



10 ES	11	NUMERO	10 AI
	21	-463.124	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		11-10-77	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
731.414	12 de octubre de 1.976	EE.UU. de A.

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	A61K; C07G	

54 TITULO DE LA INVENCION
PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UN COMPLEJO ANTIGENO-PROTEINA MULTIVALENTE PARA BLOQUEAR REACCIONES ALERGICAS.

71 SOLICITANTE (S)
RESEARCH CORPORATION

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
405 Lexington Avenue, New York, Estado de New York, EE.UU. de A.

72 INVENTOR (ES)
Arthur MALLEY.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
GOMEZ-ACEBO.

Hasta el presente, los métodos para el tratamiento de alergias y reacciones alérgicas han implicado la administración a un individuo de un antígeno que inicia la formación de anticuerpos los cuales compiten con los anticuerpos iniciados por el alérgeno, amortiguando o reduciendo con ello la reacción alérgica.

La técnica anterior usual en el tratamiento de pacientes alérgicos, comprende la preparación de un extracto en bruto de la sustancia productora de alergia en una solución acuosa tamponada. Los pacientes son tratados entonces en primer lugar con pequeñas dosis, aumentando a continuación, del extracto en bruto, en un largo periodo de tiempo. Frecuentemente, se necesitan tres o más años de tratamiento antes de observarse una mejora significativa y constante. A medida que progresa el tratamiento, se aumenta gradualmente la cantidad de extracto en bruto que recibe el paciente. El grado de dosis aumentada y la proporción de la misma depende de la sensibilidad individual de los pacientes y del grado de reacción a las dosis anteriores.

La inyección de extracto de alérgeno en bruto, total, en largos periodos de tiempo, induce la producción de anticuerpos bloqueantes y competidores. Se ha llegado a la teoría de que los anticuerpos bloqueantes compiten con los anticuerpos alérgicos por el antígeno, proporcionando protección al paciente alérgico.

Existen numerosas y evidentes desventajas asociadas con este proceso costoso y consumidor de tiempo para desensibilizar a los pacientes alérgicos. Muy frecuentemente, la administración del extracto en bruto se traduce en una severa reacción alérgica en el caso de que las dosis no hayan sido

cuidadosamente controladas y administradas. En adición, el proceso para desensibilizar al paciente es una técnica larga y consumidora de tiempo y frecuentemente costosa. Por otra parte, la producción de anticuerpos competitivos en el paciente alérgico se traduce muy frecuentemente en efectos secundarios que más bien dañan al paciente que a la reacción alérgica misma.

Más importante aun, el método de desensibilización empleado hasta el presente en la técnica anterior no ha tenido éxito totalmente. En muchos casos, el procedimiento de desensibilización, de larga duración, no se traduce en un grado adecuado de protección para el paciente alérgico quien todavía continua sufriendo de alergia cuando se expone al antígeno.

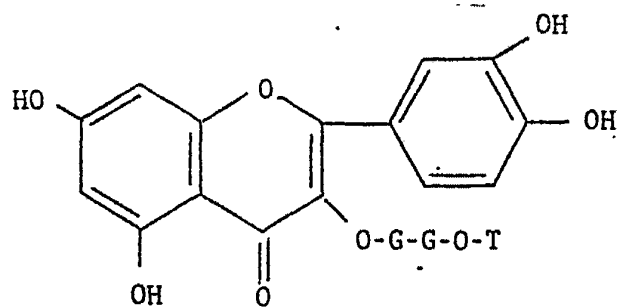
Constituye un objeto de la presente invención proporcionar un complejo adecuado para su administración a un paciente alérgico, el cual neutraliza los anticuerpos existentes y bloquea totalmente la formación de anticuerpos, bien competitivos o bien específicos al antígeno alérgico.

Otro objeto de la invención es proporcionar un método para la producción de complejos que bloquean la reacción alérgica.

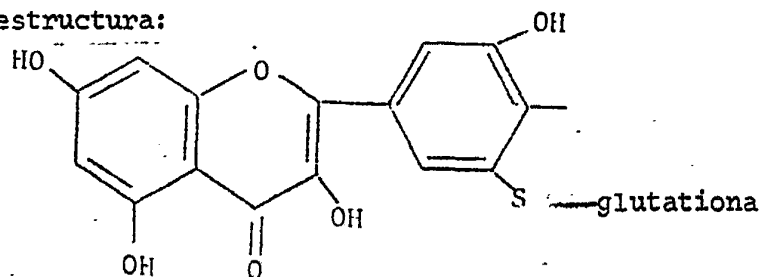
Otro objeto más de la invención es proporcionar un método para el tratamiento de un individuo alérgico, al objeto de bloquear la reacción alérgica.

