

372271



372271

SECCION TECNICA  
CLASIFICACION I, F, C  
CLASE A 61  
SUBCLASE H

# MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

## PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: DAVID GEORGE MARSH

RESIDENCIA: 608 Devirian Place, ALTADENA, Califor-  
nia, USA

ENUNCIADO: "UN METODO PARA LA PRODUCCION DE UN  
ALERGENO FORMALINIZADO DE BAJA ACTI-  
VIDA ALERGENICA".

Prioridad: Patente británicas n. 48064/68 del 10-10-68  
48189/69 1-10-69



372271

1 Este invento se refiere a la producción de alérgenos tratados con formaldehído adecuados para la inmunoterapia (desensibilización) de individuos que sufren alergia del tipo inmediato. Estos materiales que contienen alérgenos formalinizados también son útiles para inducir la  
5 formación de anticuerpos en mamíferos que reaccionan cruzadamente con los materiales que contienen alérgenos nativos.

10 Los pacientes que sufren alergias del tipo inmediato (atopías) poseen la capacidad de sintetizar tipos especiales de anticuerpos alérgicos (reaginas) cuando son expuestos a ciertas sustancias (alérgenos) hacia las que son sensibles. Las reaginas se unen intensamente a ciertos tejidos, especialmente los del epitelio. A continuación de una exposición al material alérgico sensibilizante, se produce una combinación física entre el alérgeno o alérgenos y sus reaginas homólogas, produciéndose manifestaciones alérgicas en los puntos de la combinación  
15 reagina-alérgeno. Los individuos alérgicos también pueden producir los llamados "anticuerpos de bloqueo" de tipo no reagina que son capaces de combinarse con el alérgeno inactivándolo, generalmente sin ninguna reacción secundaria indeseable. La actividad reagínica ha sido atribuida a la Inmunoglobulina E (IgE) y la actividad de "bloqueo" principalmente a la IgG en el suero y la IgA en las secreciones.  
20 ciones.

El término "alérgico" en el sentido utilizado aquí se limitará a la definición de las alergias del tipo inmediato (atópico).

30 Desde hace mucho tiempo la práctica clínica ha



1. 1969

372271

1 consistido en inyectar a un paciente alérgico con dosis  
gradualmente crecientes de extractos acuosos que contienen  
el material o materiales alérgicos frente a los que es  
sensible el paciente. La razón de este tratamiento es fun-  
5 damentalmente acumular la concentración de anticuerpo de  
bloqueo protector en el suero (y en otros humores corpora-  
les) a un nivel en el que pueda competir eficazmente con  
la reagina fijada en el tejido para reaccionar con el alér-  
geno que entra en el organismo, inhibiendo con ello las  
10 reacciones alérgicas. En ciertos casos, se ha encontrado  
también que esta terapia suprime la producción de reagi-  
nas y reduce la capacidad celular de respuesta hacia los  
alérgenos inyectados. Las dosis inmunizantes del extracto  
alérgico deben ser aumentadas muy gradualmente durante  
15 el curso del tratamiento con objeto de reducir al mínimo  
el riesgo de una respuesta alérgica general (anafiláctica)  
en el paciente.

Los inconvenientes principales de esta inmunote-  
rapia son: (i) se requieren inyecciones repetidas durante  
20 muchas semanas, (ii) el tratamiento raras veces es comple-  
tamente efectivo para aliviar el síndrome alérgico y (iii)  
el riesgo de reacción anafiláctica general se encuentra  
siempre presente en cada etapa del tratamiento.

Por lo tanto, la terapia original ha sido modifica  
25 da con objeto de superar estos inconvenientes. Las formas  
más recientes de tratamiento incluyen la inmunización del  
paciente con una emulsión de agua en aceite del extracto  
alérgico o incluyendo un auxiliar de liberación lenta,  
tal como un alginato, con un extracto del material alérgi-  
30 nico. Estos métodos no han resultado totalmente satisfac-



1969

372271

1 torios debido a la aparición de algunas reacciones anafilácticas y algunas reacciones tóxicas en el paciente o a que estas preparaciones no han conseguido ser totalmente efectivas desde el punto de vista clínico.

5 Varios investigadores han tratado física o químicamente los materiales alérgicos en un intento para reducir considerablemente sus propiedades alérgicas, pero mantener su capacidad de protección de un individuo alérgico contra el alérgeno nativo. La inmunoterapia de los  
10 individuos alérgicos que utilizan estos alérgenos modificados retendría, según se esperaba, las propiedades inmunizantes deseadas del alérgeno nativo, fundamentalmente en el sentido de que el anticuerpo de bloqueo contra el alérgeno nativo sería producido en cantidad notable. Además, la alergenidad reducida de estos productos modificados permitiría el uso de dosis considerablemente aumentadas de material inmunizante y, por lo tanto, aumentaría considerablemente la cantidad de anticuerpo de bloqueo protector producida.

20 Ahora se ha encontrado que, mediante un nuevo procedimiento en el que se emplea una solución de formaldehído, la gran mayoría de las sustancias que contienen alérgenos pueden ser modificadas de forma que se superan los inconvenientes de los alérgenos nativos en lo que se refiere a su uso en inmunoterapia. En todo lo que sigue, cualquier sustancia que contenga un alérgeno será denominada simplemente alérgeno, aunque se admite que no todos los componentes de la sustancia que contiene el alérgeno son necesariamente alérgicos. Al referirnos al nuevo  
25 tratamiento con formaldehído, los términos "formalinizado"  
30



U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
MAY 1968

372271

1 y "formalinización" estarán limitados a la descripción del  
tratamiento de los materiales alergénicos que contienen  
grupos amino con formaldehído en los que tiene lugar una  
reacción química definida entre los grupos amino y el  
5 formaldehído, que implica el establecimiento de un puente  
de etileno intermolecular o intramolecular entre o dentro  
de las moléculas de alérgeno o entre el alérgeno y otras  
moléculas reactivas presentes en la mezcla de reacción.

