



372843

372843

SECCION TECNICA	
CLASIFICACION I. P. C.	
CLASE	A-61
SUBCLASE	K

# MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un.a

## PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: BEECHAM GROUP LIMITED

RESIDENCIA: Beecham House, Great West Road, BRENT-FORD, Middlesex, Inglaterra

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN MATERIAL ALERGENICO MODIFICADO".

Prioridad: Patente británica n.º 50645/68 del 25-10-68

372843



1969

1 El presente invento se refiere a agentes desensibilizantes o inmunizantes que son útiles en el tratamiento de los estados hipersensibles o alérgicos y a un método para su preparación.

5 Es sabido que algunos individuos son alérgicos o hipersensibles a ciertos materiales alergénicos, como pólenes, polvo doméstico, piel de gato, cereales y huéspedes de otras sustancias comunes. Estos individuos pueden sufrir molestias agudas como resultado de sus condiciones alérgicas que se pueden manifestar en enfermedades tales como asma, fiebre del heno, eczema, dermatitis y jaqueca. En consecuencia, se continúa trabajando para encontrar tratamientos adecuados que alivien el sufrimiento del paciente alérgico.

15 Una técnica que ha sido utilizada en el pasado en el tratamiento de los estados alérgicos es la llamada terapia de "desensibilización". El paciente que sufre dicha terapia recibe dosis gradualmente aumentadas y administradas repetidamente de un extracto del material o materiales alergénicos particulares a los que es sensible. Al final de un curso de tratamiento, la resistencia natural del paciente al alérgeno normalmente ha aumentado mucho; posiblemente como resultado de la acumulación de anticuerpos en su organismo, estimulada por el extracto administrado.

25 Como se observará, esta terapia de desensibilización adolece de ciertos inconvenientes, de los cuales no es el menor la posibilidad de que pueda ser administrada inadvertidamente una dosis peligrosamente elevada del alérgeno, produciendo una reacción anafiláctica general en el

30

372843



OCT. 1969

1            paciente. Se ha sugerido que este problema se solucio-  
naría si fuera posible modificar el material alergéni-  
co de tal forma que su alergenicidad se redujera con  
respecto a sus propiedades desensibilizantes y/o inmu-  
5            nizantes. En otras palabras, si un material alergénico  
pudiera hacerse inofensivo o por lo menos bastante me-  
nos perjudicial para el paciente sensible, reteniendo  
al mismo tiempo su capacidad de estimular la producción  
de anticuerpos, entonces podría eliminarse uno de los  
10           muchos inconvenientes de la terapia de desensibiliza-  
ción.

            De acuerdo con el presente invento, se proporcio-  
na un procedimiento para la preparación de un material  
alergénico modificado, que consiste en tratar el mate-  
15           rial alergénico con un haloformiato de fórmula  $XCOOR$ ,  
donde X es flúor, cloro, bromo o yodo y R es un grupo  
alifático, aromático, arilalifático o heterocíclico  
que puede llevar o no sustituyentes, a un pH compendi-  
do entre 1 y 7 y recuperar el material alergénico modi-  
20           ficado resultante.

            Por el término "material alergénico" entendemos  
cualquier producto que dé lugar a una reacción alérgica  
en un paciente que sea sensible a dicho material. Como  
ejemplos de materiales alergénicos comunes se encuen-  
25           tran los pólenes, como los presentes en la alfalfa,  
vallico y pie de gallo, polvo doméstico, moho, pelo ani-  
mal o pieles y tejidos, pero son conocidos otros muchos  
ejemplos.

            En una realización preferida del invento, la frac-  
30           ción proteínica de un extracto, generalmente acuoso, del

372843



OCT. 1959

1 material alergénico es tratado con el haloformiato al pH  
especificado y después el producto es recuperado.

5 De preferencia, el haloformiato es un cloroformiato y más especialmente un cloroformiato de hidrocarbilo, tal como cloroformiato de alquilo, arilo o aralquilo.

