

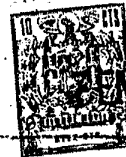
375202

P.- 43.574

U.S. 793.911

A61K 23/00, 27/00

375202



ENE 1970

Memoria descriptiva

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>C-12</u> <u>A-61</u>
SUBCLASE <u>K</u> <u>K</u>

para solicitar **PATENTE DE INVENCIÓN** por 20 años

a nombre de **MILERS LABORATORIES, INC.**

entidad / ~~de nacionalidad~~ norteamericana

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

por: " PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN EXTRACTO DE UNA SUSTANCIA ACTIVA CAPAZ DE PRODUCIR UNA RESPUESTA ALERGICA Y QUE CONTIENE PRINCIPIOS FISIOLÓGICOS ACTIVOS " (Clase Internacional A61k, C12k)

29.12.69

BAD ORIGINAL



1970

Se ha sabido desde hace mucho que diversos individuos, por contacto, y particularmente inhalación, de ciertas partículas o sustancias orgánicas que existen en la naturaleza y sintéticas, desarrollan reacciones alérgicas características tales como estornudos, activación de glándulas mucosas, edema local, erupciones en la piel, y vasodilatación. Estas reacciones son denominadas comúnmente "fiebre del heno", y aunque la reacción no es grave por sí misma usualmente, puede conducir a complicaciones, tanto fisiológica como psicológicamente. En un niño pequeño, la presencia constante de un estado alérgico causa a menudo deformaciones permanentes en el cuerpo, y particularmente en la estructura facial, por no mencionar los efectos psicológicos de un malestar siempre presente. Los estados asmáticos están también íntimamente relacionados con las reacciones alérgicas, y también pueden causar complicaciones más graves. La ciencia médica reconoce ahora a la enfermedad fiebre del heno como un estado serio que ha de tratarse con cuidado y concienzudamente.

Respecto a ello, también se ha sabido durante algún tiempo que los extractos de las sustancias alérgicas o antigénicamente activas antes indicadas, cuando son inyectados subcutáneamente, alivian estas reacciones alérgicas. El mecanismo fisiológico exacto de este tratamiento, conocido en la técnica como hiposensibilización, no ha sido aún explicado completa y satisfactoriamente. Sin embargo, se han avanzado diversas teorías que intentan explicarlo. Una de tales teorías supone la formación de los llamados anticuerpos de bloqueo o neutralizadores, causada por la inyección del extracto, mientras que otra teoría postula



1970

que tal tratamiento fomenta la formación de una unión entre el antígeno (o alérgeno) y el anticuerpo, en la circulación libre más que en el tejido de choque.

5 En la preparación de tales extractos alérgicos ha sido práctica común en el pasado simplemente extraer la sustancia orgánica ofensora, que causa la reacción alérgica, con un fluido de extracción acuoso, fisiológicamente aceptable, tal como una solución salina o una solución salina ligeramente alcalina. Tras separar del residuo el
10 fluido de extracción, esta solución que contiene los principios activos es esterilizada y simplemente usada como tal, desde luego tras hacer la dilución en serie apropiada de la misma. En tal método de extracción, el fluido de extracción fisiológicamente aceptable se elige y destina
15 a proteger la integridad estructural de la molécula antigénica.

Sin embargo, se ha desarrollado recientemente un método que produce un extracto alérgico más completo y eficaz. Este procedimiento está descrito en las patentes EE.UU. nº 3.148.121 y 3.248.122, y comprende brevemente
20 tratar una sustancia alérgica entera, sin quitar la grasa, con un fluido extractor constituido por una amina terciaria heterocíclica acuosa, separar del residuo la fase líquida que contiene los principios activos, despreciar
25 el residuo y, para eliminar de los principios activos la amina terciaria heterocíclica, añadir agua y una solución de alumbre al extracto, para precipitar del mismo los principios activos. Luego se lava el precipitado varias veces con agua, para eliminar toda la amina terciaria heterocíclica y el exceso de alumbre, y finalmente es suspendido
30

29.12.69

- 3 -

375202



1970

de nuevo en un vehículo fisiológicamente aceptable, tal como, por ejemplo, una solución tampón de fosfato.