Los nuevos alérgenos formalinizados de este inven-  
10 to se producen permitiendo que los alérgenos, disueltos en  
una solución acuosa no fenólica, reaccionen químicamente,  
en condiciones suaves, con formaldehído diluído o con una  
sustancia que libere formaldehído, como metenamína, tam-  
bién presente en la solución. Los alérgenos así tratados  
15 pueden ser extractos altamente purificados o crudos. En  
el sentido utilizado aquí, el término "no fenólicos" sig-  
nifica que como máximo sólo se encuentran presentes canti-  
dades traza de compuestos fenólicos añadidos en el ambien-  
te de la reacción de formalinización. Sin embargo, este  
20 término no excluye la presencia de grupos hidroxilo fenó-  
licos en los alérgenos propiamente dichos, ya que se sabe  
que, en algunos casos, contienen naturalmente estos gru-  
pos como parte de la compleja estructura proteínica.

Hemos encontrado que el procedimiento de este in-  
25 vento conduce a alérgenos formalinizados con las propie-  
dades inmunizantes deseadas, siendo adecuados estos alérge-  
nos fomalinizados para la inmunoterapia de seres humanos  
alérgicos. Estos derivados también son útiles para la inmu-  
nización de otros mamíferos para producir anticuerpos in-  
30 tensamente reactivos con el alérgeno nativo.



OCT. 1963

372271

1

5

10

15

20

25

30

Aunque no deseamos quedar ligados por ninguna teoría, creemos que una importante razón por la que los alérgenos formalinizados son superiores a los alérgenos tratados con formaldehído previamente preparados reside en la ausencia de fenol de la solución de reacción. El fenol presente en las soluciones de reacción de otros investigadores había sido incorporado preferentemente a los productos resultantes debido a la reacción química entre los grupos aminometilol de los alérgenos que contienen grupos amino (intermediarios del tipo A en la ecuación dada más adelante) y el fenol. Esta sustitución química de los grupos fenólicos en las moléculas que contienen grupos amino conduce a derivados cuyas propiedades inmunizantes predominantes reflejan en un grado muy importante los determinantes fenólicos más que otras regiones de la molécula. Así, los alérgenos tratados con formaldehído que incorporan fenol no poseen las propiedades de inmunización deseadas antes definidas, ya que la inmunoterapia con estos materiales conduciría a anticuerpos dirigidos principalmente contra los grupos fenólicos recién incorporados más que contra las partes originales del alérgeno contra el cual deben ser producidos los anticuerpos en cantidades importantes, si se desea obtener propiedades inmunizantes.

En contraste con el trabajo anterior, la inmunización con los alérgenos formalinizados de este invento conduce a la producción extensiva de anticuerpos contra algunas partes nativas de las moléculas de alérgeno; una gran proporción de este anticuerpo es capaz de ejercer un efecto de bloqueo sobre las moléculas de alérgeno nativo.

Cuando se utilizan alérgenos crudos, es preferi-



OCT. 1963

372271

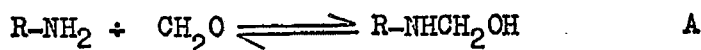
1 ble, aunque no necesario, haber eliminado antes de la for-  
malinización las sustancias grasas y los materiales no  
alergénicos de bajo peso molecular contenidos en las sus-  
tancias nativas. La reacción entre los materiales alergé-  
5 nicos crudos o altamente purificados y el formaldehido  
puede llevarse a cabo en presencia de un aditivo de bajo  
peso molecular. Los aditivos adecuados, conteniendo gene-  
ralmente menos de unos 8 átomos de carbono además de cual-  
quier grupo funcional presente, son: diaminas alifáticas;  
10 guanidinas; amidas de ácidos alifáticos; ácidos carboxíli-  
cos alifáticos conteniendo grupos amino, incluidos los  
aminoácidos alifáticos (ácidos monoamino-monocarboxílicos,  
ácidos monocaminodicarboxílicos y ácidos diaminomono-carbo-  
xílicos), hidroxiaminoácidos alifáticos y ácidos diamino-  
15 dicarboxílicos alifáticos; y compuestos alifáticos que  
contienen combinaciones y permutaciones de uno a más gru-  
pos amino, guanidino y amido. Además, puede encontrarse  
presente un número limitado de grupos hidroxilo en cual-  
quiera de los tipos anteriores de compuestos. Las especies  
20 particulares son el 1,4-diaminobutano, lisina, oritina,  
un ácido 1,5-diaminopimélico, arginina, adipamida, ácido  
aspártico, serina y alanina. El aditivo es tal que se com-  
bina químicamente con los componentes del polen durante  
el proceso de formalinización. Cuando se comparan con los  
25 alérgenos formalinizados preparados por tratamiento con  
formaldehido solo, algunos de los alérgenos formalinizados  
preparados en combinación con un aditivo provocan en mayor  
grado las deseadas propiedades inmunizantes antes descri-  
tas.

30 Aunque no deseamos ser limitados por ninguna teo-

372271

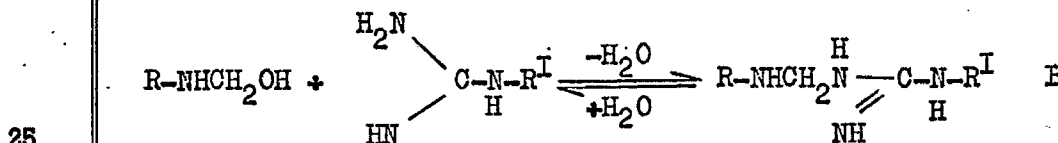


1 ría, se cree que en las condiciones de reacción utiliza-  
 das en este invento, el formaldehído reacciona reversible-  
 mente con los grupos amino libres de las proteínas, pépti-  
 dos y aminoácidos y también con los grupos amino de los  
 5 aminoazúcares presentes en la mezcla de reacción. Utili-  
 zando los símbolos R, R<sup>I</sup>, etc. para representar los grupos  
 proteína, péptido, aminoácido, glicoproteína y otros posi-  
 bles restos que pueden estar unidos químicamente a los  
 agrupamientos reactivos indicados más adelante, se cree  
 10 que se produce la siguiente serie de reacciones:

