

16



SECCION TECNICA
 CLASIFICACION I.P.C.
 CLASE 361
 SUBCLASE K

382486

No. 382.486

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: BEECHAM GROUP LIMITED

RESIDENCIA: Beecham House, Great West Road,

Brentford, Middlesex, Inglaterra.

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE

UN PREPARADO FARMACEUTICO A BASE DE UN

MATERIAL ALERGENICO MODIFICADO.

Prioridad: Patente	británica	n.º 39289/69	del 6.8.69
"	británica	" 23621	" 15.5.70
"	británica	" 23853	" 16.5.70

ML.

382486



-5 AGO

1

Este invento se refiere a agentes desensibilizantes o inmunizantes 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, pieles de gato, cereales y huéspedes de otras sustancias comunes. Estos individuos pueden experimentar molestias agudas como resultado de sus condiciones alérgicas que pueden manifestarse 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.

10

15

20

Una técnica que ha sido utilizada en el pasado en el tratamiento de las condiciones alérgicas es la llamada terapia de "desensibilización". El paciente sometido a esta terapia recibe repetidas veces dosis gradualmente crecientes de un extracto del material o materiales alergénicos particulares a los cuales es sensible. Al final de un curso de tratamiento, la resistencia natural del paciente al alérgeno en general ha aumentado considerablemente, posiblemente como resultado de la acumulación de anticuerpos en su organismo, estimulada por el extracto administrado.

25

30

Como se observará esta terapia de desensibilización adolece de ciertos inconvenientes, de los cuales no el más pequeño reside en las posibilidades de que pueda ser administrada inadvertidamente una dosis peligrosamente elevada de alérgeno, dando lugar a una reacción anafiláctica general en el paciente. Se ha sugerido que este problema se resolvería si fuera posible modificar el material alergénico

382486-5



1 de tal forma que su alergenicidad se redujera con relación
a sus propiedades de desensibilización y/o inmunización.
En otras palabras, si pudiera hacerse inofensivo el mate-
5 rial alergénico, o por lo menos menos perjudicial para el
paciente sensible, conservando al mismo tiempo su capaci-
dad para estimular la producción de anticuerpos, podría
eliminarse uno de los inconvenientes principales de la te-
rapia de desensibilización.

De acuerdo con el presente invento, proporcionamos
10 un procedimiento para la preparación de un material alérgico
modificado, cuyo procedimiento comprende la reacción
de un material alergénico con un polialdehído, una police-
tona, una carbo-di-imida, una epihalohidrina o un cianato
inorgánico, con la condición de que cuando se emplea un
15 cianato inorgánico la reacción se efectúa en condiciones
ácidas.

El material de partida alergénico que es modificado
de acuerdo con el procedimiento de este invento puede ser
obtenido a partir de una sustancia que contenga el alérge-
20 no, tal como polen, por extracción de la sustancia que con-
tiene el alérgeno con un disolvente adecuado, generalmente
acuoso, por un método conocido. El extracto alergénico ob-
tenido de esta forma está constituido principalmente por
proteína o glicoproteína, habitualmente contaminada con
25 hidrato de carbono libre. El extracto alergénico general-
mente es purificado después separando algunos de los conta-
minantes, v.g. por diálisis, precipitación o filtración de
gel, y el material alergénico purificado resultante puede
ser tratado a continuación de acuerdo con el procedimiento
30 del invento. Una descripción más completa de algunas de las

382486₅



1

técnicas existentes puede encontrarse en un artículo por J.N. Newell en Journal of Allergy, Vol. 13, 1942, págs. 177-203, especialmente pág. 187. En otro procedimiento de extracción útil, el material que contiene el alérgeno o un extracto acuoso del mismo se trata con fenol acuoso y el extracto alérgico se recupera de la fase fenólica.

5

Los reactivos polialdehído y policetona comprendidos dentro de los límites de este invento son los dialdehídos y dicetonas, así como los aldehídos y cetonas superiores. En general, entre las policetonas y los polialdehídos que pueden ser utilizados preferimos emplear los dialdehídos, por ejemplo los que contienen de 2 a 24 átomos de carbono aproximadamente en la molécula. El dialdehído puede ser alifático, cicloalifático, heterocíclico o aromático y puede tener una estructura de cadena lineal o ramificada, v.g. glioxal, 1,3-propanodial, 1,4-butanodial, glutaraldehído y α,ω -dialdehídos conteniendo de 14 a 24 átomos de carbono en la molécula. Un dialdehído especialmente preferido es el glutaraldehído.

10

15

20

El término "carbo-di-imida" en el sentido utilizado en esta memoria se refiere a compuestos de fórmula (I) y sales de los mismos:



25

donde R y R' son iguales o diferentes y cada uno de ellos representa un radical alifático, aromático o heterocíclico. Las carbo-di-imidas preferidas para uso en el presente invento son las solubles en agua, v.g. meto-p-toluen-sulfonato de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbo-di-imida.

30

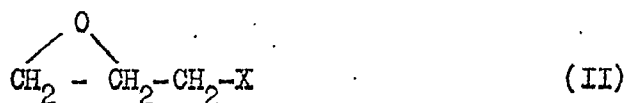
En el sentido utilizado aquí, el término "epihalo-hidrina" se refiere a compuestos de fórmula (II):

382486

25 AGO. 1938



1



5

donde X es un átomo de halógeno, especialmente bromo o cloro. Hemos encontrado que se obtienen buenos resultados con la epíclorohidrina.

10

Como ejemplos de reactivos ión cianato inorgánico se pueden mencionar los cianatos de metales alcalinos, especialmente el cianato potásico y los cianatos de metales alcalino-térreos.

15

Como regla general, las proteínas alergénicas son bastante resistentes a la desnaturalización y habitualmente pueden ser calentadas a temperaturas relativamente altas sin que tenga lugar dicha desnaturalización. Por lo tanto, el procedimiento de este invento puede tener lugar dentro de una amplia gama de temperaturas, aunque en la práctica generalmente no será necesario o conveniente pasar de una temperatura del orden de 100°C. Cuando se emplean dialdehídos, se prefiere operar a una temperatura inferior a 37°C y en la práctica preferimos efectuar la reacción a la temperatura ambiente en cada caso, por ejemplo alrededor de 20-25°C. Cuando se emplean dialdehídos, deben evitarse las condiciones de reacción extremas con objeto de reducir los subproductos indeseables como los formados por autocondensación de los aldehídos.