Se creía inicialmente que la inclusión de la amina terciaria heterocíclica en el procedimiento producía simplemente un extracto alergénico más completo, dado que en el extracto estaban incluidos los constituyentes solubles en la amina, así como las fracciones proteicas y de carbohidrato solubles en agua. Sin embargo, ahora se cree que la naturaleza química reactiva de la amina terciaria heterocíclica puede causar una modificación estructural de la molécula antigénica, lo que produce un extracto para tratamiento alergénico que es eficaz y está relativamente exento de reacciones secundarias constitucionales.

Con todo lo eficaces y ventajosos que han resultado ser estos extractos alergénicos extraídos con amina terciaria heterocíclica y precipitados con alumbre (llamados en lo sucesivo extractos EPPA, ya que la piridina es la amina terciaria heterocíclica preferible usada en tal procedimiento), han aparecido en el curso de los años varias limitaciones. Respecto a ello, se halló que este tipo de extracto no podía ser usado para fines de ensayos en la piel, situación que los expertos en alergia clínica desean usualmente evitar, dado que prefieren usar el mismo extracto para diagnóstico y tratamiento. Con tal método usando el mismo extracto se asegura que el tratamiento implica exactamente el antígeno que haya resultado ser causa de la reacción alérgica de la piel. Se cree que la anterior limitación de los extractos EPPA es debida a la insolubilidad del precipitado y/o a la formación de un complejo entre el antígeno extraído con amina terciaria heterocíclica y



el alumbre usado en la precipitación del antígeno a partir del fluido de extracción.

Además, los parámetros de procedimiento para preparar antígenos EPPA usando los métodos de la técnica anterior son bastante largos, y el rendimiento deja mucho que desear, es decir, es del orden de aproximadamente 50% de las UNP (unidades de nitrógeno proteico) originalmente extraídas.

Además de las anteriores desventajas, también se han señalado algunas situaciones en las que ha sido eficaz un extracto del tipo acuoso, mientras que el extracto EPPA ha sido relativamente ineficaz, y viceversa.

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

Otro objeto es proporcionar un procedimiento mejorado para preparar extractos para ensayos alergénicos, y extractos para tratamiento de larga acción, usando un método común de extracción de antígeno.

Aún otro objeto es proporcionar un método de extracción acuosa y con disolvente orgánico combinados, con el que se recupera en su tratamiento sustancialmente todo el material antígeno.

Estos y otros objetos que serán evidentes por la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas, se consiguen: (1) extrayendo la sustancia alergénicamente activa con un fluido de extracción acuoso; (2) separar el fluido de extracción acuoso, que contiene los principios activos solubles en agua, del material insoluble en él

375202



RECEIVED 1970

5 contenido; (3) someter el material insoluble a extracción con un disolvente orgánico como fluido de extracción; (4) separar el disolvente orgánico, fluido de extracción, del material insoluble en él contenido; (5) separar del disolvente orgánico los principios activos contenidos en el disolvente orgánico; y preferiblemente (6) combinar los principios activos solubles en agua con los principios activos solubles en disolvente orgánico.

10 El procedimiento según la presente invención es aplicable a todas las sustancias alérgicamente activas, tanto de origen natural como preparadas sintéticamente. Entre tales sustancias se incluyen los polvos, tal como el polvo ordinario que se halla en los hogares y se recoge con aspiradoras, y el polvo que se halla en instalaciones de manufactura, tal como serrín, epiteliales, 15 tales como caspa de gato, perro, caballo y conejo; plumas, tales como las de ganso y pollo; semillas, tales como la semilla de algodón y capoc; insectos y emanaciones de insectos, tales como abejas, crabrones y mosquitos; 20 polen de árboles, hierbas y malas hierbas, tales como ambrosía, dactilis, arce, álamo; mohos tales como Aspergillus niger y Alternaria; productos químicos sintéticos complejos, tales como antibióticos, y similares.