10 Como ejemplos de haloformiatos de alquilo adecuados pueden mencionarse los haloformiatos de alquilo de 1 a 8 átomos de carbono en la cadena alquílica, pudiendo esta última ser lineal o ramificada, v.g. metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo y terc-butilo.

15 El término "alquilo" comprende los grupos cicloalquilo y un haloformiato de cicloalquilo adecuado es un haloformiato de ciclohexilo, particularmente el cloroformiato de ciclohexilo.

El término "alquilo" incluye los grupos alquilo no saturados así como los saturados y un ejemplo de un haloformiato no saturado adecuado es el  $\text{CH}_2=\text{CHO}-\text{CO}-\text{Cl}$ .

20 Como ejemplos de haloformiatos de arilo adecuados que pueden ser utilizados en el procedimiento del presente invento mencionaremos los haloformiatos de fenilo y el haloformiato de naftilo.

25 Como ejemplos de haloformiatos de aralquilo adecuados pueden mencionarse los haloformiatos de aralquilo que contienen de 1 a 8 átomos de carbono en la cadena alquílica, especialmente los haloformiatos de bencilo y en particular el cloroformiato de bencilo.

30 Un artículo titulado "The Chemistry of Chloroformates" por Matyner, Kurkijy y Cotter en Chemical Reviews, 1964, 54, contiene una lista conveniente de la mayoría

372843



1969

1 de los cloroformatos que han sido registrados en la bibliografía.

5 Como regla general, las proteínas alergénicas son bastante resistentes a la desnaturalización y normalmente pueden ser calentadas a temperaturas relativamente elevadas sin que tenga lugar la desnaturalización. Por lo tanto, el procedimiento de este invento puede tener lugar en una amplia gama de temperaturas, aunque en la práctica generalmente no será necesario o conveniente pasar de una temperatura de unos 100°C. En la práctica, preferimos efectuar la reacción a la temperatura ambiente, es decir a unos 20°C.

15 El pH al cual debe realizarse el procedimiento de este invento está comprendido entre 1 y 7 como se ha indicado anteriormente, aunque preferimos emplear un pH de 4 a 6 y preferiblemente alrededor de 5.

20 A un pH inferior a 4 aproximadamente, la reacción transcurre en apariencia con gran dificultad, mientras que a un pH superior a 6 la reacción transcurre de forma completamente satisfactoria solamente si el pH se reduce a un valor inferior a 6 poco después de iniciarse la reacción. Como se ha indicado anteriormente, preferimos tratar la fracción proteínica de un extracto alergénico acuoso con el reactivo haloformiato con objeto de producir el material alergénico modificado deseado. La fracción proteínica del extracto alergénico es obtenida normalmente extrayendo el material alergénico con un disolvente adecuado, generalmente acuoso, aunque pueden utilizarse extrayentes oleosos en algunos casos, en forma conocida, separando después el material no proteínico, por

25

30



372843

1 ejemplo por diálisis, precipitación o filtración de gel.  
Una descripción más detallada de algunas de las técnicas  
existentes puede encontrarse en un artículo de J.M.  
Newell en Journal of Allergy, Volumen 13, 1942, pág. 177-  
5 203, especialmente pág. 187. Es habitual purificar el  
extracto a fondo, por ejemplo mediante un tratamiento  
exhaustivo de diálisis.

10 Cuando se emplea un extracto acuoso de alérgeno,  
el haloformiato se agrega en general directamente al ex-  
tracto acuoso y la mezcla de reacción se agita fuertemen-  
te durante un cierto periodo de tiempo, en general alre-  
dedor de 15 minutos. Después la mezcla de reacción se  
deja en reposo mientras se deposita el precipitado inso-  
luble de material alérgico modificado. El producto aler-  
15 gónico modificado puede ser recogido entonces por centri-  
fugación. Es conveniente lavar el precipitado para sepa-  
rar las impurezas y esto puede realizarse lavando con  
una solución de urea, seguido de lavado con una solución  
de cloruro sódico.