20

25

30

En el caso de los polialdehídos y policetonas, el pH al que debe realizarse el procedimiento de este invento no es crítico. Un intervalo de pH adecuado está comprendido entre 4 y 8 aproximadamente, prefiriéndose un pH alrededor de 5. Deben evitarse los valores muy bajos de pH

382486

25 AGO. 1955



1 con objeto de reducir la posible autocondensación de los
aldehídos.

5 Análogamente, en el caso de la epihalohidrina y
de las carbo-di-imidas, la reacción puede efectuarse a cual-
quier pH conveniente, aunque preferimos evitar los extremos
de pH. En el caso de la epihalohidrina, la reacción transcu-
rre suavemente a valores alcalinos de pH, adecuadamente al-
rededor de 8. En el caso de la carbo-di-imida, la reacción
se efectúa preferiblemente a valores ácidos de pH, adecuada-
mente alrededor de 5.

10 La reacción de la proteína alergénica con un ciana-
to inorgánico reactivo en el procedimiento de este invento
debe efectuarse a valores ácidos de pH, preferiblemente al-
rededor de 5.

15 Los reactivos utilizados en el procedimiento de es-
te invento se cree que actúan como agentes reticulantes del
material alergénico, formando enlaces intermoleculares y/o
intramoleculares. Así, aunque los materiales de partida aler-
génicos son solubles en agua, los productos alergénicos mo-
20 dificados del presente invento habitualmente solo son esca-
samente solubles. La solubilidad de los materiales alergéni-
cos modificados parece depender del grado de reticulación,
que a su vez puede variar de acuerdo con factores como la
naturaleza y la cantidad de reactivo utilizado y las condi-
25 ciones de reacción. No conocemos ningún método empírico pa-
ra la determinación previa de las características de solubi-
lidad de los productos alergénicos modificados y, por con-
siguiente, las variables de reacción necesarias para obtener
un producto con la solubilidad deseada deben ser determina-
30 das por el método de prueba y error. Sin embargo, se trata

382486

15 AGO



1 de una cuestión rutinaria y debe presentar pocas dificultades a los expertos en la técnica.

En otra realización de este invento, se proporciona una preparación farmacéutica que comprende el material
5 alergénico modificado preparado por el procedimiento antes descrito y un vehículo parenteralmente aceptable. Los vehículos adecuados son las soluciones salinas o reguladoras isotónicas, vehículos oleosos y otras sustancias conocidas en la técnica. Si se desea, puede incluirse un coadyuvante como
10 tirosina, alúmina, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio.

El material alergénico modificado se administra generalmente por inyección subcutánea. La posología variará de acuerdo con el estado alérgico del paciente.

15 En general, en la preparación de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con este invento, el material alergénico modificado debe tener una solubilidad reducida con respecto al material de partida, pero debe ser suficientemente soluble in vivo para proporcionar las características de liberación
20 deseadas. Encontramos que una forma de conseguirlo es utilizar un alérgeno modificado escasamente soluble absorbido sobre alúmina y materiales análogos. El grado de solubilidad del material alergénico reticulado es modificado por absorción sobre la alúmina y las características óptimas de liberación in vivo pueden ser conseguidas por experimentación rutinaria.
25

Por administración parenteral a animales de los materiales alergénicos modificados de este invento, se ha encontrado que se forman niveles apreciables de anticuerpos
30 circulantes, teniendo los anticuerpos especificidad cruzada

382486 15



1 para el material alérgico no modificado. Los materiales
modificados probados no producen ninguna reacción anafilác-
tica en los animales hipersensibles.

EJEMPLO 1

5 Preparación de derivado alérgico insoluble con glutaral-
dehído

10 Un extracto parcialmente purificado de polen de
pata de gallo, conteniendo 10 mg de proteína/ml en una so-
lución reguladora de acetato sódico 0,1 M, pH 5,3 (5 ml),
se trata con 5 ml de solución al 0,5 % de glutaraldehído y
se agita a la temperatura ambiente durante 30 minutos. El
precipitado que se forma se separa por centrifugación y se
lava con agua destilada para eliminar el material soluble
residual. Finalmente se suspende en fenol-solución salina
15 para su conservación.

Ensayo de alergenidad

20 La suspensión de polen insolubilizado a una con-
centración de 10 mg/ml se inyecta por punción en la piel
de pacientes alérgicos sensibles a la hierba. Al mismo tiem-
po, se realiza una punción con el material de partida y con
la mezcla de fenol-solución salina respectivamente en otras
zonas de la piel de los mismos pacientes. Las áreas del car-
denal se miden al cabo de 10 minutos y se expresan en la
Tabla I en mm². Puede observarse que el material insolubi-
lizado a 200 veces la concentración del material de partida
25 presenta escasamente la décima parte de su alergenidad:
por lo tanto, la alergenidad retenida es despreciable
cuando se compara con la del material de partida.

Ensayo de inmunogenicidad

30 El material insolubilizado y el material de par-

382486

25 AGO. 1955



1 tida respectivamente se emulsionan en coadyuvante comple-
 to de Freund para dar unas concentraciones de 1 mg/ml.
 Unos grupos de cobayas se inyectan subcutáneamente con una
 u otra de las emulsiones (0,5 ml). Después de 22 días, se
 5 esquilan los animales para quitar el pelo de los flancos
 y se realiza una serie de inyecciones intradérmicas (0,1 ml)
 de una dilución seriada de extracto de polen de pata de
 gallo purificado en las zonas esquiladas. Inmediatamente
 se inyecta por vía intravenosa una solución al 5 % de
 10 azul cielo Pontamine (0,4 ml). Transcurridos 20 minutos se
 miden los diámetros del cardenal y se registran en la Ta-
 bla II.

15 Puede observarse que el material tratado con glu-
 taraldehído no solamente produce anticuerpos que reaccio-
 nan con el material de partida sino que es un inmunizante
 más eficiente que dicho material de partida.