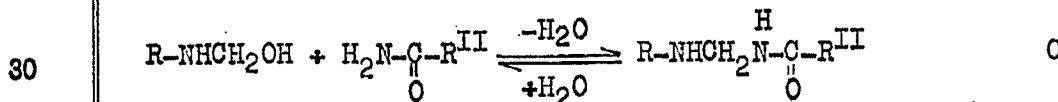


15 El grupo aminometilol inestable, intermediario  
 (A), que puede encontrarse presente en las propias molé-  
 culas de alérgeno o en los aditivos u otras sustancias no  
 alergénicas que se encuentran con el alérgeno, puede reac-  
 cionar después con ciertos grupos reactivos para formar  
 las estructuras más estables con un puente de metileno,  
 de la siguiente forma:

20 (a) Con grupos guanidino de la arginina (sobre proteínas,  
 péptidos o cualquier aditivo que contenga un grupo o  
 grupos guanidino - v.g. arginina):



25 (b) Con amidas de ácido (sobre proteínas, péptidos y adi-  
 tivos que contengan grupo o grupos amida de ácido -  
 v.g. adipamida):



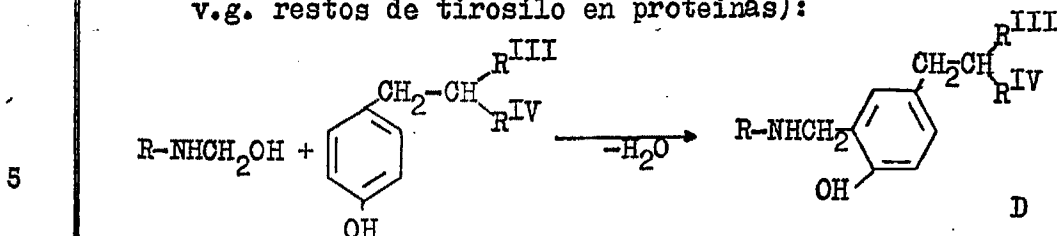
30

372271



CT. 1962

1 (c) Con ciertos grupos aromáticos (sobre proteínas, etc. -  
v.g. restos de tirosilo en proteínas):



La estabilidad de los derivados es generalmente del siguiente orden: D > C > B.

10 Por lo tanto, cualquier determinante alergénico que contenga un grupo amino, un grupo guanidino, una amida de ácido o un resto aromático reactivo (v.g. tirosina, triptófano o histidina) puede ser modificado y, potencialmente, puede ser convertido en no alergénico por tratamiento con formaldehído. Además, un determinante alergénico no comprendido en los grupos anteriores puede ser modificado y convertido en no alergénico mediante reacciones que se producen en regiones adyacentes (o incluso relativamente remotas) sobre la molécula de alérgeno, siempre que se produzca una alteración estérica subsiguiente en el determinante alergénico de forma que ya no sea reconocido como tal por la reagina homóloga.

15

20

25 Además debe observarse que cuando se encuentra presente un exceso relativamente grande de un aditivo, tomará parte preferentemente en aquellas reacciones que afecten a sus grupos reactivos y al formaldehído, en lugar de producirse unas reacciones similares que impliquen a unos grupos reactivos análogos de la molécula de alérgeno con formaldehído. Por ejemplo, cuando se encuentra presente un aditivo como la lisina, el resultado neto será

30



372271

1 que la mayor parte de los restos guanidino, amida de áci-  
do y restos aromáticos reactivos de una molécula de alér-  
geno serán combinados mediante puentes de metileno con  
5 el aditivo lisina en lugar de con los restos de lisina  
que se encuentran en la propia molécula de alérgeno.

Diversas especies de plantas y animales estrecha-  
mente relacionadas producen muchos materiales que con fre-  
cuencia son similares tanto antigénicamente como alérgé-  
nicamente. Por ejemplo, casi todos los pólenes grasos (es-  
10 pecialmente los que son de importancia fundamental en la  
fiebre del heno) contienen tres grupos importantes pero  
distintos de alérgenos que inmunoquímicamente están estre-  
chamente relacionados, que han sido clasificados como Gru-  
pos I, II y III, de los cuales el Grupo I es el de mayor  
15 importancia alérgenicamente. Así, un alérgeno del Grupo I  
de un polen herbáceo puede ser utilizado para preparar un de-  
rivado formalinado que posea las deseadas propiedades  
inmunizantes con respecto al Grupo I nativo de muchas es-  
pecies de polen herbáceo. Por lo tanto pueden obtenerse una  
20 preparación de alérgeno formalinado de un polen de herbáceas,  
con las deseadas propiedades inmunizantes, a partir de  
un extracto de una mezcla de un número relativamente pe-  
queño de diferentes pólenes herbáceos (v.g. a partir quizá  
de 4 a 6 especies diferentes, seleccionadas de forma que  
25 contengan una gama representativa de los diversos grupos  
alérgenicos inmunoquímicos del polen herbáceo que son agen-  
tes causantes de la fiebre del heno).

Las preparaciones alérgenicas crudas que son es-  
pecialmente adecuadas para la formalinización pueden obte-  
nerse eliminando las grasas de los materiales que contie-  
30

372271



CT. 1968

1       nen alérgenos nativos con éter anhidro exento de peróxido  
y extrayendo los materiales exentos de grasa con una solu-  
ción acuosa regulada a un pH de 6-8 aproximadamente (v.g.  
5        $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,125 M). Las sustancias no alergénicas de bajo  
peso molecular, caso de encontrarse presentes, pueden ser  
separadas después del extracto por diálisis a través de  
una membrana semipermeable (v.g. tubo de Visking), aunque  
puede utilizarse la filtración de gel o un proceso similar  
conocido por los expertos en la técnica para obtener un  
10       resultado análogo; alternativamente, los materiales de ele-  
vado peso molecular pueden ser precipitados sin que se pro-  
duzca una desnaturalización irreversible significativa del  
extracto completo mediante un proceso de precipitación con  
una sal o un disolvente y estos materiales de elevado peso  
15       molecular pueden ser reconstituídos a partir de los produc-  
tos precipitados en forma de solución acuosa. Las sustan-  
cias alergénicas purificadas o parcialmente purificadas  
pueden ser preparadas por cualquiera de los procedimientos  
comúnmente utilizados para la purificación de macromolécu-  
20       las a partir de mezclas complejas. En la bibliografía se  
han descrito procedimientos adecuados de purificación para  
los alérgenos del pescado, polen de ambrosía y polen de  
vallico, aunque éstos no son los únicos procedimientos ni  
los únicos materiales alergénicos que pueden ser utiliza-  
25       dos en el proceso de formalinización.

