Fel d 1/100 ml

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una formulación para reducir o eliminar Fel d 1 alergénico de un ambiente, que comprende proteasas que interactúan con Fel d 1 y degradan epítomos alergénicos en el Fel d 1, en donde las proteasas incluyen al menos la serina proteasa Subtilisina de *B. licheniformis* y papaína.
- 10 2. El uso de una formulación acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un aditivo que potencia la eficacia de la proteasa en la degradación del Fel d 1, en donde el aditivo es cisteína o sal /iones de calcio (Ca²⁺), o una combinación de cisteína y sal /iones de calcio (Ca²⁺).
- 15 3. El uso de una formulación acuerdo con la reivindicación 1, dispuesta dentro de una composición seleccionada de: agente de limpieza líquido, sólido o en polvo, aerosol, paño húmedo, toallita, esponja, pastilla soluble en agua, filtro, alimento, suplemento de aceite o de agua, filtro de aspiradora o aditivo, gránulo, detergente, desodorizador de alfombras y habitaciones, arena, aditivo para arena, guante, aditivo para productos no de tejido, saco para lavadora, pastilla para lavadora y pastilla líquida multicámara.
- 20 4. El uso de una formulación acuerdo con la reivindicación 1, en donde las proteasas se reconocen como seguras para su uso en alimentos y cosméticos.
- 25 5. El uso de una formulación acuerdo con la reivindicación 4, dispuesta dentro de una composición seleccionada de jabón, champú, enjuague, polvo, aerosol, gel, mouse, espuma, acondicionador, loción, collar, guante o toallita dispersante o húmeda adecuada para aplicar sobre la piel, pelo o pelaje.
- 30 6. El uso de una formulación acuerdo con la reivindicación 4, dispuesta dentro de una composición comestible.
7. Un método para reducir o eliminar Fel d 1 alergénico de una superficie inanimada, que comprende poner en contacto un elemento de la superficie inanimada donde está presente Fel d 1 con una formulación que comprende proteasas que interactúan con el Fel d 1 y degradan los epítomos alergénicos en el Fel d 1, reduciendo o eliminando, de este modo, Fel d1 alergénico de la superficie inanimada; en donde las proteasas comprenden al menos la serina proteasa Subtilisina de *B. licheniformis* y papaína; en donde preferentemente el Fel d 1 está presente en la superficie inanimada y la formulación se aplica a la superficie inanimada.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el Fel d 1 está en el aire y la formulación se pone en contacto con el aire.