TABLA I

<u>Pacien- te nº</u>	<u>Extracto de polen de pata de gallo insolubilizado, 10 mg/ml</u>	<u>Extracto de pata de gallo purificado, 50 µg/ml</u>	<u>Fenol- Salina</u>
1	21	84	12
2	16	32	9
3	13	57	23
4	15	51	4
Total	65	224	48
Total me- nos la de fenol-sa- lina	17	176	-

20

25

30

382486

- 10 -



382486

TABLA II

Diámetro del cardenal (mm) para cada cantidad de extracto de polen inyectado intradérmicamente

	100 μ g	10 μ g	1 μ g	0.1 μ g	0.01 μ g	0.001 μ g
Nº del cobaya						
Material inmunizante, (0.5 mg)						
1	15	0	0	0	0	0
2	16	0	0	0	0	0
3	17	0	0	0	0	0
4	16	0	0	0	0	0
5	14	0	0	0	0	0
6	12	10	9	0	0	0
7	14	13	12	12	10	8
8	16	14	12	11	10	8
9	12	10	0	0	0	0
10	12	9	0	0	0	0

1

5

10

15

20

25

30

TABLA II

1	Nº del cobaya	Material inmuni- zante, (0,5 mg)	Diámetro del cardenal (mm) para cada intradérmicame		
			100 µg	10 µg	1 µg
5	1	Extracto de polen de pata de gallo purificado	15	0	0
	2		16	0	0
	3		17	0	0
	4		16	0	0
	5	Extracto de polen de pata de gallo	14	0	0
10	6	tratado con glu- taraldehido	12	10	9
	7		14	13	12
	8		16	14	12
	9		12	10	0
	10		12	9	0
15					
20					
25					
30					

2486



382486

TABLA II

Diámetro del cardenal (mm) para cada cantidad de extracto de polen inyectado intradérmicamente

<u>100 µg</u>	<u>10 µg</u>	<u>1 µg</u>	<u>0,1 µg</u>	<u>0,01 µg</u>	<u>0,001 µg</u>
15	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
12	10	9	0	0	0
14	13	12	12	10	8
16	14	12	11	10	8
12	10	0	0	0	0
12	9	0	0	0	0

382486



75 AUG

1

EJEMPLO 2

Preparación de alérgeno tratado con carbo-di-imida

5

En 5 ml de solución reguladora de borato 0,5 M, pH 8,85, se disuelven 50 mg de material que ha sido extraído de pólenes de varias hierbas y que ha sido parcialmente purificado por tratamiento con fenol acuoso y posterior precipitación de la proteína de la fase fenólica, con objeto de separar gran parte del hidrato de carbono y del material de bajo peso molecular. Se añaden lentamente 5 ml de una solución al 2 % de meto-p-toluensulfonato de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbo-di-imida y la solución se agita a la temperatura ambiente durante la noche. El precipitado que se forma se separa después por centrifugación, se lava tres veces con solución reguladora de borato y se suspende en fenol-salina.

10

15

Ensayo de alergenicidad

Una suspensión del material de ensayo y una solución del material de partida, ambas en fenol-salina y el propio medio, se inyectan respectivamente por punción en la piel de pacientes alérgicos sensibles a la hierba. Las áreas del cardenal se miden al cabo de 10 minutos.

20

Los resultados del ensayo de alergenicidad se encuentran en la Tabla III:

TABLA III

25

<u>Pacien</u> <u>te nº</u>	<u>Extracto de polen</u> <u>de hierbas mezcla</u> <u>das, 50 µg/ml</u>	<u>Extracto de polen</u> <u>de hierbas mezcla</u> <u>das, tratado con</u> <u>carbo-di-imida</u>	<u>Fenol-</u> <u>Salina</u>
1	12	0	0
2	3	2	0
3	8	0	0
4	12	0	0
5	15	0	0
6	<u>62</u>	<u>3</u>	<u>0</u>
Total	112	5	0

30



1 Las cifras indican las áreas de los cardenales (mm²).

Ensayo de inmunogenicidad

5 Unos cobayas duplicados son inmunizados por inyección subcutánea de una emulsión que contiene el material de ensayo en coadyuvante completo de Freund. Una serie similar de cobayas se inmuniza con el material de partida no modificado, con el mismo coadyuvante. Después de 21-8 días se esquilan los animales para quitarles el pelo de los flancos y en la zona esquilada se aplica una serie de inyecciones intradérmicas (0,1 ml) de una dilución seriada de material de
10 partida terminando con solución salina normal.

Inmediatamente se inyecta por vía intravenosa 0,4 ml de una solución al 5 % de azul cielo Pontamine. Transcurridos 20 minutos, se forman cardenales de color azul en algunos de los puntos de inyección intradérmica, indicando la
15 presencia de anticuerpos con especificidad para el material de partida. Los diámetros de los cardenales se miden y se registran.

Los resultados de los ensayos de inmunogenicidad se
20 encuentran en la Tabla IV:

25

30

382486



382486

TABLA IV

Diámetro del cardenal (mm) para cada cantidad de extracto de polen de hierbas mezcladas inyectado i.d.

Nº del cobaya	Material inmunizante, 5 mg	100 µg	10 µg	1 µg	0,1 µg	0,01 µg	0,001 µg
1	Extracto de polen de hierbas mezcladas	14	12	10	9	8	8
2		14	13	10	9	8	-
3		16	14	12	10	9	9
4		14	13	10	-	-	-
5	Extracto de polen de hierbas mezcladas tratado con carbo-di-imida	14	12	10	10	9	-
6		12	10	-	-	-	-
7		12	10	9	9	9	-
8		-	-	-	-	-	-
9		-	-	-	-	-	-

1

5

10

15

20

25

30

382486

TABLA IV

Nº del cobaya	Material inmunizante, 5 mg	Diámetro del cardenal (mm) para bas mezcladas			
		100 µg	10 µg	1 µg	
1					
5	1	Extracto de polen de hierbas mezcladas	14	12	10
	2		14	13	10
	3		16	14	12
	4		14	13	10
	5	Extracto de polen de hierbas mezcladas tratado con carbó-di-imida	14	12	10
10	6		12	10	-
	7		12	10	9
	8		-	-	-
15					
20					
25					
30					

86



382486

TABLA IV

Diámetro del cardenal (mm) para cada cantidad de extracto de polen de hierbas mezcladas inyectado i.d.

<u>100 μg</u>	<u>10 μg</u>	<u>1 μg</u>	<u>0,1 μg</u>	<u>0,01 μg</u>	<u>0,001 μg</u>
14	12	10	9	8	8
14	13	10	9	8	-
16	14	12	10	9	9
14	13	10	-	-	-
14	12	10	10	9	-
12	10	-	-	-	-
12	10	9	9	9	-
-	-	-	-	-	-

382486



1 Puede observarse en los resultados mostrados en
las Tablas III y IV que se producen niveles más altos de
anticuerpos por inmunización con el alérgeno modificado con
carbo-di-imida pero que la alergenicidad del material es des-
5 preciable.