20 Los materiales alérgicos modificados que son  
producidos por el procedimiento de este invento son casi  
invariablemente insolubles, siempre que el material de  
partida haya sido purificado adecuadamente para separar  
los contaminantes solubilizantes. Aunque este invento  
25 no debe ser limitado por ninguna teoría particular de la  
reacción producida, creemos que el haloformiato forma  
enlaces transversales o puentes entre grupos reactivos  
de moléculas de proteína del alérgeno distintas y tam-  
bién entre grupos reactivos de la misma molécula, es de-  
30 cir, la reticulación es intermolecular e intramolecular.



372843

1 El hecho de que los materiales alergénicos modificados  
sean principalmente insolubles puede ser atribuido a la  
formación de estos enlaces transversales y posiblemente  
al grado al que es purificada la proteína alergénica an-  
5 tes del tratamiento. Puedan producirse materiales aler-  
génicos modificados solubles en condiciones especiales,  
aunque preferimos emplear la variedad insoluble en el  
tratamiento de los pacientes alérgicos.

10 El presente invento también proporciona una pre-  
paración farmacéutica que comprende un material alergéni-  
co modificado preparado de acuerdo con el procedimiento  
de este invento antes descrito, en mezcla con un vehícu-  
lo parenteralmente aceptable. Los vehículos adecuados son  
15 las soluciones salinas isotómicas o reguladoras, vehícu-  
los oleosos y otras sustancias conocidas en la técnica.  
De preferencia el material alergénico modificado es in-  
soluble en agua.

20 El material alergénico modificado es administra-  
do generalmente por inyección subcutánea. Las dosis va-  
riarán de acuerdo con el estado alergénico del paciente.

25 En la administración parenteral a los animales del  
material alergénico modificado de este invento, se ha en-  
contrado que se forman niveles apreciables de anticuer-  
pos circulantes, siendo el anticuerpo específico para el  
material alergénico modificado. Los materiales modifica-  
dos ensayados no produjeron ninguna reacción anafiláctica  
en un elevado porcentaje de estos animales.

30 El invento será ilustrado ahora mediante los si-  
guientes ejemplos:

372843



1969

1

EJEMPLO 1

5

10

15

20

25

30

Se extrae un polen completo de alfalfa con 10 volúmenes de solución 0,001 M de bicarbonato amónico a pH 8, comenzando a 4°C, durante 2 días. El extracto filtrado es dializado exhaustivamente frente al mismo disolvente y la solución retenida se seca por congelación. Una porción de 300 mg de este material se disuelve en 10 ml de solución reguladora 0,2 M de acetato sódico a pH 7,0, manteniéndose el pH en este valor mediante la adición de solución de hidróxido sódico. Una pequeña cantidad de materia insoluble se separa por centrifugación. Se agregan 0,3 ml de cloroformiato de etilo y la mezcla se agita fuertemente durante 15 minutos a la temperatura ambiente y después se deja en reposo durante la noche. El precipitado se recoge por centrifugación, se lava cuatro veces en 15 ml de solución 8 M de urea y tres veces en 15 ml de solución al 0,9 % de cloruro sódico y finalmente se suspende en solución de cloruro sódico. El rendimiento calculado (a partir del peso seco de una parte alícuota) es de 100 mg. Cuando se inyecta en cobayas, este producto no libera ningún material antigénico, como se demuestra en el siguiente experimento.

Se sensibilizan pasivamente unos cobayas inyectando diluciones de antisuero de conejo de especificidad para el polen de alfalfa en la piel, como en un ensayo de anafilaxis cutánea pasiva.

Después de un periodo latente de 18 horas, se inyectan unas dosis del producto del polen de alfalfa tratado por vía subcutánea y se administra intravenosamente un colorante azul de forma que si el antígeno de la alfalfa

372843



1 fa reacciona con el anticuerpo en la piel, la reacción se observaría como un cardenal azul. Los resultados están tabulados en la Tabla I.