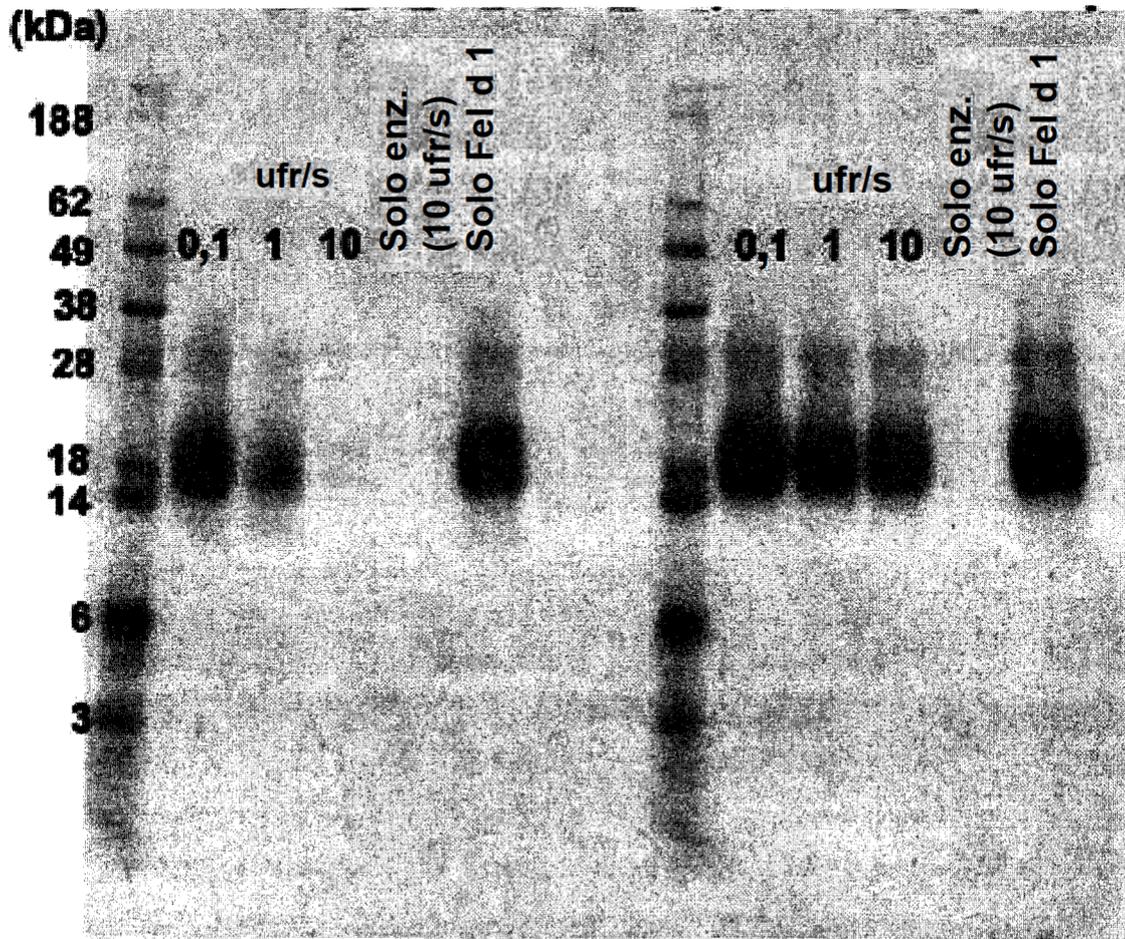


Fig. 1

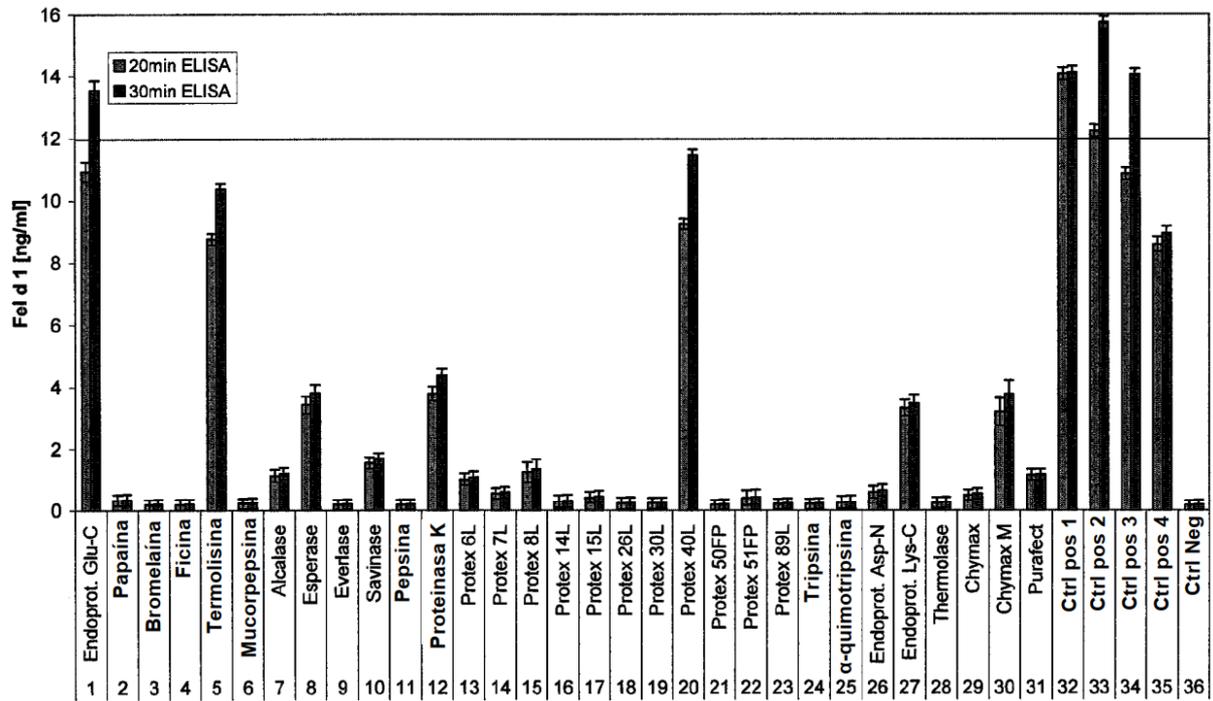


