

368894

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>A-61</u>
SUBCLASE <u>B</u>

P.-42.120

U.S. Ser.No.  
734.235

**Memoria descriptiva**

29 JUL 1969



para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de NILES LABORATORIES, INC.

entidad / de nacionalidad norteamericana

con domicilio en 1127 Myrtle Street, Elkhart, Indiana,  
Estados Unidos de América

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN EXTRACTO DE UNA  
SUSTANCIA CAPAZ DE PROVOCAR UNA RESPUESTA ALERGE-  
NICA Y QUE CONTIENE PRINCIPIOS FISIOLÓGICAMENTE  
ACTIVOS" (Clase Internacional A61k G01n)



Es sabido desde hace tiempo que varios individuos, al ponerse en contacto, y particularmente al inhalar, ciertas partículas o sustancias orgánicas naturales o sintéticas, muestran reacciones alérgicas características, tales como estornudos, activación de las glándulas mucosas, edema local, erupciones de la piel, y vasodilatación. Estas reacciones son llamadas comúnmente "fiebre del heno", y aún cuando la reacción no es en sí misma usualmente seria, puede llevar a complicaciones, tanto fisiológicamente como psicológicamente. En un niño de poca edad, la constante presencia de un estado alérgico causa con frecuencia deformidades permanentes en el cuerpo y particularmente en la estructura facial, por no citar los efectos psicológicos de una molestia continuamente presente. Los estados asmáticos están también relacionados íntimamente con las reacciones asmáticas alérgicas, y pueden causar también complicaciones más serias. La medicina considera hoy día a la fiebre de heno como un estado grave que ha de ser tratado con cuidado y a fondo.

A este respecto, se ha sabido también desde hace algún tiempo que los extractos de las sustancias alergénica o antigénicamente activas citadas anteriormente, al ser inyectados por vía subcutánea, disminuyen estas reacciones alérgicas. El mecanismo fisiológico exacto de este tratamiento, conocido en la técnica como hiposensibilización, aún no ha sido explicado de modo completo y satisfactorio. No obstante, se han expuesto varias teorías que intentan dar una explicación. Una de estas teorías supone la formación de los llamados



5 anticuerpos bloqueadores o neutralizantes causados por la inyección del extracto, mientras que la otra de las teorías supone que este tratamiento favorece la formación de una unión entre antígeno (o alérgeno) y anticuerpo en la circulación libre, en lugar de en el tejido de choque.

10 En la preparación de estos extractos alérgicos, ha sido práctica común hasta ahora extraer simplemente la sustancia orgánica irritante que causa la reacción alérgica con un fluido de extracción acuoso fisiológicamente aceptable, tal como una disolución salina ligeramente alcalina. Después de separar el fluido de extracción de residuo, esta disolución que contiene los principios activos es esterilizada y empleada  
15 simplemente tal como se obtiene, después, naturalmente, de efectuar la adecuada dilución sucesiva de la misma. En tal procedimiento de extracción, el fluido de extracción fisiológicamente aceptable es seleccionado y preparado de modo que proteja la integridad estructural  
20 de la molécula antigénica.

Recientemente, sin embargo, se ha ideado un método que da como resultado un extracto alérgico más completo y efectivo. Este procedimiento se describe en las Patentes de Los E.U.A. números 3.148.121  
25 y 3.148.122, y comprende, en pocas palabras, tratar una sustancia alérgica completa no desgrasada, con un fluido de extracción acuoso de amina terciaria heterocíclica, separar del residuo la fase líquida que contiene los principios activos, desechar el residuo y, para  
30 separar la amina terciaria heterocíclica de los princi-



pios activos, añadir agua y una disolución de alumbre al extracto, para precipitar del mismo los principios activos. El precipitado es lavado después varias veces con agua para separar toda la amina heterocíclica terciaria y el alumbre en exceso y finalmente es puesto en suspensión de nuevo en un vehículo fisiológicamente aceptable, tal como, por ejemplo, una disolución tampón de fosfato.