EJEMPLO 3

10 En 5 ml de solución reguladora de fosfato 0,01 M,
se disuelven 50 mg de material que ha sido extraído de pó-
lenes de hierbas mezcladas y que ha sido parcialmente puri-
ficado para separar gran parte del hidrato de carbono y del
material de bajo peso molecular. Se añade lentamente 1 ml
de 1-cloro-2,3-epoxipropano y la mezcla se agita durante la
noche a la temperatura ambiente. El precipitado que se for-
ma se separa por centrifugación, se lava con solución regu-
15 ladora de fosfato y se suspende en fenol-salina.

Ensayo de alergenicidad

20 Una suspensión del material de ensayo y una solu-
ción del material de partida, ambas en fenol-salina y el
propio medio, se inyectan por punción respectivamente en la
piel de pacientes alérgicos sensibles a la hierba. Las áreas
del cardenal se miden al cabo de 10 minutos. Los resultados
de los ensayos de alergenicidad se encuentran en la Tabla V:

25

30

382486

-5 AB



TABLA V

1

<u>Pacien- te n°</u>	<u>Extracto de polen de hierbas mezcla- das, 50 µg/ml</u>	<u>Extracto de polen de hierbas mezcladas tra- tado con epíclorhidrí- na (1 mg/ml)</u>	<u>Fenol- Salina</u>
1	62	0	0
2	15	1	0
3	12	0	0
4	8	2	0
5	3	0	0
<u>6</u>	<u>12</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
Total	112	3	0

5

10

Las cifras indican las áreas del cardenal (mm²).

Ensayo de inmunogenicidad

15

Unos cobayas duplicados se inmunizan por inyección subcutánea de una emulsión que contiene el material de ensayo en coadyuvante completo de Freund. Una serie similar de cobayas es inmunizada con el material de partida no modificado utilizando el mismo coadyuvante. Después de 21-8 días, los animales se esquilan para quitarles el pelo de los flancos y se realizan en la zona esquilada una serie de inyecciones intradérmicas (0,1 ml) de una dilución seriada de material de partida terminando con solución salina normal.

20

Inmediatamente se inyectan por vía intravenosa 0,4 ml de una solución al 5 % de azul cielo Pontamine. Transcurridos 20 minutos, se forman cardenales de color azul en algunos de los puntos de inyección intradérmica, indicando la presencia de anticuerpos con especificidad para el material de partida. Se miden y registran los diámetros del cardenal. Los resultados del ensayo de inmunogenicidad se encuentran en la Tabla VI:

25

30

382486

382486

TABLA VI

Diámetro del cardenal (mm) para cantidad de extracto de polen de hierbas mezcladas inyectado i.d.

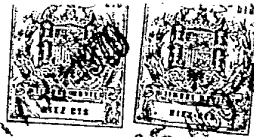
Nº del cobaye	Material inmunizante	100 µg	10 µg	1 µg	0,1 µg	0,01 µg	0,001 µg
1	Extracto de polen de hierbas mezcladas (5 mg)	14	13	10	-	-	-
2		16	14	12	10	9	9
3		14	13	10	9	8	-
4		14	12	10	9	8	8
5	Extracto de polen de hierbas mezcladas tratado con epinefrina (5 mg)	12	10	-	-	-	-
6		10	-	-	-	-	-
7		-	-	-	-	-	-
8		10	-	-	-	-	-
9	Extracto de polen de hierbas mezcladas (0,5 mg)	12	9	-	-	-	-
10		14	12	9	-	-	-
11		12	11	9	-	-	-
12		14	12	9	-	-	-
13	Extracto de polen de hierbas mezcladas tratado con epinefrina (0,5 mg)	10	8	-	-	-	-
14		-	-	-	-	-	-
15		10	8	-	-	-	-
16		-	-	-	-	-	-

382486

TABLA VI

Nº del cobaya	Material inmunizante	Diámetro del cardenal (mm) para cantidades inyectadas i.d.			
		100 µg	10 µg	1 µg	
1	Extracto de polen de hierbas mezcladas (5 mg)	14	13	10	
2		16	14	12	
3		14	13	10	
4		14	12	10	
5	Extracto de polen de hierbas mezcladas tratado con epíclorhidrina (5 mg)	12	10	-	
6		10	-	-	
7		-	-	-	
8		10	-	-	
9		Extracto de polen de hierbas mezcladas (0,5 mg)	12	9	-
10			14	12	9
11			12	11	9
12			14	12	9
13	Extracto de polen de hierbas mezcladas tratado con epíclorhidrina (0,5 mg)	10	8	-	
14		-	-	-	
15		10	8	-	
16		-	-	-	

2486



382486

TABLA VI

diámetro del cardenal (mm) para cantidad de extracto de polen de hierbas mezcladas inyectado i.d.

<u>0 µg</u>	<u>10 µg</u>	<u>1 µg</u>	<u>0,1 µg</u>	<u>0,01 µg</u>	<u>0,001 µg</u>
4	13	10	-	-	-
6	14	12	10	9	9
4	13	10	9	8	-
4	12	10	9	8	8
2	10	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-
2	9	-	-	-	-
14	12	9	-	-	-
2	11	9	-	-	-
14	12	9	-	-	-
10	8	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
10	8	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-



382486

382486

TABLA VII

Imunogenicidad del alérgeno tratado con epibromohidrina

Diámetro del cardenal (mm) para cada cantidad de extracto de polen de pata de gallo inyectado i.d.

Nº del cobaya	Material inmunizante		Diámetro del cardenal (mm)		
	10 µg	1 µg	0,1 µg	0,01 µg	0,001 µg
1	16	10	-	-	-
2	16	10	-	-	-
3	16	10	-	-	-
4	14	10	-	-	-
5	14	10	-	-	-
6	15	10	-	-	-

TABLA VIII

Alergenicidad del alérgeno tratado con epibromohidrina

Extracto de pata de gallo tratado con epibromohidrina, 100 µg/ml

Paciente nº	Extracto de pata de gallo 100 µg/ml	0	0	0	0	Tenol-salina
1	9	0	0	0	0	0
2	18	0	0	0	0	0
3	22	0	0	0	0	0
4	21	0	0	0	0	0
Total	70	0	0	0	0	0

1

5

10

15

20

25

30

382486

1

TABLA VII

Inmunogenicidad del alérgeno tratado con

Nº del cobaya	Material inmunizante	Diámetro del cardenal (mm) para ta de gallo iny		
		100 µg	10 µg	1 µg
1	Extracto de polen de pata de gallo (0,5 mg)	16	10	-
2		16	10	-
3		16	10	-
4	Extracto de pata de ga llo tratado con epibro mohidrina (0,5 mg)	14	10	-
5		14	10	-
6		15	10	-

10

TABLA VIII

Alergenicidad del alérgeno tratado con

Paciente nº	Extracto de pata de gallo 100 µg/ml	Extracto de polen de pata tratado con epibromohidrin
1	9	0
2	18	0
3	22	0
4	21	0
<u>Total</u>	<u>70</u>	<u>0</u>

20

25

30



382486

TABLA VII

irritogenicidad del alérgeno tratado con epibromohidrina

Diámetro del cardenal (mm) para cada cantidad de extracto de polen de pata de gallo inyectado i.d.