25 Inicialmente, la sustancia alérgicamente activa es extraída con un fluido de extracción estrictamente acuoso. Este método inicial de extracción es el mismo que se usa para preparar los extractos alérgicos acuosos de la técnica anterior, e implica simplemente poner en contacto la sustancia alérgicamente activa con agua o un 30 fluido de extracción acuoso tamponizado o isotónico. Entre

375202



976

tales fluidos de extracción se incluyen la solución salina tamponizada o de Evan; solución de Coca, que comprende bicarbonato sódico, cloruro sódico y fenol; solución glicerosalina o de Stier; dextrosa o solución de Ungar; 5 soluciones tamponizadas con fosfato; solución salina fisiológica; solución de hidróxido sódico 0,1N; solución salina alcohólica; solución salina de dextrosa; etc. Tales soluciones son bien conocidas por los expertos en la técnica de tratar pacientes alérgicos, y en cualquier texto elemental sobre alergia se puede hallar una formulación 10 más completa, incluyendo la concentración de los ingredientes. Estas soluciones constituyen, todas, métodos suaves de extracción, y están destinadas a proteger la integridad estructural de la molécula de alérgeno o antígeno ofensor. Estas soluciones acuosas de extracción tienen 15 usualmente un pH ajustado de aproximadamente 6,5 a 8,0.

En la preparación de este extracto acuoso inicial del alérgeno, la sustancia natural, tras eliminar contaminantes físicos y pulverizar o subdividir, de forma 20 apropiada, si es necesario, es puesta en contacto con el fluido de extracción durante un periodo de aproximadamente 1 hora a 3 días o más, con agitación ocasional. Preferiblemente, la extracción se hace con agitación continua durante un periodo de 4 horas. También se puede quitar la 25 grasa del alérgeno antes de ponerle en contacto con el fluido acuoso de extracción; sin embargo, en ciertos casos esto, o es innecesario, o se cree que elimina material antígeno valioso.

Tras la extracción inicial con el fluido acuoso

375202



JUNE 1970

5 el material insoluble o residuo contenido en el fluido de extracción es separado del fluido acuoso por un procedimiento tal como centrifugación o filtración, y es lavado varias veces con agua o con fluido de extracción adicional.

10 El material insoluble o residuo que queda de la extracción inicial con el fluido acuoso es sometido luego a extracción y tratado con un disolvente orgánico, para eliminar del mismo los principios activos insolubles en agua. Aunque se puede usar un disolvente orgánico no acuoso, el fluido preferible para ser usado en esta extracción comprende una mezcla de una fase acuosa y una fase de disolvente orgánico miscible. Este último constituyente de este fluido de extracción puede comprender cualquiera

15 de numerosos disolventes orgánicos, tales como dioxano, 2-propanol, sulfóxido de dimetilo, etilendiamina, hidrazina, N-metilacetamida, piperidina, formamida, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, y otras sustancias orgánicas similares conocidas como disolventes de las sustancias proteicas. Preferiblemente, el disolvente orgánico

20 es una sustancia que contiene nitrógeno básico, tal como una amina, y aún más preferiblemente es una amina terciaria heterocíclica, tal como, por ejemplo, piridina, derivados de piridina tales como lutidina, quinolina, colidina, picclina y similares. El sistema disolvente orgánico puede comprender también una mezcla de disolventes, así como

25 contener una fase acuosa.

30 Aunque el efecto químico exacto de ciertos de los disolventes orgánicos, tal como la piridina, sobre la molécula de antígeno o la estructura de la misma, no se

375202



870

5 conoce con ninguna certeza, se cree que la naturaleza muy polar o básica de estos disolventes hace que reaccionen con los antígenos insolubles en agua, formando un compuesto con ellos, o que se altere de alguna manera la compleja estructura molecular de la proteína, carbohidrato, lipoproteína o polipéptido que forma la base de la naturaleza alérgica de la sustancia ofensora.