Todavía, otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición inyectable para la administración a un paciente alérgico, para bloquear la reacción alérgica.

La invención comprende un complejo multivalente adecuado para bloquear reacciones alérgicas que comprende (1) al menos un fragmento de antígeno D de Timothy que tiene la estructura determinante antigénica:

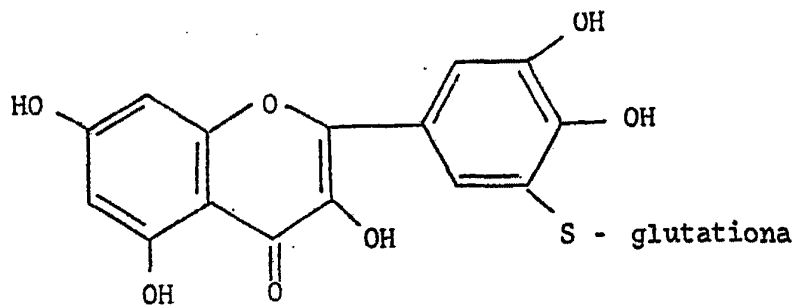


5 en la que G representa glucosa y T representa treonina o un péptido enlazado a dicha estructura a través de una molécula de treonina; enlazado covalentemente, a través de por lo menos una mitad glucosa, a un péptido o proteína, (2) un conjugado que tiene la estructura:



o (3) un conjugado que comprende al menos un conjugado de la estructura:

10



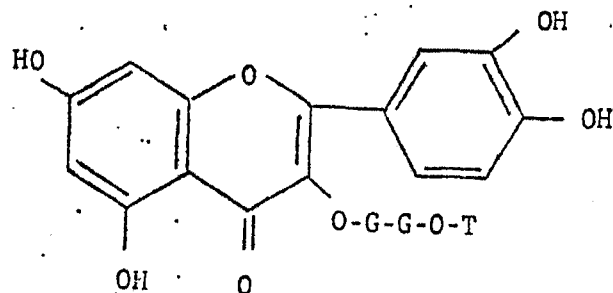
covalentemente enlazado a una proteína o péptido mediante un enlace péptido a través de la mitad glutatona.

5 La invención incluye también un método para preparar el complejo (1) mediante activación de una mitad glucosa del fragmento de antígeno D de Timothy y ulterior reacción del intermedio así formado con un péptido o proteína.

10 La invención incluye además un método para el tratamiento de alergias, que comprende inyectar a un individuo una cantidad de uno de los anteriores complejos, en proporción suficiente para inhibir la liberación de histamina inducida por el antígeno.

15 La invención se relaciona también con una composición inyectable adecuada para la administración a pacientes alérgicos, al objeto de bloquear reacciones alérgicas, que comprende un medio adecuado para inyección conteniendo al complejo anteriormente identificado.

20 Recientemente se han aislado y caracterizado varios fragmentos de antígenos alérgicos de polen de Timothy. Véase Malley et al, Imunochemistry, 1975, Volúmen 12, páginas 551-554. El principal alérgeno multivalente contenido en el polen de Timothy es el conocido en la técnica anterior como antígeno D. La estructura determinante antigénica monovalente del antígeno D que normalmente se denomina antígeno D, es la siguiente:



en la que G representa glucosa y T treonina o un péptido enlazado a dicha estructura a través de una molécula de treonina.

5 Los fragmentos de antígeno D, identificados en la técnica anterior como antígeno D₁, antígeno D₂ y antígeno D₃, difieren en cuanto al tamaño de la "cola" del péptido enlazado a la mitad glucosa de la estructura determinante antigénica a través de la molécula de treonina. (Véase J. Immunology 99, 825, 1967; Immunochemistry, 1, 237, 1964; 12, 551, 1975; WHO Symposium on Allergen Standardization ed. por F. T. Perkins, 10 Geneva, 1974; Develop. biol. standard 29, 29, 1975). El antígeno D₁ tiene un peso molecular de 5.000 aproximadamente. El antígeno D₂ tiene un peso molecular de 2.500 aproximadamente. El antígeno D₃ es el fragmento en donde la molécula unida a la mitad glucosa es solamente treonina. En algunos casos, está unida 15 serina en lugar de treonina a la mitad glucosa, debido a la mala interpretación del código responsable de la adición de aminoácidos específicos durante la síntesis proteínica.