Fig. 2

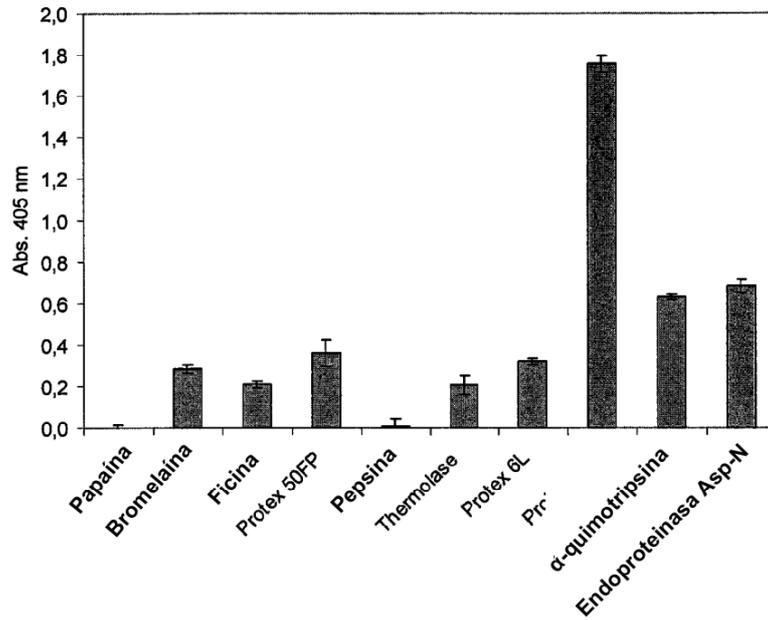


Fig. 3

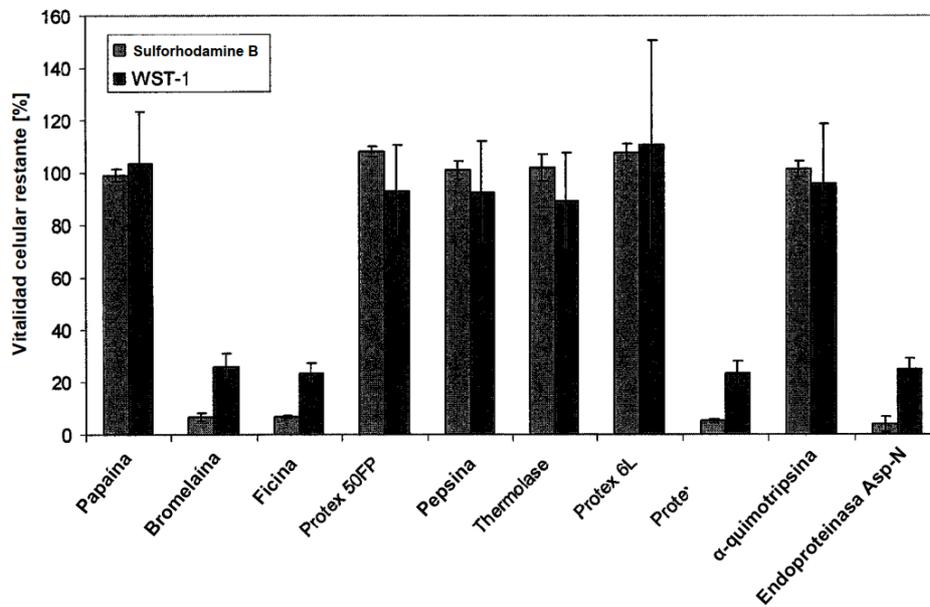