10 El segundo constituyente, opcional, del presente fluido de extracción, es decir, la fase acuosa, puede comprender simplemente agua destilada, o preferiblemente una solución acuosa salina y/o alcalina. Respecto a ello se puede emplear bicarbonato sódico, cloruro sódico, hidróxido sódico, tampones de fosfato, y similares. Cuando se usan en el fluido de extracción sustancias que tienen

15 naturaleza alcalina, tal como una amina terciaria heterocíclica, este segundo constituyente acuoso puede consistir también en un tampón que ajuste el pH en un valor más neutro. El pH resultante del fluido de extracción final, preparado mezclando la fase amina orgánica disolvente y

20 la fase acuosa, puede ser de aproximadamente 7,5 a 12,0 y preferiblemente se fija en un intervalo de pH más estrecho, de aproximadamente 9,0 a 12,0. Dado que ha resultado ser adaptable al presente procedimiento una amplia variedad de sustancias alérgicas, el pH del fluido de extracción, y la composición del mismo, pueden variar considerablemente. Por ejemplo, se sabe que el polen de ambrosía tiene alto contenido tóxico de grasa o lípidos, del que se ha sugerido que contribuye mucho a la naturaleza alérgica de esta sustancia. Al extraer este polen de mala

25 hierba se puede desear aumentar la relación entre fase

30

375202

29.12.69



1970

disolvente orgánico y fase acuosa, para asegurar la solubilidad de todo el material lípido. Sin embargo, se ha hallado que aproximadamente partes iguales de fase disolvente orgánica y fase acuosa producen un fluido de extracción que tiene amplia aplicabilidad.

Esta segunda etapa de extracción comprende usualmente mezclar el material insoluble con el fluido de extracción, y dejar que la mezcla permanezca a una temperatura de aproximadamente 20 a 25°C durante hasta aproximadamente 11 días, con o sin agitación. Luego se separa el residuo de la fase líquida, que en este momento contienen los principios alergénicos activos insolubles en agua o solubles en disolvente orgánico, tratados y solubilizados, dejando que sedimente el residuo insoluble, centrifugando la mezcla, o por un procedimiento de filtración tal como filtración con vacío. Luego se desprecia el segundo residuo.

En esta etapa del presente procedimiento, los principios activos insolubles en agua, solubles en disolvente orgánico, han de ser separados del disolvente orgánico o segundo fluido de extracción, que usualmente es fisiológicamente inaceptable. Este procedimiento de separación puede comprender la adición de un agente de precipitación tal como sulfato de aluminio y potasio, con lo que los principios activos son insolubilizados, o eliminar el disolvente por un procedimiento físico. El primer procedimiento es conocido, en la técnica, y está descrito en las patentes EE.UU. nº 3.148.121 y 3.148.122, antes mencionadas. Sin embargo, el procedimiento preferible es eliminar físicamente el disolvente orgánico de los principios

375202



ENE 1970

activos contenidos en él. Esto se puede conseguir usando cualquiera de los métodos conocidos para separar un sistema disolvente de una sustancia disuelta en él. Entre tales métodos se incluyen, entre otros, el secado por liofilización, secado por pulverización, secado por vacío, el uso de aparatos secadores rotatorios de vacío, y similares. Las temperaturas empleadas en esta etapa de secado pueden ser desde la mínima requerida para volatilizar el líquido de extracción, a la presión usada, hasta aproximadamente 85°C; siendo esta última la temperatura usada en un método de secado por pulverización en el que el antígeno termoclábil solo es sometido momentáneamente a tal temperatura extrema. La presión empleada en el sistema de volatilización depende análogamente del método específico usado, y puede variar desde la presión atmosférica, o ligeramente mayor, hasta aproximadamente 30 mm Hg, tal como se emplearía en una técnica de secado por liofilización.