Inicialmente, se creyó que la inclusión de la amina terciaria heterocíclica en el procedimiento daba como resultado simplemente un extracto alergénico más completo, ya que los constituyentes solubles en la amina estaban incluidos en el extracto, así como las fracciones proteínicas de hidratos de carbono. Sin embargo, hoy se considera que la naturaleza química reactiva de la amina terciaria heterocíclica puede causar una modificación estructural de la molécula antigénica, lo que detefmina la formación de un extracto del tratamiento alergénico que es efectivo y está relativamente exento de reacciones secundarias constitucionales.

A pesar de haberse comprobado lo efectivos y ventajosos que son estos extractos alergénicos extraídos con amina terciaria heterocíclica y precipitados con alumbre (denominados en adelante extractos PEAP, ya que la piridina es la amina terciaria heterocíclica preferible empleada en este procedimiento), han aparecido varias limitaciones con el paso del tiempo. A este respecto se comprobó que este tipo de extracto no podía emplearse con fines de ensayos en la piel, situación que los alergistas clínicos prefieren evitar usualmente, ya que prefieren emplear el mismo extracto



para la diagnosis que para el tratamiento. Tal procedimiento en que se emplea el mismo extracto asegura que el tratamiento implica el empleo del antígeno exacto que ha demostrado ser la causa de la reacción alérgica de la piel. Se cree que la anterior limitación de los extractos PEAP se debe a la insolubilidad del precipitado y/o a la formación de un complejo entre el antígeno extraído con amina terciaria heterocíclica y el alumbre empleado en la precipitación del antígeno a partir del fluido de extracción.

Además, los parámetros del procedimiento para preparar los antígenos PEAP empleando los métodos de la técnica anterior son más bien prolijos, y el rendimiento deja mucho que desear, es decir, se encuentra en el intervalo del 50% de las UNP (unidades de nitrógeno proteínico) originalmente extraídas.

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un extracto alergénico más versátil y efectivo que el producido por los métodos acuoso y de PEAP de la técnica anterior.

Otro objeto es proporcionar un procedimiento perfeccionado para preparar extractos de ensayo alergénicos y extractos de tratamiento de efecto de larga duración, empleando un procedimiento común de extracción de antígenos.

Otro objeto más es proporcionar un procedimiento con disolvente orgánico acuoso con el que sustancialmente todo el material antigénico es recuperado en el tratamiento del mismo.

Estos y otros objetos que se deducirán

29 

de la siguiente memoria descriptiva y de las reivindicaciones ajenas a la misma, se consiguen (1) sometiendo a extracción la sustancia alérgicamente activa con un flúido de extracción que comprende una mezcla de una fase acuosa y un disolvente orgánico, con lo que los principios activos son disueltos en dicho flúido de extracción y tratados con el mismo, dejando un residuo de materiales insolubles inactivos; (2) separando del residuo insoluble la fase líquida que comprende el flúido de extracción y los principios activos, y (3) separando los principios activos del flúido de extracción por medio de una técnica de volatilización, que deja un extracto en polvo sustancialmente seco y alérgicamente activo.

Ha de indicarse de nuevo aquí que el procedimiento de PEAP de la técnica anterior utilizaba la operación de precipitación con alumbre como parte integral del procedimiento de preparación del extracto alérgico, ya que sólo incluyendo esta operación en el procedimiento podían ser separados los principios activos del flúido de extracción de amina terciaria heterocíclica, fisiológicamente no deseable.

Se ha comprobado ahora de manera inesperada que esta operación, es decir la precipitación del antígeno a partir de la amina terciaria heterocíclica acuosa por medio del empleo de alumbre, que se consideraba esencial en el procedimiento PEAP de la técnica anterior puede ser eliminado enteramente por el sistema de separar los principios activos del flúido de extracción por medio de una técnica de volatilización, antes de reducir dichos principios activos a la forma final de dosificación. La operación de volatilización será



descrita más adelante en la Memoria.