Fig. 4

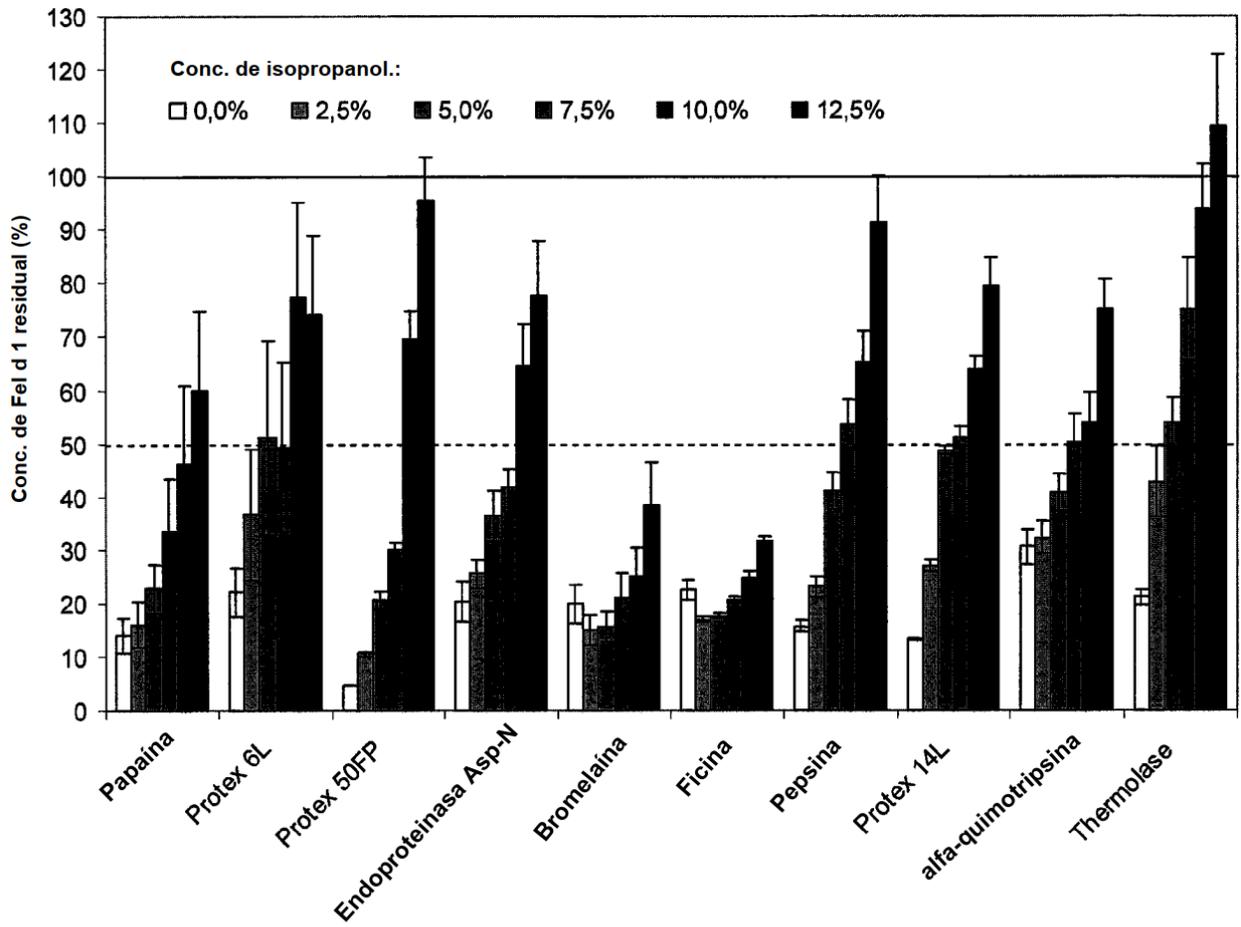


Fig. 5