Se ha hallado también que para eliminar los últimos vestigios del disolvente orgánico acuoso usado como fluido de extracción, es preferible dejar que el antígeno en partículas, sustancialmente seco, resultante de la etapa de volatilización, permanezca en un desecador de vacío durante aproximadamente 24 horas. Esta etapa se puede efectuar a temperatura ambiente o hasta aproximadamente 45°C.

El resultado del método anterior es una sustancia alergénica o antigénicamente activa, seca, en partículas, que ha sido tratado con el fluido de extracción muy reactivo, contiene sustancialmente todos los principios activos insolubles en agua de la sustancia ofensora ori-

375202

29.12.69



E. 1970

ginal, y como se verá más adelante, es un extracto anti-
génico extremadamente versátil desde el punto de vista del
uso final.

Otro medio de separar los principios activos in-
solubles en agua, del sistema disolvente orgánico, com-
prende el uso de diálisis. Cuando se usa piridina acuosa
como fluido de extracción, se ha hallado que es una ope-
ración relativamente fácil la eliminación de la piridina
del extracto usando este método.

Para recapitular el procedimiento de la presen-
te invención hasta este punto: se han preparado dos extrac-
tos separados, comprendiendo el primer extracto (1) un
sistema disolvente acuoso que contiene los principios ac-
tivos solubles en agua, y el segundo extracto (2) los
principios activos solubles en disolvente orgánico, tra-
tados, en cualquiera de varias formas, es decir, un alér-
geno insoluble en partículas, tal como el obtenido por
precipitación con alumbre, una solución acuosa del alérge-
no, tal como la obtenida por diálisis, o un polvo seco, tal
como el obtenido por volatilización del sistema disolven-
te orgánico.

Aunque los dos extractos separados podrían usar-
se individualmente, es preferible y más conveniente recom-
binar los dos extractos. Esto produce un extracto único
que tiene varias ventajas importantes, como se explicará
de forma completa más adelante. La recombinación variará
según la forma física del antígeno soluble en disolvente
orgánico, tras eliminar del mismo el disolvente orgánico.
Cuando el disolvente haya sido eliminado por diálisis, es
simplemente cuestión de analizar la solución restante, para



determinar su actividad y simplemente mezclar las porciones apropiadas de primer y segundo extractos. Tal como se usa en lo sucesivo, el extracto acuoso se denominará primer extracto, y los principios activos extraídos por el disolvente orgánico se denominarán segundo extracto.

Cuando el sistema disolvente orgánico ha sido eliminado por un procedimiento de volatilización, y los principios activos del segundo extracto están en forma de polvo seco, el método más simple para combinar los extractos primero y segundo es por simple reconstitución del polvo seco con el primer extracto. El extracto acuoso transparente resultante puede ser después esterilizado y normalizado, como se describirá más adelante.

Otra variación de la presente invención comprende combinar el primer extracto con el precipitado de aluminio insolubilizado del segundo extracto, preparado como se describe en las patentes EE.UU, nº 3.148.121 y 3.148.122. El resultado es una combinación de primer extracto acuoso y un segundo extracto precipitado con alumbre, de larga acción.

Se apreciará que la recombinación de los extractos primero y segundo puede efectuarse en amplio intervalo de relaciones, dependiendo del alérgeno concreto que se esté extrayendo, así como de la sensibilidad del individuo a los diversos antígenos de la sustancia ofensora.

En este momento se apreciará que el extracto combinado puede ser tratado más, para proporcionar un extracto alérgico en una forma elegida entre varias conocidas en la técnica de usar extractos alérgicos. Así la combinación puede ser simplemente diluida con un sistema



1970

5 disolvente acuoso fisiológicamente aceptable, y ser usada como extracto para ensayo en piel para diagnóstico y como extracto para tratamiento de hiposensibilización. Entre tales fluidos fisiológicamente aceptables se incluyen la solución salina o de Evan, la solución de Coca que compren-

10 de bicarbonato sódico, cloruro sódico y fenol, la solución glicerosalina o de Stier, la solución de dextrosa o de Ungar, soluciones tamponizadas con fosfato, y similares.