TABLA I

Alérgeno inyectado en cobayas por vía subcutánea	Dilución de antisuero de conejo	Medidas de los diámetros del cardenal en mm			
		1:10	1:50	1:250	1:1250
2,5 mg					
alfalfa 1,25 mg					
tratada 250 mg					
10 producto 125 mg					Negativo
alérgeno 32 mg					
alérgeno 10 mg					
	500 mg	> 30	> 30	> 30	28
15 alfalfa 100 mg		> 30	> 30	28	25
alfalfa 50 mg		18	+	-	-
alérgeno 10 mg		18	-	-	-

20 Puede observarse que no se produce ninguna reacción en los cobayas inyectados con el producto de polen tratado, mientras que los inyectados con 10 microgramos solamente del alérgeno de polen de alfalfa sin tratar dan una reacción positiva.

25 El producto es capaz de inducir la formación de anticuerpos del suero que reaccionan contra el extracto completo de polen de alfalfa, como se demuestra en el siguiente experimento.

Se inyectan seis cobayas con 2,5 mg del polímero del polen de alfalfa por vía subcutánea.

30 Al cabo de tres semanas, se realiza el siguien-

372843



1

te ensayo para demostrar que:

1. El producto de polen tratado ha estimulado la formación de anticuerpos en los cobayas y
2. Los anticuerpos son específicos del polen de alfalfa.

5

Se inyectan unas diluciones de alérgeno de polen de alfalfa por vía intradérmica en la piel de la espalda de los cobayas e inmediatamente después se administra intravenosamente un colorante azul. Se encuentra que una inyección de solamente 0,016 µg de alérgeno del polen de alfalfa de esta forma produce una reacción con formación de cardenal en la piel de 12 mm de diámetro. Esto demuestra que el polímero ha estimulado anticuerpos en los cobayas.

10

15

#### EJEMPLO 2

#### Preparación de un derivado insoluble de alérgeno con cloroformiato de etilo

20

Se disuelven 50 mg de un extracto de polen de pie de gallo parcialmente purificado en 5 ml de solución reguladora 0,2 M de acetato sódico a pH 5,3. Se añaden 5 ml de cloroformiato de etilo al 20 % en cloroformo y la mezcla se agita a la temperatura ambiente durante 2 horas. El precipitado se recoge por centrifugación, se lava tres veces con alcohol absoluto (15 ml) y tres veces con solución reguladora al 0,5 % de borato (15 ml) a pH 8,85 y finalmente se suspende en fenol/solución salina.

25

#### Prueba de alergenidad

30

La suspensión de polen insolubilizado, a una concentración de 1 mg/ml, se introduce por punción en

372843



1969

1 la piel de pacientes alérgicos sensibles a la hierba. Al  
mismo tiempo se pincha respectivamente otras zonas de la  
piel de los mismos pacientes con el material de partida  
y la mezcla de fenol/solución salina respectivamente. Al  
5 cabo de 10 minutos se miden las superficies de los car-  
denales y se expresan en la Tabla I en  $\text{mm}^2$ . Puede obser-  
varse que el material insolubilizado a veinte veces la  
concentración del material de partida posee menos del 1 %  
de su alergenicidad; la alergenicidad retenida es por lo  
tanto despreciable cuando se compara con la del material  
10 de partida.

Prueba de inmunogenicidad

13 El material insolubilizado y el material de par-  
tida respectivamente son emulsionados en auxiliar comple-  
to de Freud para dar unas concentraciones de 1 mg/ml.  
Unos grupos de cobayas son inyectados subcutáneamente con  
una u otra de las emulsiones (0,5 ml). Al cabo de 22 días  
se pela el pelo de los animales en los flancos y se reali-  
za una serie de inyecciones intradérmicas (0,5 ml) de una  
20 dilución en serie de extractos de polen de pie de gallo  
purificado, en las zonas afeitadas. Inmediatamente se in-  
yecta por vía intravenosa una solución al 5 % de azul cie-  
lo Pontamine (0,4 ml). Al cabo de 20 minutos se miden los  
diámetros de los cardenales y se registran en la Tabla II.  
25 Puede observarse que el material tratado con cloroformia-  
to de etilo produce anticuerpos que reaccionan con el ma-  
terial de partida.