<u>100 µg</u>	<u>10 µg</u>	<u>1 µg</u>	<u>0,1 µg</u>	<u>0,01 µg</u>	<u>0,001 µg</u>
16	10	-	-	-	-
16	10	-	-	-	-
16	10	-	-	-	-
14	10	-	-	-	-
14	10	-	-	-	-
15	10	-	-	-	-

TABLA VIII

irritogenicidad del alérgeno tratado con epibromohidrina

Extracto de polen de pata de gallo
tratado con epibromohidrina, 100 µg/ml

Fenol-
Salina

0

0

0

0

0

0

0

0

0

0

382486



EJEMPLO 5

Preparación de alérgeno modificado con cianato

Un extracto acuoso de pólenes de hierbas mezcladas (agrostis, codeso, pata de gallo, cola de perro, avena falsa, cañuela, cola de zorro, centeno de las praderas, alfalfa, vernal y heno blanco) se purifica parcialmente por tratamiento con fenol acuoso seguido de precipitación de la proteína de la fase fenólica para separar la mayor parte del hidrato de carbono y de los materiales de bajo peso molecular. Se disuelven 50 mg de la proteína alérgica parcialmente purificada resultante en 5 ml de agua y el pH se ajusta a 8 mediante la adición de solución de hidróxido sódico. El pH se ajusta de nuevo a 5,0 con ácido acético, se agregan 0,2 g de cianato potásico y la mezcla se agita a la temperatura ambiente durante la noche. El precipitado que se forma se lava repetidas veces con solución reguladora de fosfato a pH 8 y después se suspende en fenol-salina.

Ensayo de alergenidad

Una suspensión del alérgeno modificado con cianato preparado anteriormente, una suspensión del extracto de alérgeno parcialmente purificado no modificado (ambas en fenol-salina) y el propio medio fenol-salina se inyectan por punción respectivamente en la piel de pacientes alérgicos sensibles a la hierba. Se miden las áreas del cardenal al cabo de 10 minutos y se expresan en la Tabla IX en mm². Puede observarse que el alérgeno modificado con cianato presenta una alergenidad despreciable frente al material no modificado.

382486



15 A

1

TABLA IX

<u>Paciente n°</u>	<u>Extracto de polen de hierbas mezcladas, 50 µg/ml</u>	<u>Extracto de polen de hierbas mezcladas tratado con cianato, 1 mg/ml</u>	<u>Fenol-Salina</u>
1	12	4	0
2	3	2	0
3	8	6	0
4	12	3	0
5	15	5	0
<u>6</u>	<u>62</u>	<u>24</u>	<u>0</u>
Total	112	44	0

5

10

Ensayo de inmunogenicidad

15

Unos cobayas duplicados se inmunizan por inyección subcutánea de una emulsión que contiene el alérgeno modificado con cianato en coadyuvante completo de Freund. Una serie similar de cobayas es inmunizada con el material de partida no modificado utilizando el mismo coadyuvante. Al cabo de 21-28 días, ambas series de animales son esquilados para eliminar el pelo de los flancos y se aplica en la zona esquilada una serie de inyecciones intradérmicas (0,1 ml) de una solución seriada del material de partida terminando con solución salina normal.

20

25

Inmediatamente se inyecta por vía intravenosa 0,4 ml de una solución al 5 % de azul cielo Pontamine. Transcurridos 20 minutos, se forman cardenales de color azul en alguno de los puntos de inyección intradérmica, indicando la presencia de anticuerpos con especificidad para el material de partida. De nuevo se miden los diámetros de los cardenales y se registran en la Tabla X. Puede observarse que el alérgeno modificado con cianato retiene la especificidad

30

382486



5 AGO

1 inmunizante del material de partida.

5

10

15

20

25

30



382486

382486

TABLA I

Diámetro del cardenal (mm) para cada cantidad de extracto de polen de hierbas mezcladas inyectada i.d.

Nº del cobaya	Material inmunizante	100 µg	10 µg	1 µg	0.1 µg	0.01 µg	0.001 µg
1	Extracto de polen de hierbas mezcladas (5 mg)	14	12	10	9	8	8
2		14	13	10	9	8	-
3		16	14	12	10	9	9
4		14	13	10	-	-	-
5	Extracto de polen de hierbas mezcladas tratado con cianato (5 mg)	12	9	7	-	-	-
6		12	9	7	-	-	-
7		10	-	-	-	-	-
8		12	-	-	-	-	-
9	Extracto de polen de hierbas mezcladas (0,5 mg)	14	12	9	-	-	-
10		12	11	9	-	-	-
11		14	12	9	-	-	-
12		12	9	-	-	-	-

1

5

10

15

20

25

30

382486

TABLA X

Nº del cobaya	Material inmunizante	Diámetro del cardenal (mm) para c bas mezcladas		
		100 µg	10 µg	1 µg
1	Extracto de polen de hier- bas mezcladas (5 mg)	14	12	10
2		14	13	10
3		16	14	12
4		14	13	10
5	Extracto de polen de hier- bas mezcladas tratado con cianato (5 mg)	12	9	7
6		12	9	7
7		10	-	-
8		12	-	-
9	Extracto de polen de hier- bas mezcladas (0,5 mg)	14	12	9
10		12	11	9
11		14	12	9
12		12	9	-
15				
20				
25				
30				

2486



382486

TABLA X

Diámetro del cardenal (mm) para cada cantidad de extracto de polen de hierbas mezcladas inyectada i.d.

<u>100 µg</u>	<u>10 µg</u>	<u>1 µg</u>	<u>0,1 µg</u>	<u>0,01 µg</u>	<u>0,001 µg</u>
14	12	10	9	8	8
14	13	10	9	8	-
16	14	12	10	9	9
14	13	10	-	-	-
12	9	7	-	-	-
12	9	7	-	-	-
10	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
14	12	9	-	-	-
12	11	9	-	-	-
14	12	9	-	-	-
12	9	-	-	-	-

382486



ES A

1

EJEMPLO 6

Con objeto de obtener la confirmación de los resultados de los ensayos biológicos, se repite el procedimiento del Ejemplo 5. Los resultados del ensayo de alergenicidad del alérgeno modificado se encuentran en la Tabla XI y los resultados de los ensayos de inmunogenicidad del alérgeno modificado con cianato están en la Tabla XII.