Un segundo método para seguir tratando el extrac-

15 to combinado, cuando está en forma completamente soluble, puede comprender la adición de un compuesto de aluminio tal como alumbre potásico o hidróxido de aluminio, para insolubilizar el antígeno y preparar una forma de dosis terapéutica que tenga propiedades de desprendimiento len-

20 to. Respecto a esto, se ha hallado inesperadamente que el precipitado insolubilizado o producto de adsorción, usando el extracto combinado tratado con disolvente acuoso y orgánico, de la presente invención, es muy superior a los antígenos precipitados con alumbre, de la técnica anterior, a partir de soluciones de los mismos por extracción estric-

25 tamente acuosa, de las que se ha eliminado la grasa. Mientras que tales preparaciones de la técnica anterior son de naturaleza gelatinosa, y farmacéuticamente inaceptables, las presentes preparaciones están en forma de partículas y suspensiones homogéneas, y tienen un aspecto farmacéuti-

camente elegante.

30 Se debe observar aquí que también se ha hallado inesperadamente que el rendimiento de precipitado a partir del extracto reconstituido, usando un compuesto de aluminio para insolubilizar el antígeno, es teatralmente mayor



1970

que al obtenido usando el procedimiento EPFA de la técnica anterior. Por ejemplo, se consiguen rendimientos de aproximadamente 40 a 50 % usando el procedimiento EPFA de la técnica anterior, mientras que en el presente procedimiento se obtiene un rendimiento de aproximadamente 70 a 90 %.

5 Este rendimiento se calcula tomando como base el nitrógeno proteico del fluido de extracción, en comparación con el nitrógeno proteico del precipitado insolubilizado o del producto de adsorción.

10 En este método de insolubilización puede añadirse una cantidad estequiométrica de aluminio, y simplemente extenderse la solución hasta la potencia apropiada, con fluido acuoso adicional; o bien se puede añadir un exceso de compuesto de aluminio, y retirar el precipitado o producto de adsorción de la parte que sobrenada, lavándolo y suspendiéndolo de nuevo en un fluido acuoso fisiológicamente aceptable.

15

Para asegurar que el extracto alergénico sea estéril, es práctica usual pasar una solución que contenga el extracto antigénico termolábil a través de un filtro bacteriano, llamado más comúnmente filtro Seitz, de microporos, Millipore (marca registrada) o de membrana. Tales métodos son bien conocidos en la técnica, y están descritos en diversos textos relativos a ella. En la presente invención, tal esterilización puede ser efectuada en cualquier fase líquida, siempre que el antígeno esté en solución. Por ejemplo, se puede esterilizar tanto el primer como el segundo extracto, o se puede esterilizar el extracto combinado final, por filtración. Desde luego, se apreciará que una técnica de secado por pulverización puede

20

25

30

29.12.69

375202



efectuar la esterilización del producto seco resultante, cuando se usa esta técnica para preparar el segundo extracto, y hacer innecesaria tal operación de filtración bacteriana.

5 Haciendo referencia ahora a la forma de uso de la presente preparación, tales técnicas son también bien conocidas en la técnica, y se pueden desglosar en dos categorías, es decir: (1) extractos para ensayo en la piel o diagnóstico, y (2) extractos de tratamiento o terapéuticos. Los extractos para ensayo o diagnóstico son de naturaleza primordialmente acuosa, y se usan poniendo una gota del extracto específico sobre la piel del individuo o animal que se está sometiendo a ensayo, y raspando la superficie de piel bajo el extracto. Si después de un período de tiempo más bien corto aparece una erupción o ronchas, es fuerte indicación de que el individuo es alérgico al antígeno concreto usado en el ensayo. Otro método de ensayo comprende la inyección intracutánea del extracto, y una observación subsiguiente de la formación de ronchas.