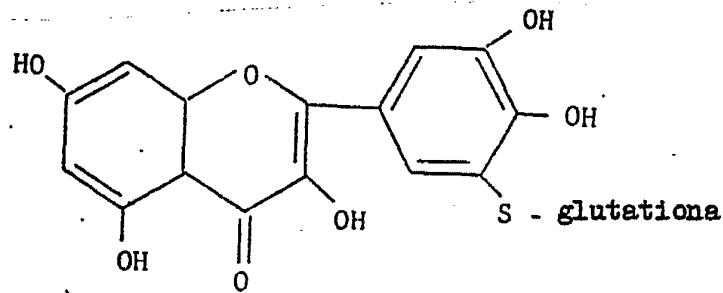
20 La fracción quercitina de la fórmula estructural del antígeno está enlazada a las mitades glucosa por vía de un enlace éter a través de grupos OH de las respectivas moléculas. El enlace de treonina a la mitad glucosa es también un enlace éter a través de un grupo OH de la fracción celobiosa y el grupo OH de treonina. Basado en consideraciones estequiométricas, se supone que la activación se presenta principalmente en 25 la molécula de glucosa adyacente a la molécula de quercitina. Sin embargo, debe entenderse que los complejos de la invención se forman a través de un mecanismo de activación de glucosa independientemente del lugar preciso de activación dentro de la fracción de celobiosa. Precisamente se desconoce que grupo 30 OH de la fracción de celobiosa comprende el punto de enlace.

Como es evidente a partir de la estructura anterior, la molécula se abre en varios puntos para su conjugación con una amplia variedad de reactivos. Se pueden preparar muchos conjugados multivalentes que como cabría esperar iniciarían . . . reacciones alérgicas en virtud de su estructura. En realidad, se ha encontrado que la unión de proteínas o péptidos a la molécula en puntos distintos a las mitades glucosa o carbohidrato se traduce en la obtención de conjugados que inician reacciones alérgicas.

Sorprendentemente, se ha encontrado que el enlace de un péptido o una proteína al fragmento de antígeno D, a través de la mitad glucosa, se traduce en un complejo que no inicia reacciones alérgicas, sino que por el contrario neutraliza totalmente los anticuerpos alérgicos e inhibe o bloquea la formación de anticuerpos alérgicos.

De este modo, estos complejos o conjugados se pueden administrar a un paciente alérgico para la inhibición completa de la reacción alérgica, sin necesidad de recurrir al proceso de desensibilización costoso y de larga duración, anteriormente descrito. Puesto que la administración del complejo inhibe la formación de anticuerpos alérgicos totalmente, la reacción alérgica misma es inhibida así como cualquier efecto secundario producido por la formación de anticuerpos competitivos, obtenidos según el método de desensibilización convencional.

Según se ha podido averiguar, se obtienen resultados similares mediante un conjugado que tiene la estructura:



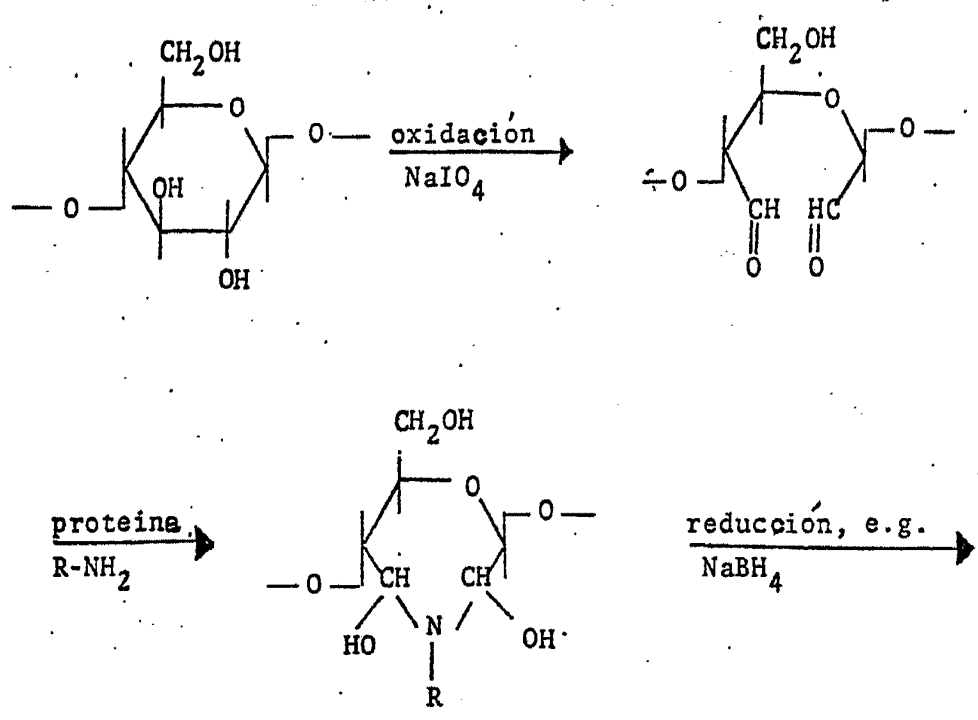
o un conjugado que comprende al menos un conjugado de quercitina-glutaciona covalentemente enlazado a una proteina o péptido mediante un enlace péptido a través de la mitad glutaciona. La administración de estos complejos o conjugados se traduce también en una inhibición completa de la formación de anticuerpos alérgicos, tanto específicos al antígeno como competitivos con los anticuerpos, obteniéndose un bloqueo total de la reacción alérgica.

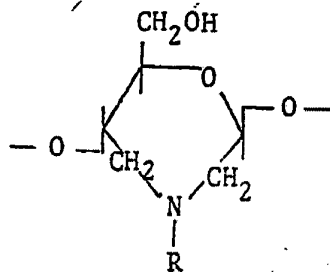
El fragmento de antígeno D de Timothy se puede enlazar covalentemente a través de por lo menos una mitad glucosa a cualquier péptido o proteina adecuada. Debe entenderse que cualquier péptido o proteina adecuada para su administración a un paciente alérgico, puede estar enlazada covalentemente al fragmento de antígeno. Entre los péptidos o proteínas se prefiere la albúmina de suero humano, un copolímero de d-aminoácido de lixina y ácido glutámico (d-GL), IgG humana así como otros homólogos y proteínas similares o copolímeros de d-aminoácidos.

Como anteriormente se ha indicado, es esencial que el péptido o proteina se enlace a la mitad glucosa del fragmento de antígeno D. La unión de la proteina o péptido a cualquier otra porción de la molécula se traducirá en un complejo que inicia la reacción alérgica en lugar de inhibirla. El enlace covalente se puede conseguir activando el fragmento de antígeno D con un haluro de cianógeno. El método es descrito detalladamente por Axen et al, *Nature*, 214, 1302-1304 (1967) y Cuatrecasas et al, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.*, 61, 636-643 (1968). El haluro de cianógeno reacciona con el grupo hidroxilo de los grupos glucosa para formar ésteres cianato. La reacción se presenta más rápidamente a un pH com-

prendido entre 10 y 12. El cianato puede reaccionar además con más grupos hidroxilo para formar un intermedio imidocarbonato. El imidocarbonato cíclico formado como producto principal, después de la reacción del haluro de cianógeno con la mitad glucosa, es altamente reactivo con aminas, para formar N-imidocarbonatos, isoureas o N-carbamatos. Se desconoce la naturaleza exacta del enlace entre la proteína y la mitad glucosa activada con haluro de cianógeno. Independientemente del mecanismo exacto, sin embargo, el intermedio formado por la reacción de un haluro de cianógeno con el fragmento de antígeno D es altamente reactivo con péptidos y proteínas para formar un complejo en donde el péptido o la proteína está enlazado covalentemente a través de la mitad glucosa al fragmento de antígeno D.