El procedimiento según la presente invención es aplicable a todas las sustancias alérgicamente activas, tanto de origen natural como preparadas sintéticamente. Tales sustancias incluyen los polvos, tales como el polvo ordinario que se encuentra en el hogar y recogido por las aspiradoras, y el polvo que se encuentra en las instalaciones fabriles, tales como el polvo de serrín; epitelios, tales como los de gato, perro, caballo y caspa de conejo; plumas, tales como las de gansos y pollos; semillas, tales la semilla de algodón y de miraguano; insectos y emanaciones de insectos, tales como abejas, avispas y mosquitos, polen de árboles, gramíneas y malezas, tales como la ambrósia, *Dactylis glomerata*, arce, álamo; hongos, tales como el *Aspergillus niger* y *Alternaria*; compuestos químicos sintéticos complejos, tales como los antibióticos, y similares.

Haciendo referencia ahora al flúido de extracción empleado para solubilizar, tratar y separar inicialmente los principios activos o sustancias alérgicamente activas del residuo inactivo que es desechado, se ha comprobado que el flúido preferible para su empleo en la presente invención comprende una mezcla de una fase acuosa y una fase de disolvente orgánico. Este último constituyente del flúido de extracción puede comprender un disolvente que contiene nitrógeno básico, con un punto de ebullición suficientemente bajo para permitir la volatilización del mismo sin destruir la integridad estructural del alérgeno tratado. Esta limitación del punto de ebullición será discutida más adelante.



te de modo más completo, al ser descrita más detallada-  
mente la operación de volatilización, pero en líneas  
generales el disolvente orgánico ha de tener un punto  
de ebullición de menos de 120°C, excepto cuando se em-  
5 plea una técnica de volatilización tal como el secado  
por pulverización, en la que el alérgeno es expuesto  
sólo momentáneamente a una temperatura superior. Prefe-  
riblemente, la parte del disolvente orgánico del fluido  
de extracción comprende una amina, y más preferiblemen-  
10 te una amina terciaria heterocíclica, como por ejemplo,  
piridina, derivados de piridina tal como la lutidina,  
quinoleína, colidina, picolina, y similares. Además del  
requerimiento del punto de ebullición para este disol-  
vente orgánico, preferiblemente es también miscible con  
15 agua.

Aunque el efecto químico exacto del di-  
solvente orgánico sobre la molécula de antígeno o su  
estructura no es conocido con ningún grado de certeza,  
se cree que la naturaleza altamente polar o básica de  
20 los disolventes antes indicados hacen que reaccionen con  
el antígeno formando un compuesto con el mismo, o altera  
de algún modo la estructura molecular compleja de la  
proteína, hidrato de carbono, lipoproteína o polipépti-  
do que forma la base de la sustancia irritante.

25 El segundo constituyente del fluido de  
extracción, es decir, la fase acuosa, puede comprender  
agua destilada o pura o, preferiblemente, una disolu-  
ción acuosa salina y/o alcalina. A este respecto pueden  
emplearse bicarbonato de sodio, cloruro de sodio, hidró-  
30 xido de sodio, tampón de fosfato, y similares. Cuando



5 en el flúido de extracción se encuentran sustancias que  
tienen una naturaleza alcalina, tal como una amina he-  
terocíclica terciaria, este segundo constituyente acuo-  
so puede constar también de un tampón que ajusta el pH  
a un valor más neutro. El pH resultante del flúido fi-  
nal de extracción preparado mezclando la fase de disol-  
vente orgánico de amina y la fase acuosa puede ser de  
aproximadamente 7,5 a aproximadamente 12,0, y preferi-  
blemente se establece en un intervalo más estrecho de  
10 pH de desde aproximadamente 9,0 a 12,0. Como se ha en-  
contrado una amplia variedad de sustancias alergénicas  
adaptables al procedimiento de la presente invención,  
el pH del flúido de extracción, y la composición del  
mismo pueden ser variados considerablemente. Es sabido,  
15 por ejemplo, que el polen de ambrosía contiene un con-  
tenido elevado y tóxico de grasa o lípido que, según  
se ha sugerido, contribuye de modo importante a la na-  
turaleza alergénica de esta sustancia. Al extraer este  
polen de malezas puede desearse aumentar la relación  
20 de fase de disolvente orgánico a fase acuosa, para ase-  
gurar la solubilidad de todo el material de lípido. No  
obstante, se ha comprobado que partes iguales de la fa-  
se de disolvente orgánico y de la fase acuosa dan como  
resultado un flúido de extracción de amplia posibilidad  
25 de aplicación.