20 La segunda categoría de extractos, extractos de tratamiento o terapéuticos, puede comprender los extractos acuosos, precipitados con aluminio, de depósito y similares. El uso de tales extractos de tratamiento comprende la inyección subcutánea de una solución extremadamente diluída del antígeno, seguida por subsiguientes inyecciones diarias o semanales de concentración gradualmente en aumento. Debido al extremadamente amplio intervalo de sensibilidades de los diversos individuos, y a las diferentes características de desprendimiento de las diversas formas terapéuticas del antígeno, el régimen de tratamiento es decidido



110

por el clínico según los casos individuales.

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 la potencia deseada para el extracto final. El medio más común, aunque no enteramente satisfactorio, para normalizar el extracto, es el análisis de la solución para determinar las UMP o unidades de nitrógeno proteico. La deficiencia de este método, evidentemente, es que no todas las fracciones antigénicas del extracto son necesariamente proteicas, sino que pueden ser de carbohidratos, lípidos u otras moléculas no nitrogenadas. Respecto a la potencia del extracto, la práctica usual es normalizar extractos de tratamiento a desde aproximadamente 10 a aproximadamente 5000 UMP, según la correlación entre el carácter antigénico y el nitrógeno proteico. Los extractos de tratamiento se fijan usualmente a desde aproximadamente 10 UMP hasta aproximadamente 20.000 UMP, usándose los extractos de menor potencia en las fases iniciales de la terapia de hiposensibilización, y los extractos de mayor potencia como dosis de sostén o mantenimiento, a mayores intervalos de tiempo.

La presente invención es ilustrada por los siguientes ejemplos, pero no hay intención de limitar a ellos el ámbito del presente procedimiento o producto.

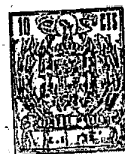
Ejemplo 1

Se eliminó la grasa de 50 g de polen de ambrosía corta (Ambrosia Artemisiifolia), cinco veces, con porciones de 250 ml de éter etílico. En cada operación de eliminación

29.12.69

- 17 -

375202



de grasa, el éter fué eliminado por decantación, tras dejar que sedimentara el residuo de polen. El éter que contenía la fracción lípida del polen fué despreciado, y el polen desengrasado fué secado bajo presión reducida. El polen desengrasado secado fué sometido luego a extracción con 350 ml de agua destilada, a 25° C, durante 5 horas, con agitación constante. El fluido de extracción fué filtrado luego a través de un embudo Buchner, y el material de polen insoluble en agua, que estaba sobre el filtro, fué lavado varias veces con agua adicional. El filtrado y los lavados fueron combinados luego, y analizados para determinar las UNP. Se halló que se extrajo con el fluido acuoso aproximadamente el 25 % del peso original del polen, o 122.800 UNP. Una nueva extracción con agua no consiguió eliminar del residuo de polen nada de principio activo adicional.

El residuo de polen insoluble en agua, de la primera extracción acuosa, fué luego sometido de nuevo a extracción con 350 ml de una solución 1 : 1 (vol : vol) de piridina y una solución de hidróxido sódico 0,1N, durante 3 días, a temperatura ambiente. El recipiente de extracción fué agitado ocasionalmente durante este intervalo de 3 días. Este segundo fluido de extracción fué filtrado luego a través de un embudo Buchner, fué dializado frente a agua destilada, usando una membrana celulósica, para eliminar la piridina, y fué centrifugado durante 15 min a 37.000 RCF. El líquido transparente que sobrenadaba, denominado segundo extracto, contenía 312.000 UNP y se determinó su contenido de material Antigénico E o del tipo de Antígeno E, mediante la técnica de Uechterlony, usando antisuero de conejo para el Antígeno E. Se observaron las líneas de precipitina



que indicaban la presencia de material tipo Antígeno E.
Se considera que este constituyente específico del polen de
Ambrosía es la causa primaria de las reacciones alérgicas
en los individuos sensibles a la ambrosía.