El presente invento no está limitado a ningún ma-  
terial o extracto que contenga cualquier alérgeno parti-  
cular. No obstante, los materiales que contienen alérgenos  
del polen de las plantas, especialmente de las hierbas,  
30       árboles y malas hierbas, importantes en alergia, pueden ser



372271

1 extraídos y tratados con éxito con formaldehído de acuer-  
do con este invento. Son ejemplos de pólenes de la fami-  
lia de las herbáceas (Gramineae) útiles en la práctica  
de este invento la cañuela de las praderas (Festuca elatior),  
5 espiguilla de caña lisa (Poa pratensis) y pie de gallo (Dactylis glomerata) del género Festuceae, vallico común (Lolium perenne) y vallico italiano (Lolium multiflorum) del género Hordeae, alfalfa (Phelum pratense) y heno fino (Agrostis palustri) del género Agrostideae y grama de olor (Anthoxanthum odoratum) del género Phalari-  
10 deae. Son ejemplos comparables de tres pólenes las diversas especies de nogales, como Juglans californica, de abedul (v.g. Betula alba), de encinas (v.g. Quercus alba) y de olmo (v.g. Ulmus parvifolia). Los pólenes útiles de malas hierbas son el de ambrosía de pequeño porte (Ambrosía elatior), ambrosía de gran porte (Ambrosía trifida), cardo ruso (Salsola pestifer), salvia común (Artemisia tridentata) y llantén de hoja estrecha (Plantago lanceolata). Otros materiales alergénicos que pueden ser trata-  
20 dos son: extractos que contengan cuerpos completos y/o excreciones y secreciones de ácaros del polvo doméstico del género Dermatophagoides y géneros afines, incluyendo estos extractos los extractos crudos del polvo doméstico; soluciones de alérgenos de los alimentos tales como ovo-  
25 albúmina, extraída de los huevos de gallina; extractos de mohos (v.g. Alternaria, Penicillium, Aspergillus, Helminthosporium, etc.); extractos de semillas y fibras de plantas (v.g. algodón, castor, etc.); y extractos de insectos picadores (v.g. abejas y avispas).

30

Los alérgenos altamente purificados o purifi-

372271



Oct. 1964

1 cados parcialmente también pueden ser formalinizados, por  
ejemplo, los alérgenos del polen de herbáceas del grupo  
I, Antígeno E del polen de la ambrosía y los extractos de  
ácaros del polvo casero parcialmente purificado.

5 Las concentraciones de alérgeno, formaldehído y  
cualquier aditivo presentes en la mezcla de reacción y la  
temperatura, pH y periodo de incubación de la mezcla de  
reacción que dan lugar a las condiciones óptimas de forma-  
10 linización dependen unas de otras hasta cierto punto. Se  
prefieren las siguientes condiciones, cada una de ellas  
obligada a mantener otras condiciones dentro de los lími-  
tes apropiados con objeto de conseguir el alérgeno forma-  
linizado deseado. Puede agregarse un preservativo como el  
o-(etil-mercuritio)benzoato sódico ("Merthiolate") a la  
15 solución de reacción (1:10.000).

La concentración final de los materiales alérgeni-  
cos utilizados para la reacción con formaldehído debe ser  
preferiblemente (i) tal que todos los componentes sean com-  
pletamente solubles, (ii) no tan alta que se produzca una  
20 reticulación intermolecular extensiva entre los componen-  
tes alérgénicos durante la reacción y (iii) sea compatible  
con la concentración de formaldehído y de cualquier adi-  
tivo utilizado. Las soluciones deben ser preparadas en un  
regulador acuoso, preferiblemente a un pH alrededor de 7,5,  
25 de una molaridad adecuada para mantener este pH en  $\pm 1,0$   
aproximadamente durante el transcurso de la reacción con  
objeto de que la producción de las reacciones deseadas con  
formaldehído sea óptima. Unas concentraciones hasta de  
unos 4 mg de materiales alérgénicos por ml de solución re-  
30 guladora de fosfato sódico 0,1 M a pH 7,5 cumplen normal-



372271

1 mente los requisitos antes mencionados.

La concentración de formaldehído en la mezcla de  
reacción (el formaldehído se encuentra en solución acuosa  
parcialmente como polímeros hidratados e hidratos de  
5 formaldehído) no debe ser tan alta que influya adversamente  
sobre las propiedades inmunizadoras deseadas del  
alérgeno formalinizado resultante, pero debe ser suficiente  
para producir la destrucción virtualmente completa de  
la alergenicidad del alérgeno nativo. Además de los factores  
antes mencionados, los intervalos de concentración  
10 preferidos de formaldehído varían de acuerdo con la estabilidad  
y la pureza del alérgeno que está siendo tratado.

En el caso de los alérgenos crudos relativamente  
estables de los que se han separado los materiales no aler-  
génicos de bajo peso molecular (v.g. extractos de polen de  
15 herbáceas dializados), se han utilizado con éxito unas con-  
centraciones de formaldehído comprendidas entre 0,24 M  
y 0,50 M, pero preferiblemente alrededor de 0,36 M, con  
concentraciones de sólidos del polen dializado de 2 mg/ml,  
no encontrándose presente ningún aditivo. En estos casos,  
20 se encuentra que unas concentraciones mucho más bajas de  
formaldehído (v.g. 0,06 M) conducen a derivados bastante  
alergénicos mientras que unas concentraciones mucho más  
altas (v.g. 5 M) conducen a una desnaturalización excesiva,  
precipitación parcial o completa de los alérgenos y  
25 pérdida de las propiedades inmunizantes deseadas.