La fracción de celobiosa del fragmento de antígeno D se puede activar también para su enlace a la proteína o péptido, mediante el método descrito en Immunol. 20, 1061, (1971):

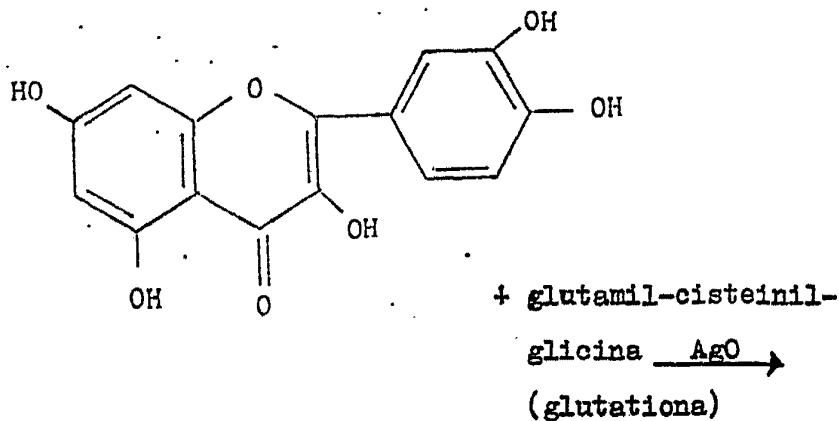


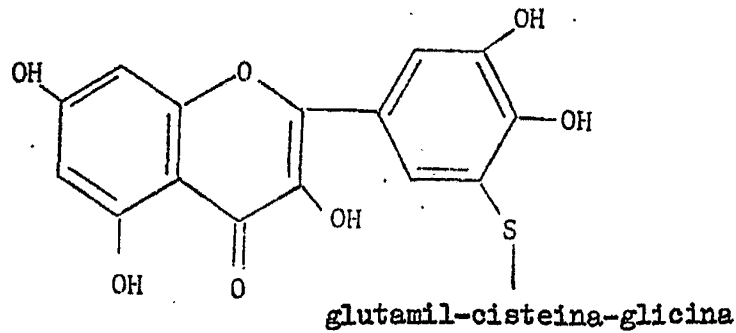


Cuando los grupos carboxilo del fragmento de antígeno D se activan por el reactivo K de Woodward quedando sin afectar la mitad quercitina-glucosa-glucosa, el conjugado resultante con albúmina de suero humano, por ejemplo, induce las reacciones de liberación de histamina inducidas con antígeno, tal y como se demuestra por los ensayos directos realizados en la piel. De este modo, es evidente que las capacidades de inhibición de reacciones alérgicas del complejo dependen de la conjugación del péptido o proteína con el fragmento de antígeno D a través de la mitad glucosa.

Los conjugados de quercitina-glutaciona y quercitina-glutaciona-proteína descritos anteriormente, son también potentes agentes bloqueantes de reacciones alérgicas.

El conjugado de quercitina-glutatieno se forma mediante una reacción de oxidación-adición utilizando AgO u otro agente oxidante adecuado:





5 El conjugado resultante se puede entonces conju-
gar con un péptido o proteína mediante activación de los gru-
pos carboxilo de la mitad glutatona con, por ejemplo, reac-
tivo de Woodward, carbodiimidas, etc., seguido por conjugación
con la molécula de proteína o péptido. El conjugado de quer-
citina-glutaciona se enlaza a la proteína por vía de una
unión péptida a través de la porción de ácido glutámico o
bien de la porción de glicina de la mitad glutaciona.

10 El péptido o proteína conjugada al conjugado de
quercitina-glutaciona puede ser cualquier péptido o proteína
que resulte adecuado para la administración a un paciente alér-
gico. Entre las proteínas y péptidos se prefieren la albúmina
de suero humano, un copolímero de d-aminoácido de lisina y
15 ácido glutámico (d-GL), IgG humana u otras proteínas homólogas
o copolímeros de d-aminoácidos.

20 Evidentemente, el fragmento de antígeno D y la
molécula de quercitina-glutaciona se pueden enlazar a la molé-
cula de proteína o péptido en diversos puntos de esta última.
Generalmente, es preferible enlazar de 2 a 30 moles aproxima-
damente, preferiblemente 5 a 20 moles, del fragmento de anti-
geno D o compuesto de quercitina-glutaciona, a 1 mol de protei-
na o péptido. La relación molar puede variarse variando la re-

lación molar de reactivos en el método de preparación.