30



372843

TABLA I

Pacien te nº	Extracto de polen de pie de gallo in solubilizado 1 mg/ml	Extracto de pie de gallo purifi cado 50 µg/ml	Fenol/sol. salina
1	1	20	0
2	4	46	0
3	1	7	1
4	3	42	2
Total	9	115	

TABLA II

Coba ya nº	Material inmuni- zante (0,5 mg)	Diámetro del cardenal (mm) para las canti- dades de extracto de polen de pie de gallo inyectado intradérmicamente					
		100 µg	10 µg	1 µg 10	0,1 µg	0,01 µg	0,001 µg
1	Extracto de polen	14	12	10	8	-	-
2	de pie de gallo	15	14	12	10	7	7
3	purifi- cado	12	11	10	7	6	-
4		14	12	10	10	8	-
5	Extracto de polen	14	12	9	7	-	-
6	de pie de gallo	14	12	8	-	-	-
7	insolu- biliza- do	14	12	10	8	-	-
8		14	12	9	-	-	-

EJEMPLO 3

Preparación de derivado insoluble de alérgeno con cloro-  
formiato de metilo

Se disuelven 50 mg de un extracto de polen de pie de gallo parcialmente purificado en 5 ml de solución reguladora 0,2 M de acetato sódico a pH 5,3. Se añaden 5 ml de cloroformiato de metilo al 20 % y la mezcla se agita a la temperatura ambiente durante 2 horas. El preci-

372843



1969

1 pitado se recoge por centrifugación, se lava tres veces en alcohol absoluto (15 ml) y tres veces en solución reguladora al 0,5 % de borato (15 ml) a pH 8,85 y finalmente se suspende en fenol/solución salina.

5 Prueba de alergenicidad

La suspensión de polen insolubilizado a una concentración de 1 mg/ml se pincha en la piel de pacientes alérgicos sensibles a la hierba. Al mismo tiempo se pinchan en otras zonas de la piel de los mismos pacientes el material de partida y la mezcla de fenol/solución salina respectivamente. La superficie de los cardenales se mide al cabo de 10 minutos y se expresan en la Tabla III en mm<sup>2</sup>. Puede observarse que el material insolubilizado a una concentración de 20 veces la del material de partida presenta menos del 1 % de su alergenicidad; la alergenicidad retenida es por lo tanto despreciable cuando se compara con la del material de partida.

TABLA III

Pacien te nº	Extracto de polen de pie de gallo in solubilizado 1 mg/ml	Extracto de pie de gallo purifi cado 50 µg/ml	Fenol/sol. salina
1	4	14	0
2	3	31	0
3	1	12	1
4	1	12	1
25 Total	9	69	

Prueba de inmunogenicidad

30 Se realiza como en el Ejemplo 2, a excepción de que el material insolubilizado y el material de partida son emulsionados hasta una concentración de 10 mg/ml.

372843



1. 1969

1

Los resultados se encuentran en la Tabla IV. Puede observarse que el material insolubilizado retiene la especificidad inmunizante del material de partida.

5

TABLA IV

Coba ya nº	Material inmuni- zante (5 mg)	Diámetro del cardenal (mm) para las cantidades de extracto de polen de pie de gallo inyectado intravenosamente					
		100 µg	10 µg	1 µg	0.1 µg	0.01 µg	0.001 µg
1	Extracto de polen de pie de gallo	14	13	10	-	-	-
2	de gallo	17	15	12	11	10	-
10	3 purificado	16	15	12	12	12	9
4		16	15	10	10	10	-
5	Extracto de polen de pie de gallo	14	12	8	-	-	-
6	de gallo	14	11	9	7	-	-
15	7 insolubilizado	12	11	8	-	-	-
8	do	12	10	7	-	-	-