Cuando se han de utilizar extractos crudos nativos  
que todavía contienen cantidades importantes de materiales  
de bajo peso molecular (v.g. extractos de polen  
30 de herbáceas, nativos, que contienen hasta el 85 % en peso



372271

1 aproximadamente de compuestos no alergénicos de peso mole-  
cular inferior a unos 5000), deben ser utilizadas concen-  
traciones de formaldehído apreciablemente superiores a  
0,36 M cuando los extractos contienen el equivalente de  
5 unos 2 mg/ml de sólidos no dializables. En estos casos,  
las sustancias de bajo peso molecular representan esen-  
cialmente "aditivos" indeseables en las soluciones; por  
lo tanto, de preferencia no preparamos alérgenos formali-  
nizados a partir de estos extractos crudos nativos.

10 Con los alérgenos relativamente estables, muy pu-  
rificados, como los alérgenos del polen de herbáceas del  
Grupo I, se prefieren unas concentraciones de formaldehi-  
do comprendidas entre 0,025 M y 0,12 M aproximadamente,  
con concentraciones de alérgeno alrededor de 1 mg/ml.

15 En el caso de los alérgenos extraordinariamente  
inestables, especialmente el Antígeno E de la ambrosía,  
no son aplicables necesariamente los intervalos antes ci-  
tados. En estos casos, se prefieren unas temperaturas de  
incubación más bajas y periodos de incubación cortos y  
20 la concentración de formaldehído debe ser ajustada para  
que la pérdida de alergenicidad y la retención de las pro-  
piedades inmunizantes deseadas sean óptimas.

25 Cuando se encuentra presente un aditivo de bajo  
peso molecular, debe ser preferiblemente una amina o dia-  
mina alifática sin grupos funcionales adicionales capaces  
de reaccionar con el formaldehído o con un grupo amino-  
metilol (intermediario A discutido anteriormente). Alter-  
nativamente, el aditivo puede ser un compuesto alifático  
conteniendo un grupo o grupos amido de ácido carboxílico  
30 o grupos amino y amido de ácido carboxílico. Los compues-

372271



1968

1        tos guanidínicos, como la arginina, también pueden ser uti-  
lizados. Como ejemplos de aditivos que son especialmente  
eficaces para comunicar las propiedades deseadas a los  
alérgenos formalinizados resultantes citaremos las  $\alpha, \omega$ -  
5        diaminas alifáticas y ciertos derivados de las mismas, pre-  
feriblemente con una longitud de la cadena hidrocarbonada  
parafínica lineal de C<sub>4</sub> o C<sub>5</sub> (v.g. lisina) o ácidos di-  
carboxílicos como la adipamida. También pueden utilizarse  
mezclas de aditivos. La concentración total del aditivo  
10        debe ser compatible con la concentración de formaldehido  
utilizada; un intervalo de trabajo preferido para el adi-  
tivo es alrededor de 0,02 M a 0,2 M, preferiblemente de  
0,05 M con los alérgenos purificados (1 mg/ml) tratados  
con formaldehido 0,06 M y 0,1 M con extractos alérgenos  
15        crudos dializados (2 mg/ml).

      Para los alérgenos que son relativamente esta-  
bles en solución, una temperatura de incubación preferi-  
da es la de 32°C ( $\pm$  2°C). Una temperatura demasiado ele-  
vada puede producir la formación de productos formaliniza-  
dos indeseables. Por ejemplo, a temperaturas elevadas pue-  
de producirse una reticulación y una desnaturalización im-  
20        portante. En el caso de los alérgenos relativamente esta-  
bles, como los alérgenos del polen de herbáceas del Gru-  
po I, el tiempo de incubación es generalmente alrededor  
de cuatro semanas. Estos alérgenos incubados a 32°C  
25        ( $\pm$  2°C) durante periodos de incubación más cortos de unas  
dos semanas o menos son más alérgenos que los tratados  
durante cuatro semanas en las mismas condiciones. Pueden  
utilizarse periodos de incubación más prolongados a tem-  
30        peraturas de 32°C o más bajas, limitados fundamentalmente

372271



1968

1 por consideraciones de economía y eficiencia. Con respec-  
to a los alérgenos termolábiles, como el Antígeno E de  
ambrosía, se prefieren las temperaturas del orden de 15°C  
o menos. En tales casos, el periodo de incubación debe  
5 ser reducido generalmente para que la pérdida de alergenici-  
dad y la retención de las propiedades inmunizantes dese-  
seadas sea óptima.

10 El aditivo de bajo peso molecular puede ser agre-  
gado en cualquier momento durante la incubación, con tal  
de que haya tiempo suficiente para la reacción entre el  
alérgeno y el aditivo. Si la mezcla es todavía apreciable-  
mente alérgica a la terminación del periodo de incuba-  
ción, pueden agregarse cantidades adicionales de solución  
de formaldehído, con o sin aditivo y el periodo de incu-  
15 bación se puede prolongar hasta que se produzca una mez-  
cla no alérgica estable con las propiedades inmunizan-  
tes deseadas.

20 Las preparaciones de alérgenos formalinizados  
acuosos así obtenidas contienen sustancias inmunizantes  
que pueden liberarse del formaldehído y del aditivo que  
no hayan reaccionado por diálisis, filtración de gel o  
por precipitación a partir de la solución del material  
que contiene el alérgeno, mediante una sal o un disolven-  
te precipitante apropiados. En ciertos casos, las concen-  
traciones de formaldehído libre pueden ser tan bajas que  
esta operación sea innecesaria. Las preparaciones de alér-  
25 geno formalinado pueden almacenarse en solución a unos  
4°C en condiciones estériles o pueden ser congeladas; al-  
ternativamente pueden ser secadas por congelación y alma-  
cenadas en seco en los casos en los que el proceso normal  
30

372271



1 de secado por congelación no afecte a las propiedades in-  
munizantes deseadas de la preparación de alérgenos forma-  
linizados.