5

TABLA XI

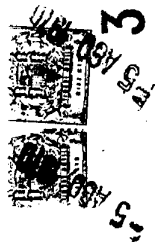
10	Paciente nº	Extracto de polen de hierbas mezcladas, 100 µg/ml	Extracto de polen de hierbas mezcladas tratado con cianato, 2 mg/ml	Fenol-Salina
	1	23	1	1
	2	6	0	0
	3	2	0	0
	<u>4</u>	<u>19</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
15	Total	50	1	1

Las cifras indican las áreas de los cardenales (mm²).

20

25

30



382486

382486

TABLA XII

Diámetro del cardenal (mm) para cada cantidad de extracto de polen de hierbas mezcladas inyectado i.d.

Nº del cobaya	Material inmunizante	100 µg	10 µg	1 µg	0,1 µg	0,01 µg	0,001 µg
1	Extracto de polen de hierbas mezcladas (5 mg)	12	10	9	8	-	-
2		12	10	7	-	-	-
3		12	10	8	-	-	-
4		12	10	9	-	-	-
5	Extracto de polen de hierbas mezcladas tratado con cianato (5 mg)	12	10	-	-	-	-
6		12	9	-	-	-	-
7		14	12	9	-	-	-
8		14	10	-	-	-	-
9	Extracto de polen de hierbas mezcladas (0,5 mg)	14	10	-	-	-	-
10		12	11	9	-	-	-
11		10	9	-	-	-	-
12		-	-	-	-	-	-
13	Extracto de polen de hierbas mezcladas tratado con cianato (0,5 mg)	12	11	8	-	-	-
14		12	-	-	-	-	-
15		10	-	-	-	-	-
16		-	-	-	-	-	-

1

5

10

15

20

25

30

382486

TABLA XII

Diámetro del cardenal (mm) para
bas mezcladas i

	Nº del cobaya	Material inmunizante	Diámetro del cardenal (mm) para bas mezcladas i		
			100 µg	10 µg	1 µg
5	1	Extracto de polen de hierbas mezcladas (5 mg)	12	10	9
	2		12	10	7
	3		12	10	8
	4		12	10	9
	5		12	10	-
10	6	Extracto de polen de hierbas mezcladas trata do con cianato (5 mg)	12	9	-
	7		14	12	9
	8		14	10	-
	9		14	10	-
	10	Extracto de polen de hierbas mezcladas (0,5 mg)	12	11	9
15	11		10	9	-
	12		-	-	-
	13		12	11	8
	14		12	-	-
	15		10	-	-
20	16	-	-	-	
25					
30					



382486

TABLA XII

Diámetro del cardenal (mm) para cada cantidad de extracto de polen de hierbas mezcladas inyectado i.d.

<u>100 µg</u>	<u>10 µg</u>	<u>1 µg</u>	<u>0,1 µg</u>	<u>0,01 µg</u>	<u>0,001 µg</u>
12	10	9	8	-	-
12	10	7	-	-	-
12	10	8	-	-	-
12	10	9	-	-	-
12	10	-	-	-	-
12	9	-	-	-	-
14	12	9	-	-	-
14	10	-	-	-	-
14	10	-	-	-	-
12	11	9	-	-	-
10	9	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
12	11	8	-	-	-
12	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-

3)

1



15 AGO

1

EJEMPLO 7

Tratamiento de extracto de polen con fenilglicoxal

Método

Una solución al 3 % de hidrato de fenilglicoxal disuelto en solución reguladora de fosfato 0,01 M, pH 8, se agrega sobre un volumen igual de 50 mg de material que ha sido extraído del polen de la pata de gallo y que, después de purificación por tratamiento con fenol, se ha disuelto en la misma solución reguladora. La reacción se efectúa a la temperatura ambiente durante 24 horas. El precipitado que se forma se lava repetidamente con solución reguladora de fosfato a pH 8 y después se suspende en fenol-salina.

10

Ensayo de alergenicidad

Una suspensión del material modificado con fenilglicoxal preparado anteriormente, una suspensión del extracto de pata de gallo tratado con fenol sin modificar (ambos en fenol-salina) y el propio medio fenol-salina se inyectan respectivamente por punción en la piel de pacientes alérgicos sensibles a la hierba. Se miden las áreas del cardenal al cabo de 10 minutos y se expresan en la Tabla XIII en mm².

15

20

TABLA XIII

<u>Pacien te n^o</u>	<u>Extracto de polen de pata de gallo, 50 µg/ml</u>	<u>Extracto tratado con fenilglicoxal, 1 mg/ml</u>	<u>Fenol- Salina</u>
1	35	0	0
2	27	4	0
<u>3</u>	<u>19</u>	<u>2</u>	<u>1</u>
Total	91	6	1

25

Ensayo de inmunogenicidad

30

Unos cobayas duplicados se inmunizan por inyección subcutánea de una emulsión que contiene el material modifi-

382486



-5-

1 cado con fenilglioxal en coadyuvante completo de Freund.
Una serie similar de cobayas se inmuniza con el material de
partida sin modificar empleando el mismo coadyuvante. Al ca-
bo de 28 días, se esquilan varias series de animales para
5 eliminar el pelo de los flancos y en la zona esquilada se
aplica una serie de inyecciones intradérmicas (0,1 ml) de
una solución seriada del material de partida terminando
con solución salina normal. Inmediatamente se inyecta por
vía intravenosa 0,4 ml de una solución al 5 % de azul cielo
10 Pontamine. Al cabo de 20 minutos, se forman cardenales de
color azul en algunos de los puntos de inyección intradérmi-
ca, indicando la presencia de anticuerpos con especificidad
para el material de partida. Se miden las áreas de los car-
denales y se registran en la Tabla XIV.

15

20

25

30



382486

382486

TABLA XIV

Diámetro del cardenal (mm) para cada cantidad de extracto de polen de pata de gallo inyectado i.d.