5 Luego se combinaron los extractos primero y se-
gundo en relación 1:1. El extracto combinado es útil en
el diagnóstico y tratamiento (hiposensibilización) de in-
dividuos alérgicos al polen de ambrosía.

Ejemplo 2

10 2 volúmenes de los extractos primero y segundo,
preparados como en el ejemplo 1, y combinados en relación
1:1, fueron tratados con 1,1 volúmenes de sulfato de alu-
minio y potasio al 2%, en H_2SO_4 0,25N. El precipitado que
15 se formó (rendimiento 72%) fué lavado con agua destilada
y suspendido de nuevo en tampón de fosfato. Esta suspensión
es útil como extracto alérgico de desprendimiento lento,
en el tratamiento de individuos susceptibles al polen de
ambrosía.

20

Ejemplos 3 a 7

Se repitió el ejemplo 1, salvo en que se susti-
tuyó el polen de ambrosía por polvo casero, polen de timo-
tea, plumas de pollo y polen de abedul. Los extractos com-
25 binados son útiles para diagnóstico de reacciones alérgicas
por ensayo en piel, o para terapia por hiposensibiliza-
ción.

30

La presente solicitud que corresponde a la pre-
sentada en los Estados Unidos de América el 24 de Enero de
1.969, con el número 793.911, se acoge a los beneficios del

375202

29.12.69



1970

artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

N O T A

10 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:

15 1ª.- Procedimiento para preparar un extracto de una sustancia activa capaz de producir una respuesta alérgica y que contiene principios fisiológicamente activos, el cual procedimiento comprende: A) extraer la sustancia activa con un fluido acuoso de extracción; B) separar el fluido acuoso de extracción, que contiene los principios activos solubles en agua, del material insoluble contenido
20 en él; C) someter a extracción el material insoluble con un disolvente orgánico como fluido de extracción; D) separar el disolvente orgánico usado como fluido de extracción, que contiene los principios activos solubles en disolvente orgánico, del material insoluble contenido en él; y E)
25 separar del disolvente orgánico los principios activos contenidos en el disolvente orgánico.

30 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, donde los principios activos solubles en agua son recombina-
dos con los principios activos solubles en disolvente orgánico.

375202



1970

3º.- Procedimiento según la reivindicación 1, donde el disolvente orgánico es una amina terciaria heterocíclica.

5 4º.- Procedimiento según la reivindicación 3, donde la amina terciaria heterocíclica se elige del grupo que consta de piridina, quinolina, lutidina, colidina y picolina.

5º.- Procedimiento según la reivindicación 4, donde la amina terciaria heterocíclica es piridina.

10 6º.- Procedimiento según la reivindicación 1, donde el disolvente orgánico es una combinación de agua y una amina terciaria orgánica.

15 7º.- Procedimiento según la reivindicación 1, donde el disolvente orgánico es una combinación de solución diluida de hidróxido sódico y piridina.

8º.- Procedimiento según la reivindicación 1, donde la separación de los principios activos y el disolvente orgánico se efectúa mediante diálisis.

20 9º.- Procedimiento según la reivindicación 1, donde la sustancia capaz de producir una respuesta alérgica es un inhalante.

25 10º.- Procedimiento según la reivindicación 9, donde la sustancia inhalante se elige del grupo de alérgenos que consta de pólenas, polvo casero, epitelio, mohos, materiales de insectos, semillas y plumas.

11º.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, donde se añade un compuesto de aluminio a los principios activos en solución, insolubilizando así dichos principios activos.

30 12º.- Procedimiento según la reivindicación 11,

29.12.69

- 21 -

375202



1970

donde el compuesto de aluminio es sulfato de potasio y aluminio.

13º.- Procedimiento para preparar un extracto de una sustancia activa capaz de producir una respuesta alérgica y que contiene principios fisiológicos activos.

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

Esta Memoria consta de veintidos hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 7 ENE 1970
P. A.

375202

Alberto de Ezaguirre
Por Poder
Alberto