5 El alérgeno formalinado, preparado en la forma  
antes descrita, constituye un agente inmunoterapéutico  
adecuado para los mamíferos, incluidos los seres humanos  
alérgicos. Puede incorporarse un auxiliar tal como un  
alumbre o un alginato a la preparación inmunizadora de-  
seada para aumentar la eficacia inmunogénica. El alérgeno  
10 formalinado también puede ser utilizado en el diagnós-  
tico antes y durante la inmunoterapia de los seres huma-  
nos alérgicos.

15 Los alérgenos formalinizados de este invento pue-  
den ser administrados a los mamíferos en la forma habi-  
tual por ejemplo intradérmicamente, subcutáneamente o  
intramuscularmente. Además, la baja alergenidad de es-  
tos materiales permite la administración en forma de una  
pulverización de aerosol en la nariz y/o boca para con-  
seguir la inmunización transmucosalmente.

20 El invento es ilustrado, pero no limitado, por  
los siguientes ejemplos:

EJEMPLO 1

25 Se obtiene una preparación de alérgeno del Gru-  
po I, secada por congelación, a partir del polen del  
vallico común (Lolium perenne), con un alto grado de pu-  
reza, por el método descrito por Johnson & Marsh (Euro-  
pean Polymer J., 1, 63 [1965]).

30 En el Método 1a, se prepara una solución de re-  
serva de este alérgeno del Grupo I disolviendo 100 mg  
del alérgeno seco en 72,0 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M, contienien-

372271



1 do 1 parte de "Merthiolate" por 10.000 partes de solución.  
A una parte alícuota de esta solución (21,6 ml) se agre-  
gan 50  $\mu$ l de solución de formaldehído al 36 % en peso/volumen,  
muy lentamente y con agitación magnética constante  
5 de la mezcla. El pH de la mezcla se ajusta a  $7,50 \pm 0,10$   
mediante la adición de NaOH 0,5 N y finalmente se lleva  
hasta un volumen total de 24,0 ml mediante la adición de  
una Solución A (solución reguladora 0,1 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -  
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a pH 7,50, conteniendo una parte de "Merthiolate"  
10 por 10.000 partes de solución reguladora).

En el Método 1b, se disuelven 100 mg del alérgeno seco en 50 ml de Solución A dando una segunda solución de reserva del alérgeno. A una parte alícuota de esta solución (12,0 ml) se añaden 6,0 ml de Solución A, seguido de 4,8 ml de solución de formaldehído 0,3 M preparada en la Solución A, manteniendo la mezcla bien agitada. El pH de la mezcla se ajusta a 7,50 y el volumen total se lleva a 24,0 ml en la forma descrita en el Método 1a.

20 Las mezclas finales en los Métodos 1a y 1b contienen formaldehído 0,025 M y 0,06 M y unas concentraciones de alérgeno de 1,25 y 1,0 mg/ml, respectivamente. En ambos casos, las mezclas son esterilizadas por filtración a través de una membrana antes de la incubación a  $32^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  durante 28-32 días. Terminado el periodo de incubación, las mezclas son dializadas frente a Solución A para separar el formaldehído que no ha reaccionado y se almacenan en estado congelado; alternativamente, son dializadas frente a  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,002 M, se secan por congelación y se conservan a  $-20^\circ\text{C}$ . Estas preparaciones serán denominadas

30



1 "alérgeno formalinizado normal" del alérgeno del vallico  
del Grupo I.

EJEMPLO 2

5 Todos los procedimientos son iguales a los descri-  
tos en el Método 1a o Método 1b, a excepción de que en el  
Método 2a, se disuelven 219 mg de monohidrocloreuro de  
L-lisina en una segunda parte alícuota de 21,6 ml de la  
solución de reserva de alérgeno del Método 1a antes de  
añadir el formaldehído; en el Método 2b, se agregan 6,0 ml  
10 de solución 0,2 M de monohidrocloreuro de L-lisina, prepa-  
rada en solución 0,1 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  conteniendo "Merthiola-  
te" (1:10.000) a una segunda parte alícuota (12,0 ml) de  
la solución de reserva de alérgeno del Método 1b, susti-  
tuyendo a la Solución A (6,0 ml) utilizada en esta etapa  
15 en el Método 1b. En ambos métodos, las mezclas de incuba-  
ción contienen lisina 0,05 M como aditivo. Estas prepara-  
ciones serán denominadas "alérgeno formalinizado con li-  
sina" del alérgeno de vallico del Grupo I.

EJEMPLO 3

20 Todos los procedimientos son iguales a los descri-  
tos en el Método 2b a excepción de que la cantidad equiva-  
lente de monohidrocloreuro de L-lisina utilizada en el Mé-  
todo 2b es sustituida por una tercera parte alícuota  
(12,0 ml) de la solución de reserva de alérgeno del Mé-  
todo 1b, 6,0 ml de monohidrocloreuro de L-arginina 0,2 M  
25 en solución 0,1 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  conteniendo "Merthiolate"  
(1:10.000). Esta preparación se denominará "alérgeno for-  
malinizado con arginina" del alérgeno de vallico del Gru-  
po I.

30

372271



1962

1

EJEMPLO 4

5

10

15

Todos los procedimientos son iguales a los descritos en el Ejemplo 1, Método 1b, a excepción de que se inyecta la solución estéril recién preparada (24,0 ml) a pH 7,50, conteniendo 1,0 mg/ml de alérgeno de vallico del Grupo I y formaldehído 0,06 M en un frasco previamente esterilizado conteniendo adipamida estéril (172,8 mg, dando el equivalente de una solución 0,05 M). El frasco se sacude suavemente para disolver la mayor cantidad posible de adipamida antes de la incubación a 32°C. La adipamida, que al principio es parcialmente insoluble, se disuelve gradualmente durante el periodo de incubación. La preparación resultante será descrita como "alérgeno formalinizado con adipamida" del alérgeno de vallico del Grupo I.