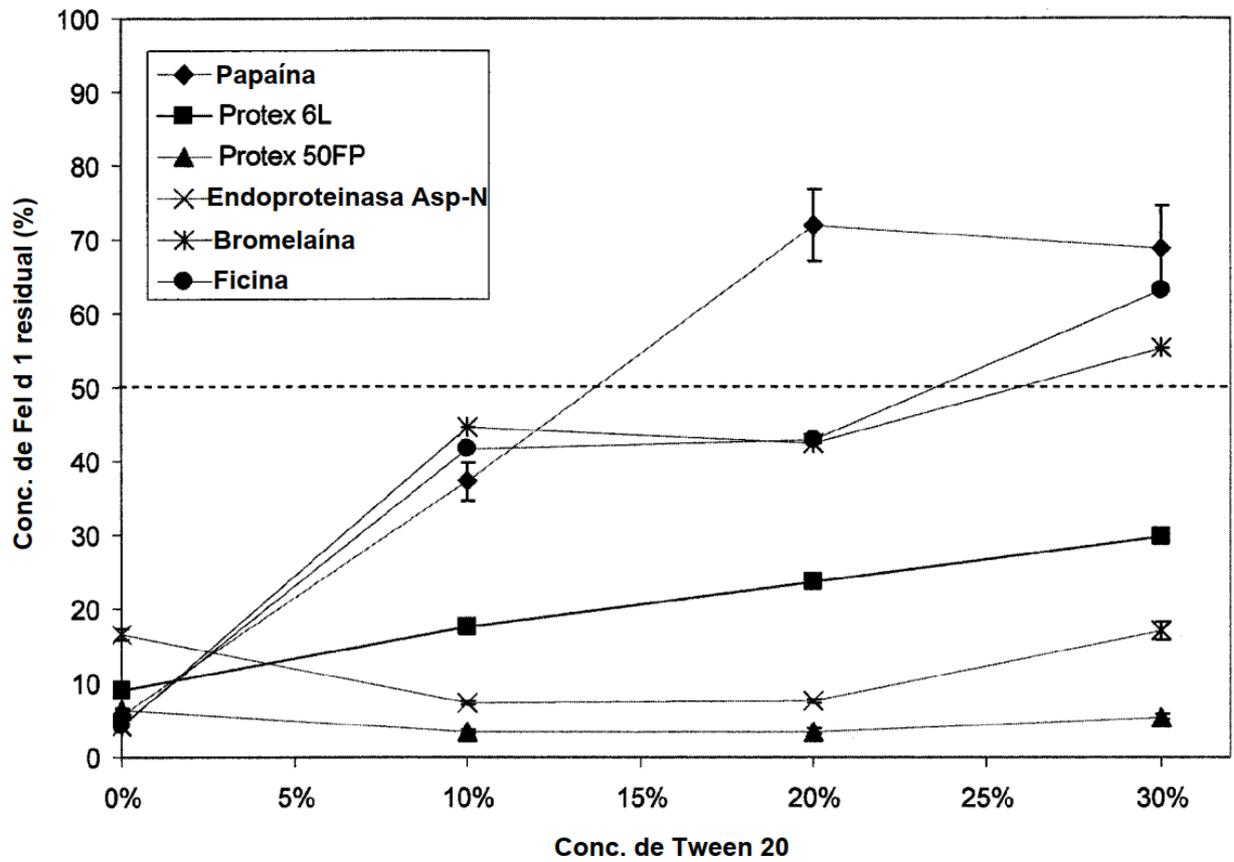


Fig. 6

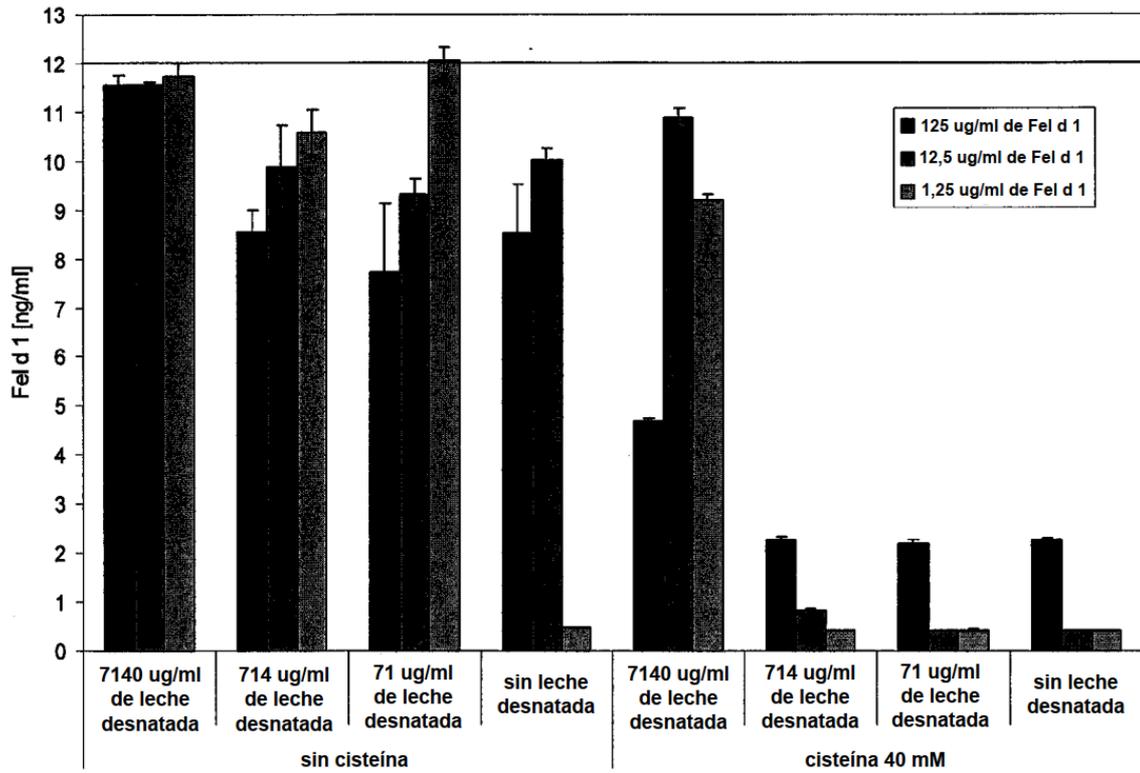