10

15

EJEMPLO 4

Preparación de derivado insoluble de alérgeno con cloroformiato de benzoilo

20

Se disuelven 50 mg de un extracto de polen de pie de gallo parcialmente purificado en 5 ml de solución reguladora 0,2 M de acetato sódico a pH 5,3. Se añaden 5 ml de cloroformiato de benzoilo al 20 % en clorofórmico y la mezcla se agita a la temperatura ambiente durante 2 horas. El precipitado se recoge por centrifugación, se lava tres veces en alcohol absoluto (15 ml) y tres veces en solución reguladora al 0,5 % de borato (15 ml) a pH 8,85 y finalmente se suspende en fenol/solución salina.

25

30



372843

1

Prueba de alergenicidad

5

10

La suspensión de polen insolubilizado a una concentración de 1 mg/ml se pincha en la piel de pacientes alérgicos sensibles a la hierba. Al mismo tiempo, se pinchan en otras zonas de la piel de los mismos pacientes el material de partida y la mezcla de fenol/solución salina respectivamente. La superficie de los cardenales se mide al cabo de 10 minutos y se expresa en la Tabla V en mm<sup>2</sup>. Puede observarse que el material insolubilizado a una concentración de diez veces la del material de partida presenta menos del 1 % de su alergenicidad; la alergenicidad retenida es por lo tanto despreciable cuando se compara con la del material de partida.

TABLA V

15

20

<u>Pacien</u> <u>te</u> <u>Nº</u>	<u>Extracto de polen</u> <u>de pie de gallo in</u> <u>solubilizado</u> <u>1 mg/ml</u>	<u>Extracto de pie</u> <u>de gallo purifi</u> <u>cado</u> <u>100 µg/ml</u>	<u>Fenol/sol.</u> <u>salina</u>
1	2	30	2
2	0	20	0
3	0	21	0
4	0	23	0
Total	2	94	

25

Prueba de inmunogenicidad

30

Se realiza como en el Ejemplo 3; los resultados se encuentran en la Tabla VI. Puede observarse que el material insolubilizado retiene la especificidad inmunizante del material de partida.

372843



TABLA VI

1

Coba ya n <sup>o</sup>	Material inmuni- zante (5 mg)	Diámetro del cardenal (mm) para las canti- dades de extracto de polen de pie de gallo infectado intravenosamente					
		100 µg	10 µg	1 µg	0.1 µg	0.01 µg	0.001 µg
5	1 Extracto de polen de pie de gallo pu- rificado	14	14	10	10	9	7
	2	14	12	8	7	6	-
	3	12	11	10	9	7	-
10	4 Extracto de polen de pie de gallo in solubili- zado	13	10	10	8	-	-
	5	-	-	-	-	-	-
	6	11	10	7	-	-	-