EJEMPLO 5

20

25

30

Una mezcla de pesos iguales de los pólenes secos de cinco hierbas, vallico italiano (Lolium multiflorum), cañuela de las praderas (Festuca elatior), pie de gallo (Dactylis glomerata), alfalfa (Phleum pratense) y espiguita de caña lisa (Poa pratensis), se libera de la grasa por extracción con éter seco exento de peróxido. La mezcla de polen se extrae después con diez veces su peso total original de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,125 M (pH 7,8) durante 24 horas a 4°C (pH final del extracto, 7,7). El extracto se centrifuga y se dializa extensivamente en un aparato de diálisis Visking de 18/32 pulgadas (14,29 mm) de diámetro contra seis cambios de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,002 M y finalmente contra agua destilada. La solución en el saco de diálisis se clarifica por centrifugación y se seca por congelación.

372271



1                   Se prepara una solución del material de polen dia-  
lizado seco a una concentración de 4 mg/ml en Solución A.  
(véase Ejemplo 1) y se centrifuga para separar las tra-  
5                   zas de materia insoluble. El procedimiento para el trata-  
miento con formaldehído de una parte alícuota de esta so-  
lución (12,0 ml) sigue el mismo camino que el descrito  
en el Método 1b (Ejemplo 1). En este caso, la concentra-  
ción total de sólidos del polen en la mezcla de incuba-  
ción es de 2,0 mg/ml; la concentración de formaldehído  
10                  es 0,36 M como en el Método 1b. Esta preparación será des-  
crita como "alérgeno formalinizado normal" de extracto  
de polen de herbáceas mixto, dializado.

EJEMPLO 6

15                 En lugar del extracto herbáceo mixto dializado  
del Ejemplo 5 se utiliza una mezcla de materias del po-  
len de herbáceas dializado conteniendo en peso 3 partes  
de pie de gallo (Dactylis glomerata), 3 partes de alfal-  
fa (Phelum pratense), 2 partes de grama de olor (Antho-  
xanthum odoratum), 1 parte de espiguilla de caña liso  
20                 (Poa pratensis) y 1 parte de heno fino (Agrostis palus-  
tris). En otros aspectos, todas las condiciones de reac-  
ción y concentraciones de sustancias reaccionantes son  
iguales a las descritas en el Ejemplo 5.

EJEMPLO 7

25                 Se obtiene una preparación de alérgeno formalini-  
zado con lisina a partir de la solución de materias del  
polen de herbáceas mixto dializado descrita en el Ejem-  
plo 6, por incubación en presencia de formaldehído  
0,36 M y L-lisina 0,1 M, utilizando un procedimiento aná-  
30                 logo al descrito en el Ejemplo 2, Método 2b. La concen-



1 tración de materias del polen en la mezcla de incubación  
es de 2 mg/ml como en el Ejemplo 6.

EJEMPLO 8

5 Se prepara un extracto dializado del polen de  
nogal negro de California (Juglans californica) y se hace  
reaccionar con formaldehído de forma análoga al extracto  
de polen de herbáceas dializado del Ejemplo 5.

EJEMPLO 9

10 Se prepara un extracto dializado del polen de  
olmo siemprevivo chino (Ulmus parvifolia) y se hace reac-  
cionar con formaldehído de manera análoga al extracto de  
polen de herbáceas dializado del Ejemplo 5.

EJEMPLO 10

15 Se prepara un extracto de una preparación cruda  
del ácaro del polvo doméstico (Dermatophagoides pteronyssi-  
nus) cultivado en escamas de piel humana y extracto de le-  
vadura y se dializa de forma similar a la descrita para  
el extracto de polen de herbáceas del Ejemplo 5. Excepto  
la sustitución del extracto de polen de herbáceas diali-  
20 zado por extracto de ácaros dializado (2 mg/ml), todas las  
condiciones de reacción y las concentraciones de sustancias  
reaccionantes son las mismas que en el Ejemplo 5.

EJEMPLO 11

25 El Grupo I del vallico de los Métodos 1b y 2b,  
antes descritos, se sustituye por ovoalbúmina (cristali-  
zada 3 veces, de huevos de gallina). La reacción con for-  
maldehído se realiza en la forma antes descrita.

30 Se examinan las propiedades alergénicas y anti-  
génicas de los alérgenos formalinizados y se comparan con  
las propiedades respectivas de los alérgenos nativos de

372271



OCT. 1968

1 los cuales derivan.

5 Las propiedades alergénicas se estudian cualita-  
tivamente mediante ensayos de piel rascada en gran número  
de seres humanos alérgicos, semi-cuantitativamente por en-  
sayo de piel intradérmico y ensayo directo bronco-provoca-  
10 tivo en varios seres humanos alérgicos y cuantitativamente  
midiendo la histamina liberada de suspensiones de leucoci-  
tos humanos (aislados de unos 15 individuos alérgicos di-  
ferentes), después del tratamiento con alérgenos formalini-  
zados o nativos.

15 Se estudiaron dos aspectos de antigenicidad cru-  
zada entre alérgenos formalinizados y nativos; a saber,  
(i) propiedades reactogénicas cruzadas: capacidad de un  
alérgeno formalinado para combinarse con antisueros pro-  
ducidos (en conejos) frente al alérgeno nativo y (ii) pro-  
20 piedades inmunogénicas cruzadas: capacidad del alérgeno  
formalinizado para inducir la formación (en cobayas) de  
anticuerpos que bloqueen la liberación de histamina alér-  
gica inducida por alérgenos nativos por parte de los leu-  
cocitos aislados de seres humanos alérgicos y que reaccio-  
nen cruzadamente con los alérgenos nativos en ensayos ta-  
les como anafilaxis cutánea pasiva (ACP) en cobayas nor-  
males. Con relación a la determinación cuantitativa de la  
25 existencia de propiedades inmunizantes deseadas en un  
alérgeno formalinado, el bloqueo de la liberación de  
histamina alérgica mediatizada con alérgeno por parte de  
leucocitos humanos constituye un ensayo crítico.