Fig. 7

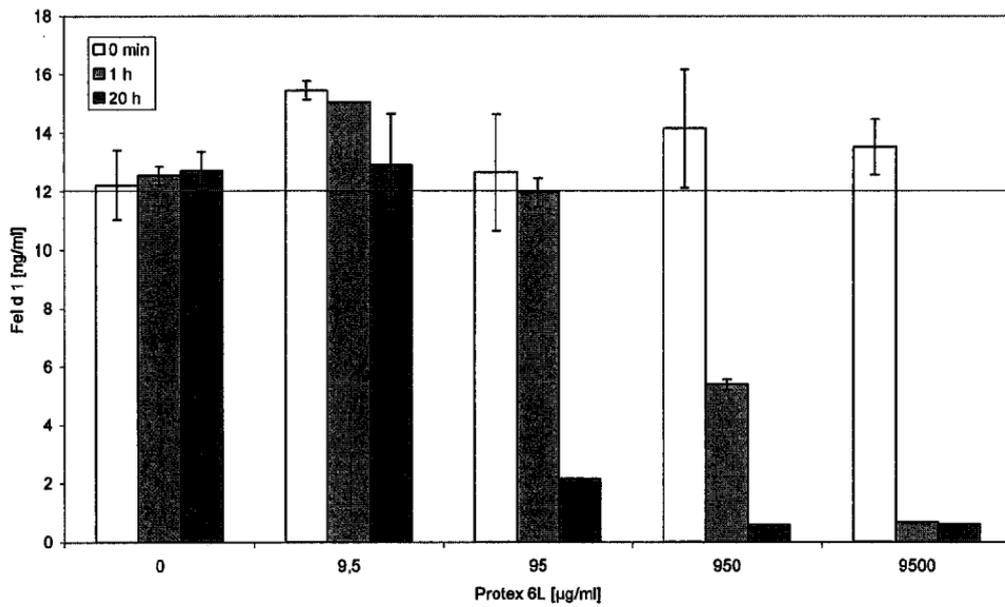


Fig. 8

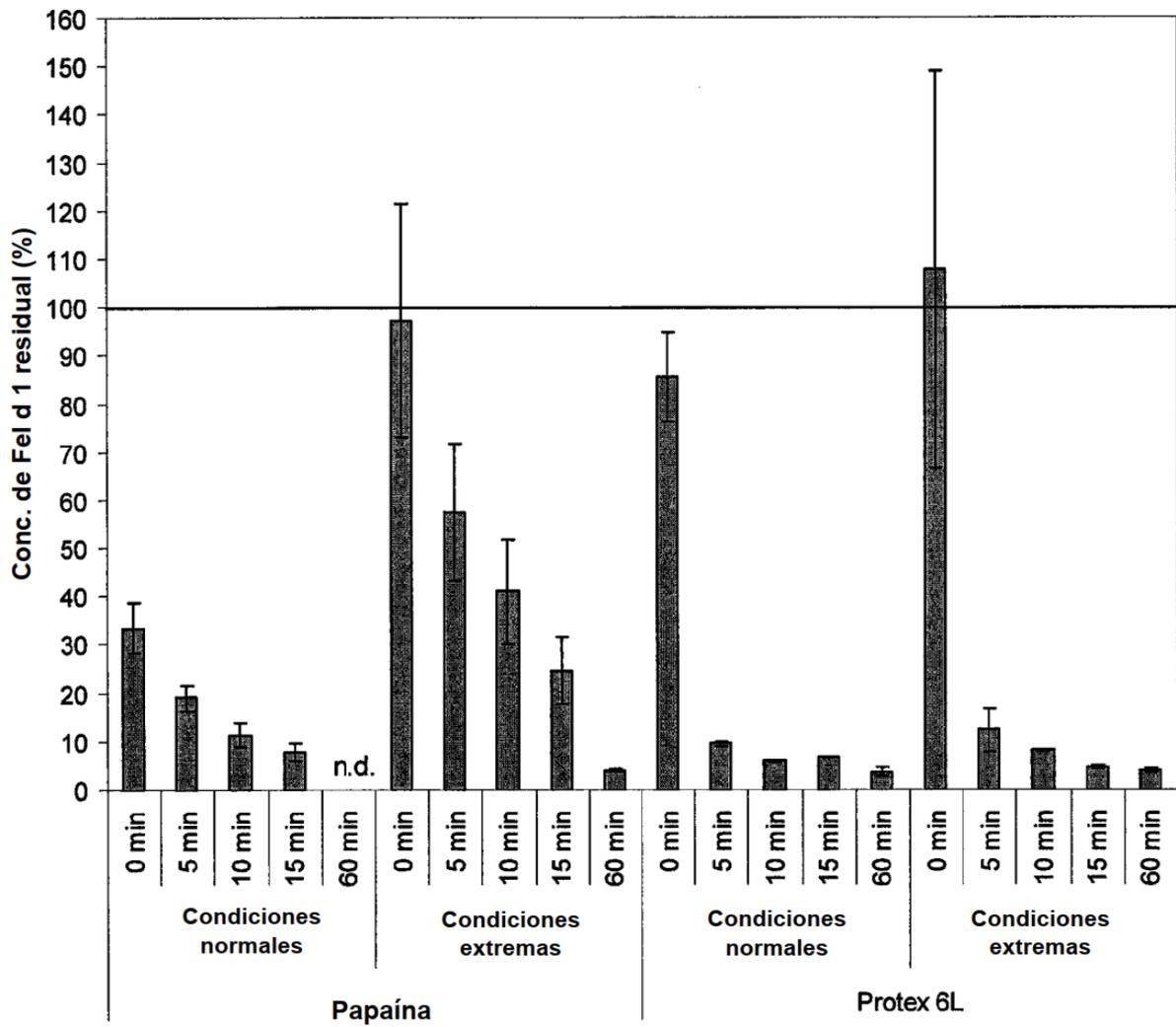