Nº del cobaya	Material inmunizante	100 µg	10 µg	1 µg	0,1 µg	0,01 µg	0,001 µg
1	Extracto de polen de pata de gallo (5 mg)	14	14	10	10	9	7
2		14	12	8	7	6	-
3		12	11	10	9	7	-
4		12	11	9	9	8	-
1	Extracto de polen de pata de gallo tratado con fenilglicoxal (0,5 mg)	12	11	-	-	-	-
2		13	10	-	-	-	-
3		12	-	-	-	-	-
4		-	-	-	-	-	-

1

5

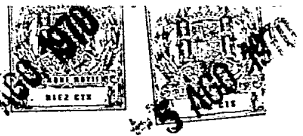
10

15

20

25

50



382486

382486

TABLA XIV

metro del cardenal (mm) para cada cantidad de extracto de polen de pata de gallo inyectado i.d.

<u>1 µg</u>	<u>10 µg</u>	<u>1 µg</u>	<u>0,1 µg</u>	<u>0,01 µg</u>	<u>0,001 µg</u>
.	14	10	10	9	7
.	12	8	7	6	-
1	11	10	9	7	-
2	11	9	9	8	-
2	11	-	-	-	-
3	10	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
.	-	-	-	-	-



382486

75 AS

1

EJEMPLO 8

Tratamiento de extracto de polen con nitroindanodiona

Método

Se agrega 1 ml de una solución al 0,5 % de 2-nitroindano-1,3-diona en agua a 9 ml de extracto de polen de pata de gallo que ha sido purificado por tratamiento con fenol y se ha disuelto en solución reguladora de fosfato 0,01 M, pH 8. La mezcla se agita a la temperatura ambiente durante la noche. El precipitado que se forma se lava repetidamente con solución reguladora de fosfato a pH 8 y después se suspende en fenol-salina.

5

10

Ensayo de alergenicidad

Una suspensión del material modificado con nitroindanodiona preparado anteriormente, una suspensión del extracto no modificado (ambos en fenol-salina) y el propio medio fenol-salino se inyectan respectivamente por punción en la piel de pacientes sensibles a la hierba. Al cabo de 10 minutos se miden las áreas de los cardenales y se expresan en la Tabla XV en mm².

15

20

TABLA XV

<u>Paciente n°</u>	<u>Extracto de polen de pata de gallo, 50 µg/ml</u>	<u>Extracto tratado con nitroindanodiona 1 mg/ml</u>	<u>Fenol-Salina</u>
1	3	0	0
2	11	2	1
3	8	2	0
4	5	1	0
Total	27	5	1

25

Ensayo de inmunogenicidad

Unos cobayas duplicados se inmunizan por inyección subcutánea de una emulsión que contiene el material modifi-

30



1 cado con nitroindanodiona en coadyuvante completo de Freund.
Una serie similar de cobayas se inmuniza con el material de
partida no modificado empleando el mismo coadyuvante. Al
5 cabo de 28 días, ambas series de animales se esquilan para
eliminar el pelo de los flancos y en la zona esquilada se
realiza una serie de inyecciones intradérmicas (0,1 ml) de
una solución seriada del material de partida terminando con
solución salina normal. Inmediatamente se inyecta por vía
10 intravenosa 0,4 ml de una solución al 5 % de azul cielo Pon
tamine. Al cabo de 20 minutos se miden los cardenales y se
registran en la Tabla XVI.

15

20

25

30



382486

382486

TABLA XVI

Diámetro del cardenal (mm) para cada cantidad de extracto de polen de pata de gallo inyectado i.c.

Nº del cobaya	Material inmunizante	100 µg	10 µg	1 µg	0,1 µg	0,01 µg	0,001 µg
1	Extracto de polen de pata de gallo (0,5 mg)	13	13	9	9	-	-
2		13	13	5	4	3	-
3		12	11	10	9	7	-
4		12	11	9	9	8	-
1	Extracto de polen de pata de gallo tratado con nitroindandiona (0,5 mg)	10	-	-	-	-	-
2		14	11	-	-	-	-
3		14	11	-	-	-	-
4		9	-	-	-	-	-

1

5

10

15

20

25

30

382486

TABLA XVI

Diámetro del cardenal (mm) para cada gallo inyectado i.d.

Nº del cobaya	Material inmunizante	Diámetro del cardenal (mm) para cada gallo inyectado i.d.		
		100 µg	10 µg	1 µg
5	1	13	13	9
	2	13	13	5
	3	12	11	10
	4	12	11	9
10	1	10	-	-
	2	14	11	-
	3	14	11	-
	4	9	-	-

15

20

25

30

382486



382486

TABLA XVI

Diámetro del cardenal (mm) para cada cantidad de extracto de polen de pata de gallo inyectado i.d.

<u>100 µg</u>	<u>10 µg</u>	<u>1 µg</u>	<u>0.1 µg</u>	<u>0.01 µg</u>	<u>0.001 µg</u>
13	13	9	9	-	-
13	13	5	4	3	-
12	11	10	9	7	-
12	11	9	9	8	-
10	-	-	-	-	-
14	11	-	-	-	-
14	11	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-



382486

EJEMPLO 9

Tratamiento de extracto de polen con glutaraldehído y posterior absorción en hidróxido de aluminio

Método

Se añade 1 ml de solución de glutaraldehído al 5 % a 9 ml de un extracto acuoso de polen de alfalfa conteniendo 1 mg/ml a pH 5,3. La mezcla se agita a la temperatura ambiente durante 3 días. Se añaden 6 ml de solución de hidróxido aluminico al 2 % y la mezcla se agita durante 1 hora. Después de centrifugar, el precipitado se lava dos veces en solución reguladora de fosfato 0,01 M, pH 8, y tres veces en agua destilada y finalmente se suspende de nuevo hasta una concentración de 1 mg/ml de polen en fenol-salina. El procedimiento se repite sin la adición del glutaraldehído, sirviendo la suspensión final como control en el ensayo de especificidad inmunizante.

Ensayo de alergenidad

Una suspensión del material anterior, una solución del extracto de polen no modificado (ambas en fenol-salina) y el propio medio fenol-salino se inyectan respectivamente por punción en la piel de pacientes alérgicos sensibles a la hierba. Se miden las áreas de los cardenales después de 10 minutos y se expresan en la Tabla XVII en mm².

382486



TABLA XVII

Paciente n°	Extracto acuoso de polen de alfalfa, 50 µg/ml	Extracto de polen de alfalfa tratado con glutaraldehído y adsorbido en alúmina, 1 mg/ml	Extracto de polen de alfalfa no tratado y adsorbido en alúmina 1 mg/ml	Fenol-Salina
1	17	2	6	0
2	2	0	3	0
3	6	0	3	0
Total	25	2	12	0

Ensayo de especificidad inmunizante

10 Unos cobayas duplicados se inmunizan por inyección subcutánea del material modificado adsorbido en alúmina-glutaraldehído. Una serie similar de cobayas se inmuniza con extracto de polen de alfalfa adsorbido en alúmina y no modificado, a una concentración de polen de 1 mg/ml. Se administra una nueva inyección 21 días más tarde y los animales son san-

15 grados 10 días después.