El procedimiento de extracción comprende  
usualmente mezclar la sustancia alergénica irritante,  
después de la separación física de los constituyentes  
extraños contaminantes, con el flúido de extracción, y  
30 dejar que la mezcla permanezca a una temperatura de apro



ximadamente 20°C a 25°C durante hasta 11 días, con o  
sin agitación. El residuo es separado después de la fa-  
se líquida, que en ese momento contiene los principios  
alergénicos activos tratados y solubilizados, dejando  
5 que sedimente el residuo insoluble, y centrifugando la  
mezcla o sometiéndola a un procedimiento de filtración,  
tal como filtración a vacío. El residuo es después de-  
sechado, y la fase líquida resultante es una disolución  
transparente, y con frecuencia de color ligeramente ám-  
10 bar o verdoso, del producto de reacción del flúido de  
extracción acuoso-disolvente orgánico y el antígeno.

En esta etapa, la presente invención se  
separa claramente del procedimiento PEAP de la técnica  
anterior, en el que es añadido después sulfato de pota-  
15 sio y aluminio (alumbre) para precipitar y separar los  
principios antigénicos o alergénicamente activos del  
flúido de extracción, fisiológicamente inaceptable. La  
desviación del procedimiento de la presente invención  
con respecto al procedimiento PEAP de la técnica ante-  
20 rior comprende la separación de los principios activos  
del flúido de extracción por medio de un procedimiento  
de volatilización, es decir, la fase líquida es sometida  
a un estado físico que hace que la fase líquida se  
transforme en una fase gaseosa, y los principios acti-  
25 vos no volátiles son separados difundiendo o separando  
la fase gaseosa de dichos principios activos.

Esta importante operación de volatiliza-  
ción del procedimiento de la presente invención puede  
comprender cualquiera de los métodos conocidos de sepa-  
30 rar un sistema disolvente de una sustancia disuelta en



el mismo. Estos métodos incluyen, entre otros, el secado por congelación, secado por pulverización, secado al vacío, el empleo de un aparato giratorio de secado al vacío, y similares. Las temperaturas empleadas en esta operación de secado pueden ser desde un mínimo requerido para volatilizar el fluido de extracción a la presión utilizada, hasta aproximadamente 85°C; siendo esta última la temperatura empleada en un procedimiento de secado por pulverización en el que el antígeno termolábil es expuesto sólo momentáneamente a esta temperatura extrema. La presión empleada en el sistema de volatilización depende igualmente del procedimiento específico empleado, y puede variar desde la presión atmosférica, o ligeramente superior, hasta aproximadamente 30 mm. de mercurio, tal como la que se emplearía en una técnica de secado por congelación.

Se ha comprobado también que para separar los últimos vestigios del fluido de extracción acuoso-disolvente orgánico, es preferible dejar que el antígeno en partículas sustancialmente seco resultante de la operación de volatilización permanezca en un desecador a vacío durante aproximadamente 24 horas. Esta operación puede ser efectuada a temperatura ambiente, o hasta aproximadamente 45°C.

El resultado del procedimiento anterior es una sustancia en partículas seca, alergénicas o antígenicamente activa, que ha sido tratada con el fluido de extracción altamente reactivo, contiene sustancialmente todos los principios activos de la sustancia irritante original, y, como se verá más adelante, es un ex-



tracto antigénico extremadamente versátil desde el punto de vista de su empleo final. Se observará también que por medio de este procedimiento no se pierde prácticamente nada de material alérgenicamente activo, mientras que en el procedimiento de la técnica anterior de precipitación con alumbre a partir de un extracto acuoso-disolvente orgánico, se pierde una parte sustancial del nitrógeno proteínico inicialmente sometido a extracción. Así pues, el rendimiento y la integridad de la extracción son aumentados de modo espectacular por medio de este método.