Fig. 9

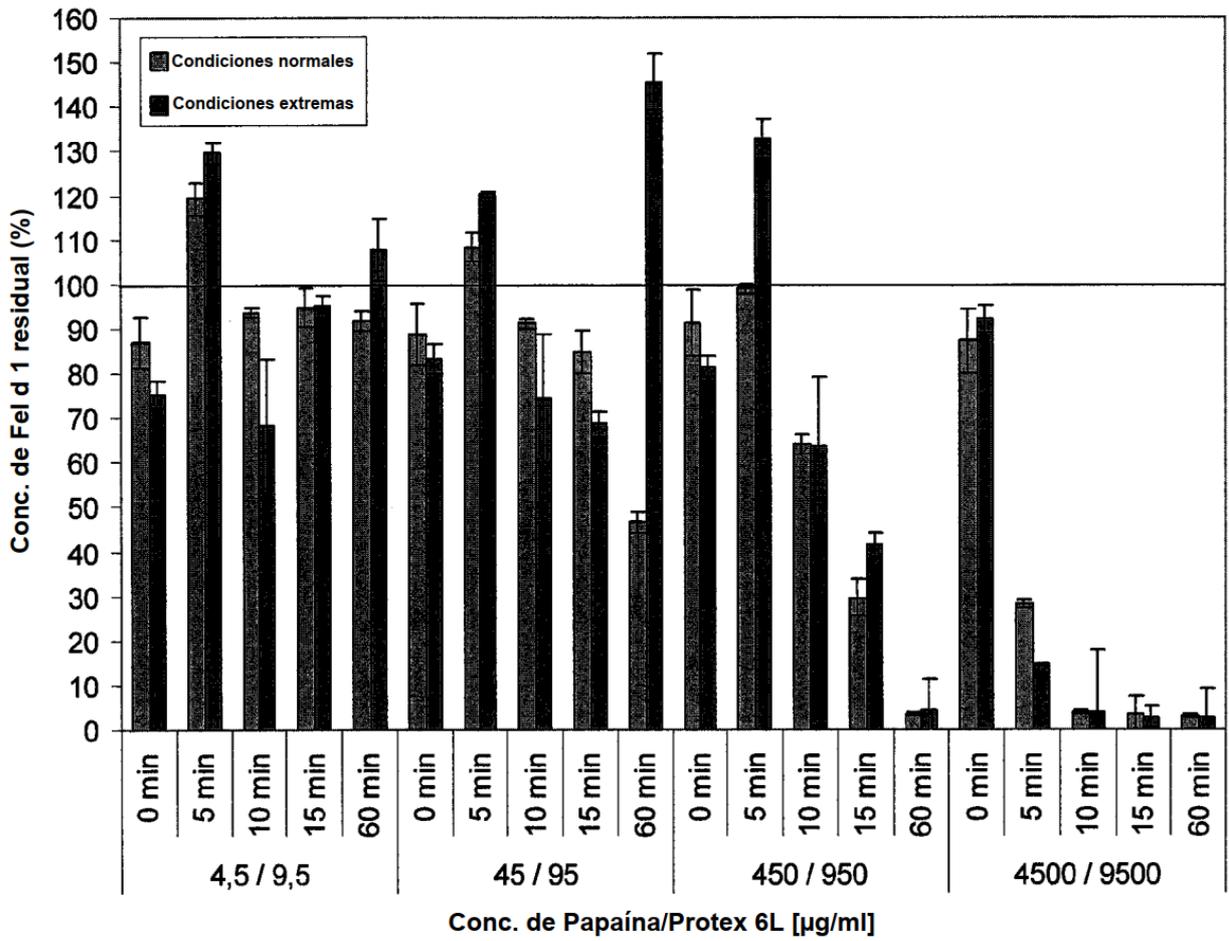


Fig. 10