La anafilaxis cutánea pasiva se realiza en los sueros por inyección intradérmica de diluciones seriadas en una zona esquilada de los flancos de una serie de cobayas. Los cobayas

20 son después atacados intravenosamente con el extracto de alfalfa acuoso no modificado, conteniendo 0,4 ml de solución de azul cielo Pontamine, 5 horas más tarde. Los resultados obtenidos con diferentes concentraciones de antígeno atacante se encuentran en la Tabla XVIII para el material modificado y en la Tabla XIX para la suspensión de control sin

25 glutaraldehído.

30

382486

382486

TABLA XVIII

Nº del cobaya	Ataque con extracto acuoso de polen de alfalfa se cado por congelación	Diámetros del cardenal en mm a una dilución del suero de Salina			
		1/5	1/25	1/125	1/625
1	1 mg/ml	22	20	16	10
2	100 µg/ml	20	17	13	-
3	10 µg/ml	20	18	-	-
4	5 µg/ml	14	-	-	-

TABLA XIX

Nº del cobaya	Ataque con extracto acuoso de polen de alfalfa se cado por congelación	Diámetros del cardenal en mm a una dilución del suero de Salina			
		1/5	1/25	1/125	1/625
5	1 mg/ml	25	16	-	-
6	100 µg/ml	20	18	16	-
7	10 µg/ml	-	-	-	-
8	5 µg/ml	-	-	-	-

1

5

10

15

20

25

50

382486

1

TABLA XVIII

Nº del cobaya	Ataque con extracto acuoso de polen de alfalfa <u>secado por congelación</u>	<u>Diámetros del cardenal en</u>		
		<u>1/5</u>	<u>1/25</u>	<u>1/125</u>
1	1 mg/ml	22	20	16
2	100 µg/ml	20	17	13
3	10 µg/ml	20	18	-
4	5 µg/ml	14	-	-

5

TABLA XIX

Nº del cobaya	Ataque con extracto acuoso de polen de alfalfa <u>secado por congelación</u>	<u>Diámetros del cardenal en</u>		
		<u>1/5</u>	<u>1/25</u>	<u>1/125</u>
5	1 mg/ml	25	16	-
6	100 µg/ml	20	18	16
7	10 µg/ml	-	-	-
8	5 µg/ml	-	-	-

10

15

20

25

30

382486



382486

TABLA XVIII

10-
se

Diámetros del cardenal en mm a una dilución del suero de					
<u>1/5</u>	<u>1/25</u>	<u>1/125</u>	<u>1/625</u>	<u>1/3125</u>	<u>Salina</u>
22	20	16	10	-	-
20	17	13	-	-	-
20	18	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-

TABLA XIX

10-
se

Diámetros del cardenal en mm a una dilución del suero de					
<u>1/5</u>	<u>1/25</u>	<u>1/125</u>	<u>1/625</u>	<u>1/3125</u>	<u>Salina</u>
25	16	-	-	-	-
20	18	16	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-



382486

1

Puede observarse que el tratamiento con glutaraldehido conduce a una mayor formación de anticuerpos cuando se compara con la del material no tratado, aunque la actividad alérgica ha sido reducida.

5

En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

10

15

20

25

30

382486



16 MAR 1973

REIVINDICACIONES

1

1. Un procedimiento para la preparación de un preparado farmacéutico a base de un material alergénico modificado, cuyo procedimiento comprende la reacción de un material alergénico con un polialdehido, una policetona, una carbo-di-imida, una epihalohidrina o un cianato inorgánico, con la condición de que cuando se emplea un cianato inorgánico, la reacción se efectúa en condiciones ácidas, produciendo con ello un material alergénico modificado que es reticulado intermolecularmente y/o intramolecularmente y que es sustancialmente insoluble en agua o solo ligeramente soluble en agua y que presenta una alergenicidad reducida con respecto a la del material alergénico no reticulado y que tiene la propiedad de producir anticuerpos con especificidad cruzada para el material alergénico no reticulado, y a continuación mezclar dicho material alergénico modificado con un vehículo parenteralmente aceptable que opcionalmente puede incluir un coadyuvante como tirosina, alúmina, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio.

5

10

15

20

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el material alergénico se hace reaccionar con un dialdehido.

25

3. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el dialdehido empleado es glutaraldehido o fenilglioxal.

30

4. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el material alergénico se hace reaccionar con dicetona.

5. Un procedimiento según la Reivindicación 4, en el que la dicetona empleada es 2-nitroindano-1,3-diona.

ME

38248616



1 6. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el material alergénico se hace reaccionar con una carbo-di-imida o una epihalohidrina.

5 7. Un procedimiento según la Reivindicación 6, en el que se emplea epiclorohidrina o epibromohidrina.

8. Un procedimiento según la Reivindicación 6, en el que se emplea meto-p-toluensulfonato de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbo-di-imida.

10 9. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el material alergénico se hace reaccionar con un cianato inorgánico.

10. Un procedimiento según la Reivindicación 9, en el que el cianato inorgánico empleado es cianato potásico.

15 11. Un procedimiento según las Reivindicaciones 9 ó 10, en el que la reacción se efectúa a un pH de 5 aproximadamente.

20 12. Un procedimiento según cualquiera de las Reivindicaciones 6 a 8, en el que la reacción con la carbo-di-imida se efectúa a pH aproximadamente 5 y la reacción con la epihalohidrina a pH aproximadamente 8.

13. Un procedimiento según cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 5, en el que la reacción se efectúa en un intervalo de pH comprendido entre 4 y 8, preferiblemente a un pH alrededor de 5.

25 14. Un procedimiento según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en el que el material alergénico es un extracto alergénico de uno o más pólenes.

30 15. Un procedimiento según la Reivindicación 1, esencialmente como el descrito con anterioridad en cualquiera de los ejemplos específicos.

ME

382486

16



1

16. 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 PREPARADO FARMACEUTICO A BASE DE UN MATERIAL ALERGENICO MODIFICADO.

5

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

Madrid, 5 de agosto de 1.970

BERNARDO UNGRIA

p.p.

10

15

20

25

atE

30