Ha de indicarse también aquí que el procedimiento de la presente invención no se limita en modo alguno a una mezcla natural compleja de antígenos, sino que puede ser aplicado a un extracto que ha sido sometido a un procedimiento por el que las varias fracciones de antígenos son separadas antes del tratamiento y/o la operación de volatilización.

En esta etapa, el extracto seco en partículas (polvo) puede ser tratado también para obtener un extracto alérgico en una forma seleccionada de las varias conocidas en la técnica del empleo de extractos alérgicos. Así, el polvo puede ser reconstituído simplemente con un sistema disolvente acuoso fisiológicamente aceptable, y ser empleado tanto como extracto de ensayo de la piel para diagnóstico como extracto de tratamiento de hiposensibilización. Tales flúidos fisiológicamente aceptables incluyen disolución salina o de Evan tamponada, disolución de Coca que comprende bicarbonato de sodio, cloruro de sodio y fenol, disolución

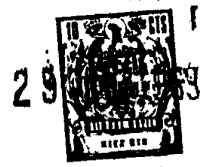


1509

glicerosalina o de Stier, disolución de dextrosa o de Ungar, disoluciones tamponadas de fosfatos, y similares. Estas disoluciones tienen usualmente un pH de alrededor de 7, y puede llegar hasta 7,5.

5                   Un segundo método de tratar después el extracto en polvo seco puede comprender la reconstitución del mismo con una disolución acuosa, y la adición subsiguiente de un compuesto de aluminio, tal como el alumbre potásico o el hidróxido de aluminio, para insolubilizar el antígeno y preparar una forma de dosificación terapéutica con propiedades de liberación lenta. A este respecto se ha comprobado inesperadamente que el precipitado insolubilizado, o producto de adsorción empleando el extracto tratado con disolvente orgánico y reconstituido por disolución acuosa de la presente invención, es muy superior a los antígenos precipitados con alumbre de la técnica anterior, procedentes de disoluciones de los mismos desgrasadas y sometidas a extracción estrictamente acuosa. Mientras que tales preparaciones de la técnica anterior son de naturaleza gelatinosa y farmacéuticamente inaceptables, las preparaciones de la presente invención son suspensiones homogéneas, en partículas, y son de aspecto farmacéuticamente atractivo.

15                   Ha de indicarse aquí que también se ha comprobado inesperadamente que el rendimiento de precipitado a partir del extracto reconstituido empleando un compuesto de aluminio para insolubilizar el antígeno, es espectacularmente mayor que el obtenido empleando el procedimiento PEAP de la técnica anterior. Se obtienen,



por ejemplo de aproximadamente 40-50% empleando el procedimiento PEAP de la técnica anterior, mientras que en el procedimiento de la presente invención se obtiene un rendimiento de aproximadamente 80-90%. Este rendimiento es calculado con respecto a nitrógeno proteínico en el flúido de extracción, en comparación con el nitrógeno proteínico en el precipitado insolubilizado o producto de adsorción.

En este procedimiento de insolubilización, puede añadirse una cantidad estequiométrica de aluminio, y la suspensión puede ser simplemente diluída hasta la potencia adecuada con flúido acuoso adicional; o puede añadirse compuesto de aluminio en exceso, y el precipitado o producto de adsorción ser separado del líquido que sobrenada, lavado, y puesto de nuevo en suspensión en un flúido acuoso fisiológicamente aceptable.

Para asegurarse de que el extracto alérgico es estéril, la práctica usual es hacer pasar una disolución que contiene el extracto de antígeno termolábil a través de un filtro de bacterias, llamado más comúnmente un filtro de Seitz, de microporos, MILLIPORE, o de membrana. Tales procedimientos son muy conocidos en la técnica y se describen en varios textos referentes a los mismos. En la presente invención, tal esterilización puede realizarse en cualquier fase líquida, siempre que el antígeno esté en disolución. Por ejemplo, o bien el extracto inicial acuoso-disolvente orgánico, o el extracto reconstituído con disolución acuosa pueden ser esterilizados por filtración. Naturalmente, se observará que una técnica de secado por pulve-



rización puede efectuar una esterilización del producto seco resultante, y hacer innecesaria la operación de filtración de las bacterias.