RESULTADOS

30 Se ha hallado que los alérgenos formalinizados  
de este invento han perdido prácticamente las propiedades

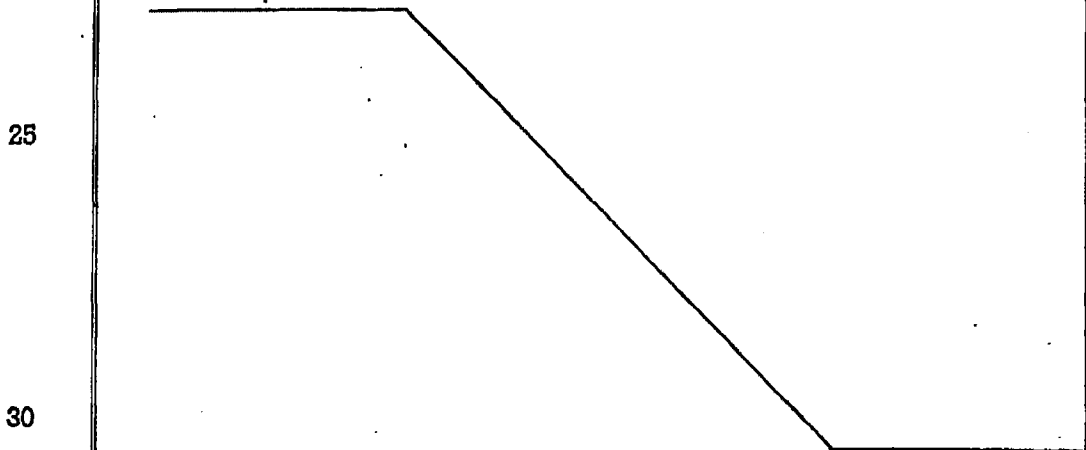
372271



1 alergénicas, pero han retenido en alto grado las propie-  
dades antigénicas (incluidas las propiedades inmunizan-  
tes deseadas) del alérgeno nativo. La pérdida de alergenici-  
5 dad varía de acuerdo con el individuo ensayado, la pre-  
sencia o ausencia de aditivos en el alérgeno formaliniza-  
do y el tipo de ensayo de alergenidad empleado, con inter-  
valos que oscilan entre una alergenidad en el alérgeno  
formalinizado de unas 200 a 1.000.000 de veces menor  
(comúnmente de 1000 a 10.000 veces menor) que en el alér-  
10 geno nativo. La antigenicidad cruzada entre el alérgeno  
formalinizado y el alérgeno nativo es normalmente de 20  
a 100 %. En muchos casos, las propiedades inmunizantes  
deseadas del alérgeno formalinizado con respecto al alér-  
geno nativo han sido retenidas en un 60-100 %.

15 Por lo tanto, se ha hallado que los alérgenos  
formalinizados de este invento son muy superiores a los  
alérgenos nativos para uso en inmunoterapia humana alér-  
gica, ya que la relación entre las propiedades inmunizan-  
tes deseadas y la alergenidad ha sido aumentada muy  
20 considerablemente.

En resumen, la Patente de Invención que se soli-  
cita deberá recaer sobre las siguientes:



372271



OCT. 1966

- REIVINDICACIONES -

1

1. Un método para la producción de un alérgeno formalinado de baja actividad alérgica en los seres humanos alérgicos y capaz de inducir en los mamíferos la formación de anticuerpos de bloqueo contra el alérgeno nativo en cantidades importantes, cuyo método consiste en tratar un extracto acuoso de un material que contenga dicho alérgeno nativo con una solución diluida de formaldehído en un ambiente no fenólico e incubar el mismo.

5

10

2. Un método para la producción de un alérgeno formalinado de baja actividad alérgica en los seres humanos alérgicos y capaz de inducir en los mamíferos la formación de anticuerpos de bloqueo contra el alérgeno nativo en cantidades importantes, que consiste en tratar un extracto acuoso de un material que contenga dicho alérgeno nativo con una solución diluida de formaldehído y por lo menos un aditivo constituido por un compuesto alifático que contenga como mínimo un grupo funcional amino, amido o guanidino o combinaciones de los mismos, capaz de reaccionar con formaldehído o con un radical aminometil e incubar el mismo.

15

20

25

3. Un método para la producción de un alérgeno formalinado de baja actividad alérgica en los seres humanos y capaz de inducir en los mamíferos la formación de anticuerpos de bloqueo contra el alérgeno nativo en cantidades importantes, cuyo método consiste en tratar un extracto acuoso de un material que contenga dicho alérgeno nativo, del que se han separado las sustancias no alérgicas de bajo peso molecular, con una solución diluida de formaldehído en un ambiente no fenolico e incubar el mismo.

30

372271



ACT. 1968

1                   4. Un método según las Reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que el material que contiene alérgeno es un extracto acuoso de una sustancia del polen de las hierbas.

5                   5. Un método según las Reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que el material que contiene alérgeno contiene una preparación de alérgeno del polen de las hierbas del Grupo I.

10                   6. Un método según las Reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que el material que contiene alérgeno es un extracto acuoso de una sustancia de polen de malas hierbas.

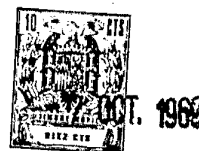
7. Un método según las Reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que el material que contiene alérgeno contiene Antígeno E del polen de la ambrosía.

15                   8. Un método según las Reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que el material que contiene alérgeno es un extracto acuoso de una sustancia del polen de los árboles.

20                   9. Un método según las Reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que el material que contiene alérgeno es un extracto acuoso que contiene ácaros del polvo doméstico o sus residuos.

10. Un método según las Reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que el material que contiene alérgeno es una preparación de alérgeno purificada.

25                   11. Se reivindica por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "UN METODO PARA LA PRODUCCION DE UN ALERGENO FORMALINIZADO DE BAJA ACTIVIDAD ALERGENICA".



372271

1

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva, que consta de veintiocho páginas mecanografiadas.

5

Madrid, 7 Octubre 1969

BERNARDO UNGRIA

p.p.

A handwritten signature in dark ink, appearing to be "B. Ungria", written over a horizontal line.

10

15

20

25

30