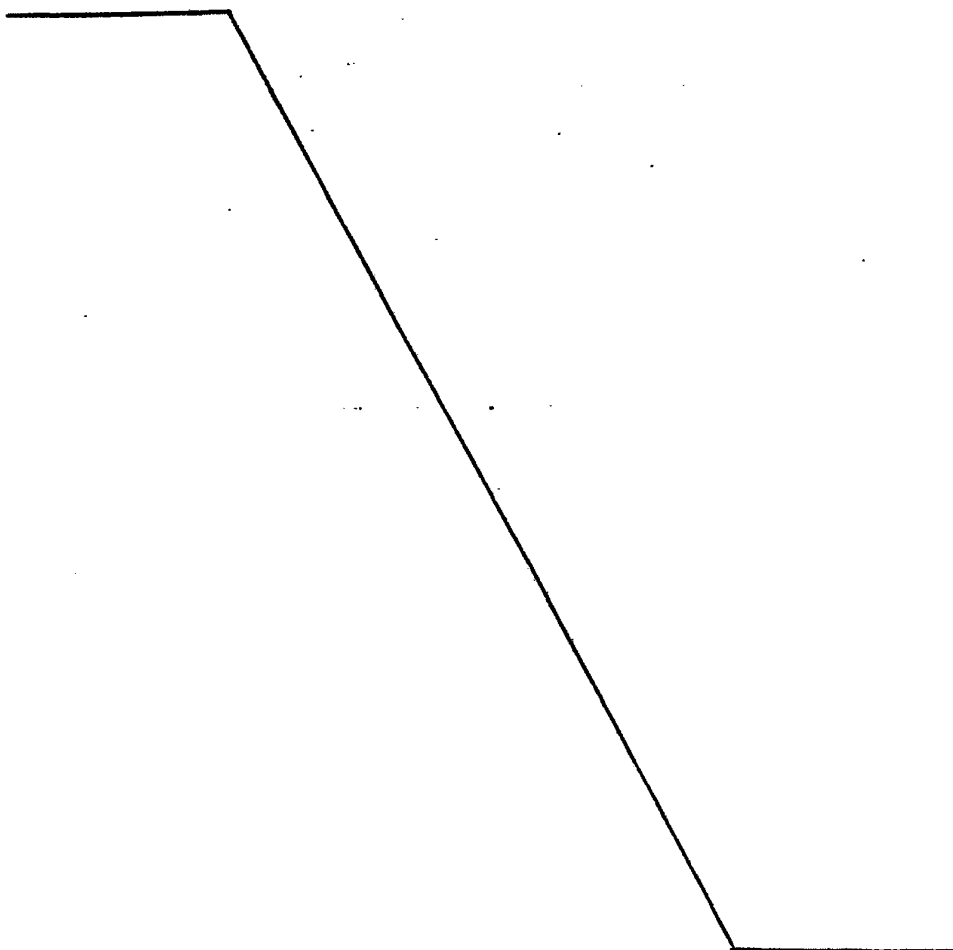
En resumen, la Patente de Invención que se soli-  
cita deberá recaer sobre las siguientes:

15

20

25

30



372843



1969

1

REIVINDICACIONES

5

1. Un procedimiento para la preparación de un material alergénico modificado, caracterizado por tratar el material alergénico con un haloformiato de fórmula XCOOR, donde X es flúor, cloro, bromo o yodo y R es un grupo alifático, aromático, arilalifático o heterocíclico que puede llevar o no sustituyentes, a un pH comprendido entre 1 y 7 y recuperar después el material alergénico modificado resultante.

10

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, caracterizado por tratar con el haloformiato la fracción proteínica de un extracto acuoso del material alergénico.

15

3. Un procedimiento según las Reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque el haloformiato es un cloroformiato.

20

4. Un procedimiento según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque el haloformiato es un haloformiato de alquilo, arilo o aralquilo.

25

5. Un procedimiento según las Reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque el haloformiato es cloroformiato de metilo, cloroformiato de etilo, cloroformiato de propilo, cloroformiato de butilo, cloroformiato de ciclohexilo, cloroformiato de fenilo o cloroformiato de bencilo.

30

6. Un procedimiento según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque el tratamiento con haloformiato se realiza a un pH comprendido entre 4 y 6.

7. Un procedimiento según la Reivindicación 6,

372843 2



1

caracterizado porque el pH empleado es alrededor de 5.

8. Un procedimiento según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque la temperatura empleada es alrededor de 20°C.

5

9. Un procedimiento según la Reivindicación 1, caracterizado por preparar un material alergénico modificado insoluble en agua por tratamiento de la fracción proteínica de un extracto acuoso de alérgeno con un cloroformiato de hidrocarbilo, por ejemplo un cloroformiato de alquilo, arilo o aralquilo, a un pH comprendido entre 1 y 7 y recuperar el material insoluble en agua.

10

10. Se reivindica por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN MATERIAL ALERGENICO MODIFICADO".

15

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

20

Madrid, 24 Octubre 1969

BERNARDO UNGRIA

P.P.

25

30