5 Haciendo ahora referencia a la forma de empleo de la preparación de la presente invención, estas técnicas son también muy conocidas en la técnica y pueden dividirse en dos categorías, es decir, (1) extractos de ensayo sobre la piel o de diagnóstico, y (2) extractos de tratamiento o terapéuticos. Los extractos  
10 de ensayo o diagnóstico son fundamentalmente de naturaleza acuosa, y se utilizan colocando una gota del extracto específico sobre la piel del individuo o animal que se somete a ensayo, y raspando o escariando la superficie de la piel situada bajo el extracto. Si pasado  
15 un período de tiempo más bien corto aparece una erupción o roncha, ello indica claramente que el individuo es alérgico al antígeno particular empleado en el ensayo. Otro método de ensayo comprende la inyección intracutánea del extracto y la subsiguiente observación de  
20 la formación de una roncha o mancha eruptiva. También pueden emplearse ensayos sobre tejido conjuntivo, de olor y de inhalación, con el polvo seco resultante de la extracción inicial, y se opina que estos ensayos son más reveladores y precisos que el ensayo sobre la piel.

25 La segunda categoría de extractos, los de tratamiento o terapéuticos, puede comprender los extractos acuosos, precipitados con aluminio, los repositorios y similares. El empleo de estos extractos de tratamiento comprende la inyección subcutánea de una  
30 solución extremadamente diluída del antígeno, seguida



de inyecciones diarias o semanales de concentración gradualmente creciente. A causa de la gama enormemente amplia de sensibilidades de los varios individuos, y de las diferentes características de liberación de las varias formas terapéuticas del antígeno, el régimen de tratamiento es decidido por el médico en cada caso individual.

Con respecto a la dosificación o potencia del extracto, los productos de la presente invención pueden ser concentrados o diluidos, según la concentración básica del extracto inicial y de la potencia deseada en el extracto final. El medio más común, aunque no enteramente satisfactorio para normalizar el extracto, es el análisis de la disolución para determinar las UNP, o unidades de nitrógeno proteínico. La deficiencia de este método es, obviamente, que no todas las fracciones antigénicas del extracto son necesariamente proteínicas, sino que pueden ser moléculas de hidratos de carbono, de lípidos, u otras que no contienen nitrógeno. Con respecto a la potencia del extracto, la práctica usual es normalizar extractos de tratamiento a desde aproximadamente 10 a aproximadamente 5.000 UNP, según la correlación entre la antigenicidad y el nitrógeno proteínico. Los extractos de tratamiento se establecen usualmente en desde aproximadamente 10 UNP a aproximadamente 20.000 UNP, siendo empleados los extractos de menor potencia en las fases iniciales de la terapia de hiposensibilización, y los extractos de potencia superior como dosis de sostenimiento o mantenimiento a intervalos mayores de tiempo.



La presente invención es ilustrada por medio de los ejemplos siguientes, pero no se pretende limitar a ellos el objeto del procedimiento de la invención.

#### EJEMPLO 1

5

#### PREPARACION DE EXTRACTO EN POLVO SECO

Fué preparado un flúido de extracción que comprendía una mezcla de 250 ml. de piridina y 250 ml. de hidróxido de sodio 0,1 N, y se añadió al mismo la cantidad de 50 gramos de una mezcla de polen alto y bajo de ambrosía. La mezcla se dejó reposar durante 5 días a temperatura ambiente, con agitación ocasional. La fase líquida transparente que sobrenadaba, que contenía los principios activos del polen de ambrosía, fué decantada, y el residuo fué desechado.