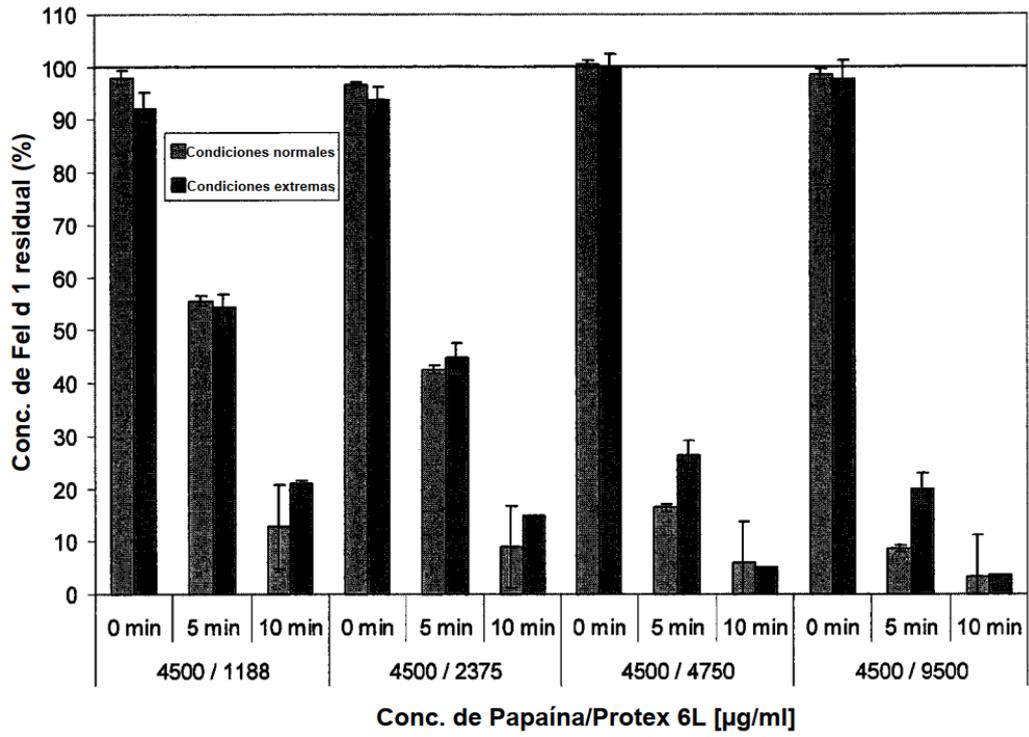


Fig. 11

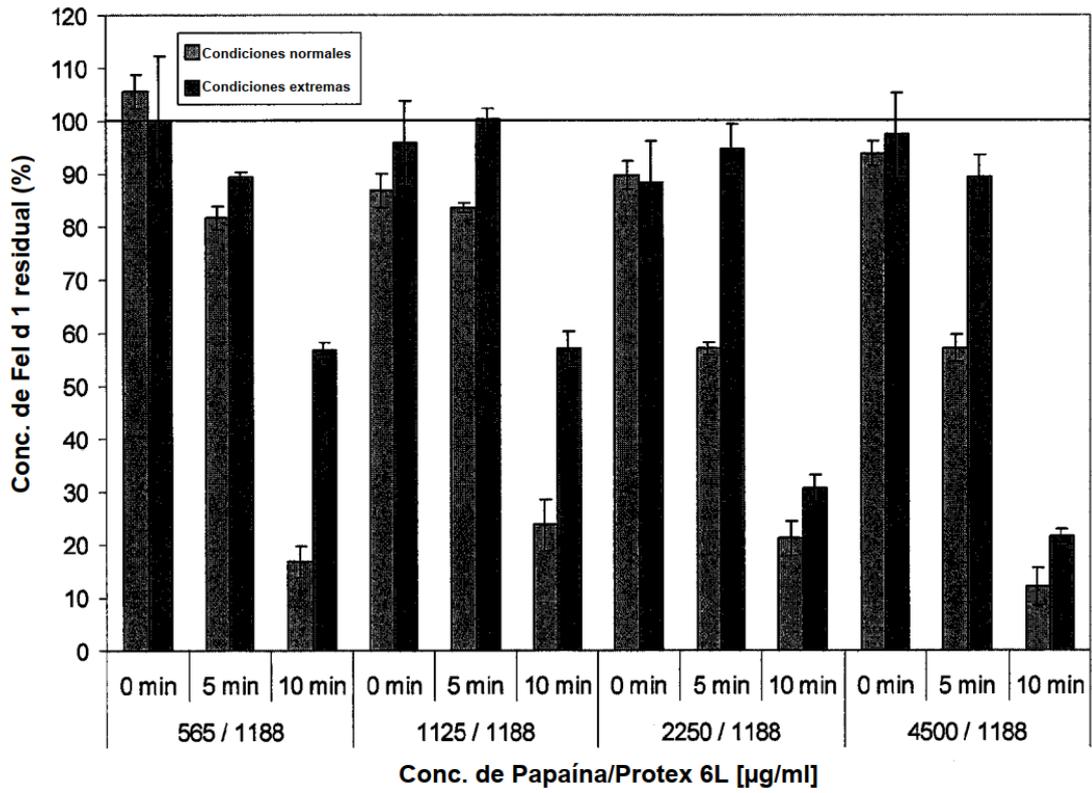


Fig. 12