15

El líquido que sobrenadaba fué colocado después en un evaporador giratorio a vacío (evaporador instantáneo), equipado con una unidad de condensación, y calentado hasta 50°C, hasta que hubo sido separada la fase líquida. El resultado era un polvo parduzco sustancialmente seco. El polvo fué colocado después en un desecador a vacío, y se dejó permanecer en el mismo durante toda la noche bajo vacío. El resultado fué un polvo de fácil fluencia sin traza alguna de disolvente.

20

#### EJEMPLO 2

30

#### PREPARACION DE UN EXTRACTO PARA DIAGNOSTICO



Fué preparada una disolución de antígeno de polen de ambrosía que contenía 10.000 UNP/ml, añadiendo 393,2 mg. del polvo seco preparado en el Ejemplo 1 a 100 ml. de agua destilada a 50°C. El pH de la disolución resultante era de 7,4. La disolución se hizo pasar después a través de un filtro de miliporos para conseguir su esterilidad. El filtrado fué analizado, y se comprobó que contenía 9.100 UNP/ml. de antígeno de ambrosía.

La disolución anterior fué diluída después con agua destilada, bajo condiciones estériles, hasta 1000 UNP/ml., y se efectuaron ensayos de aplicación intradérmica (intracutánea) con cuatro individuos conocidos como clínicamente sensibles al polen de ambrosía.

Fué preparada una segunda disolución de 5000 UNP/ml., y se efectuaron ensayos por vía intradérmica con la misma sobre dos individuos normales y no alérgicos con respecto al polen de ambrosía. Los resultados se indican a continuación en la Tabla 1. En esta tabla, los pacientes 1-4 eran conocidos como sensibles al polen de ambrosía, y los pacientes 5-6 eran conocidos como no sensibles a este polen.



TABLA 1

<u>Paciente</u>	Sensibilidad* a	
	<u>1000 UNP/ml.</u>	<u>5000 UNP/ml.</u>
1	2+	
2	2+	
3	3+	
4	2+	
5		0
6		0

- \* 0 - reacción negativa - ninguna roncha
- 1+ ligera reacción - roncha de 5 mm. con eritema
- 2+ reacción moderada - roncha de 10 mm. con eritema
- 3+ reacción marcada - roncha de 15 mm. con eritema y posible pseudopodia y comezón.
- 4+ reacción marcada - roncha de 20 mm. con eritema, pseudopodia, comezón y dolor.

EJEMPLO 3

Fué seguido el procedimiento del Ejemplo 1 para preparar un extracto de polvo seco de polen de ambrosía. Una vez reconstituido con agua destilada bajo condiciones estériles, y diluido a la potencia requerida, este extracto es útil en terapéutica de hiposensibilización para individuos alérgicos al polen de ambrosía, o para la diagnosis de alergias por medio de ensayos en la piel.



#### EJEMPLOS 4-8

Fueron repetidos los Ejemplos 1-3, pero el polen de ámbrosía fué sustituido por polvo doméstico, caspa de caballo, plumas de pollo, insectos con aguijón, alfalfa y polen de abedul. Estos extractos son empleados para la diagnosis de reacciones alérgicas por ensayos sobre la piel, o para terapéutica de hiposensibilización. Los polvos secos son útiles también para la diagnosis de reacciones alérgicas por métodos de ensayo en la conjuntiva o por olfateo.

#### EJEMPLO 9

A aproximadamente 100 ml. del extracto reconstituido del Ejemplo 3, con un pH ajustado a aproximadamente 6,2 con ácido sulfúrico diluido, se añadieron lentamente, con agitación continua, aproximadamente 50 ml. de una disolución estéril, al 2% en peso, de sulfato de potasio y aluminio. El precipitado obtenido fué separado del líquido que sobrenadaba por centrifugación, lavado con disolución salina en agua destilada, y puesto de nuevo en suspensión en un tampón de fosfato de un pH de aproximadamente 7,0. El rendimiento obtenido era de aproximadamente 80%. Esta suspensión alérgicamente activa es útil como extracto para tratamiento de hiposensibilización de liberación lenta.



## REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

5  
10  
15  
1.- Un procedimiento para preparar un extracto de una sustancia capaz de provocar una respuesta alérgica y que contiene principios fisiológicamente activos, cuyo procedimiento comprende mezclar una sustancia con un fluido de extracción que comprende agua y un disolvente orgánico que contiene nitrógeno básico, separar el fluido de extracción de todo material insoluble en él, desechar el material insoluble y volatilizar el fluido de extracción para aislar los principios activos de dicha sustancia como un polvo seco, estable, alérgicamente activo.

20  
2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el disolvente orgánico es una amina terciaria heterocíclica.

3.- Un procedimiento según la reivindicación 2, en el cual la amina terciaria heterocíclica tiene un punto de ebullición menor que 120°C.

25  
4.- Un procedimiento según la reivindicación 2, en el cual la amina terciaria heterocíclica es seleccionada del grupo que consiste en piridina, quinoli-



na, lutindina, colidina y picolina.

5.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el fluido de extracción tiene un pH de 7,5 a 12,0 aproximadamente.

5 6.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el fluido de extracción comprende un sistema disolvente alcalino-piridina.

7.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual la volatilización del fluido de extracción es realizada por calentamiento a una temperatura de 50 a 85°C, aproximadamente.

10 8.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual la volatilización del fluido de extracción es realizada colocando el mismo bajo presión reducida.

15 9.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual la volatilización del fluido de extracción es realizada colocando la mezcla bajo presión reducida y calentando la mezcla a una temperatura de hasta unos 85°C.

20 10.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual la volatilización es realizada por secado por pulverización.

25 11.- Un procedimiento según la reivindicación 10, en el cual el secado por pulverización es realizado a una temperatura superior al punto de ebullición del fluido de extracción.

30 12.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual la sustancia capaz de provocar una respuesta alérgica es un inhalante.



13.- Un procedimiento según la reivindicación 12, en el cual el inhalante es seleccionado del grupo de alergenos que consiste en polen, polvo casero, epitelio, mohos, materiales de insecto, semillas y plumas.

5 14.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el flúido de extracción es esterilizado después de la separación del mismo de dichos materiales insolubles y antes de la volatilización del mismo.

10 15.- Un procedimiento según la reivindicación 14, en el cual la esterilización es realizada haciendo pasar el flúido de extracción a través de un filtro de bacterias.

15 16.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el polvo, sustancialmente seco, es secado además en un secador de vacío, a una temperatura de 20 a 45°C aproximadamente, y bajo una presión inferior a la atmosférica.

20 17.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el polvo seco es reconstituido por disolución en un sistema disolvente acuoso, fisiológicamente aceptable.

18.- Un procedimiento según la reivindicación 17, en el cual el flúido reconstituido es esterilizado haciéndolo pasar a través de un filtro de bacterias.

25 19.- Un procedimiento para preparar un extracto de una sustancia capaz de provocar una respuesta alérgica de tratamiento de larga acción, y que contiene principios fisiológicamente activos, cuyo procedimiento comprende mezclar la sustancia con un flúido de extracción  
30 que comprende agua y un disolvente orgánico que contiene

27F

nitrógeno básico, separar el flúido de extracción de todo material insoluble en él, desechar el material insoluble, volatilizar el flúido de extracción para aislar los principios activos de dicha sustancia como un polvo seco, reconstituir el extracto con un disolvente acuoso y añadir un compuesto de aluminio al extracto acuoso reconstituido, con lo cual se insolubilizan los principios activos.

20 20.- Un procedimiento según la reivindicación 19, en el cual el compuesto de aluminio es sulfato de aluminio y potasio.

15 21.- Un procedimiento según la reivindicación 19, en el cual los principios activos insolubilizados son aislados, lavados y suspendidos en un flúido acuoso fisiológicamente aceptable.

22.- Un procedimiento para preparar un extracto de una sustancia capaz de provocar una respuesta alérgica y que contiene principios fisiológicamente activos.

20 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de venticuatro hojas escritas a máquina por una sola cara. 27 FEB. 1971

Madrid,

P.A.   
Aserto de autenticidad  
Por Poder.