Los complejos de antígeno-proteína anteriormente descritos se pueden incorporar en cualquier medio adecuado, tal como salina tamponada, para su administración a un paciente alérgico.

En la composición de inyección, se pueden incluir aditivos, adyuvantes, etc., todos ellos convencionales; sin embargo, debe entenderse que los mismos no son necesarios.

En general, las composiciones se inyectan subcutánea, intramuscular o intravenosamente.

Generalmente, las dosis del orden de 0,01 a 0,25 mg aproximadamente, con preferencia de 0,025 a 0,1 mg, por kg de peso corporal, del complejo en la composición inyectada, es suficiente para proporcionar un grado aceptable de capacidad de bloqueo de la reacción alérgica.

Debe entenderse que los parámetros de las gamas de dosificación vienen gobernados por la duración del complejo en la circulación, título de anticuerpos del paciente bajo terapia, estado de inmunidad del paciente y duración de la supresión de la respuesta IgA.

Los complejos y métodos de la presente invención son útiles en el tratamiento de pacientes sensibles a la hierba para reducir síntomas de alergia. Los complejos suprimen la formación de anticuerpos alérgicos contra los antígenos del polen de la hierba y en adición actúan para neutralizar los anticuerpos existentes en el sistema del paciente. Debe entenderse que la invención resulta de utilidad en el bloqueo no solo de las reacciones alérgicas de Timothy, sino también las de polen de rye-grass y otros polenes de hierbas que reaccionan cruzadamente (es decir, hierba de junio, etc.).

Los siguientes ejemplos ilustran los métodos de preparación de los complejos de la invención.

EJEMPLO 1

Preparación del complejo de antígeno D-proteína

5 Se colocan en un baño de hielo 90 mg del fragmento de antígeno D₁ (peso molecular 5000 aproximadamente) y se ajusta el pH a 10,5 con solución de hidróxido sódico. La mezcla se proporciona con un agitador motorizado y se añaden 2 g de bromuro de cianógeno. El pH se mantiene en 10,5 ± 0,25 por adición de hidróxido sódico en los siguientes 10 minutos. Se añaden 15 ml de un tampón de bicarbonato sódico 0,1 molar (pH 9) conteniendo cloruro sódico 0,15 molar. A continuación, se añaden 45 g de albúmina de suero humano (HSA) y la mezcla se agita a 4°C durante 24 horas. La mezcla se concentra bajo presión negativa para dar un producto que tiene una relación de antígeno D₁ a proteína de 5:1 aproximadamente. El antígeno D₁ sin reaccionar se separa por diálisis.

20 De forma idéntica se pueden preparar complejos con fragmentos de antígenos D₂ y D₃ y otros vehículos de proteína o péptido.

EJEMPLO 2

Preparación de quercitina-glutationa

25 Se mezclan 1,5 g de cloruro de plata con 10 ml de hidróxido sódico 4N durante 20 minutos. El precipitado de óxido de plata se filtra en un embudo Buchner.

30 se disuelven 0,2 g de glutatona en 4 ml de hidróxido sódico 0,25 N en un baño de hielo. Se disuelven 0,2 g de quercitina en 8 ml de hidróxido sódico 0,25N. Se añaden 1,2 g de óxido de plata recientemente preparado a esta última solución y la mezcla se agita durante 15-20 minutos en un baño

de hielo.

La solución de glutatona se añade a continuación y la mezcla se agita durante 1 hora en un baño de hielo. El exceso de óxido de plata se separa por filtración. El pH de la solución resultante se ajusta a 1-2,5 con ácido clorhídrico y la solución se agita durante 30 minutos.

La solución se filtra para separar la quercitina sin ligar y el pH se vuelve a ajustar a 7 con hidróxido sódico. La glutatona libre se determina por el método DNTB (Anal. Biochem. 48, 1972).

EJEMPLO 3

Preparación del conjugado de quercitina-glutatona-proteína

Se añaden 40 mg de quercitina-glutatona a 100 mg del reactivo de Woodward y se mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente. El pH se ajusta a 6,2 con tampón de cocodilato 0,3 M (pH 6,8).

Se añaden 100 mg de HSA mientras se mantiene el pH por encima de 6,2. La mezcla se deja permanecer a temperatura ambiente durante 10-15 minutos y a continuación durante la noche a 4°C. La solución se concentra bajo presión negativa. La diálisis separa la quercitina-glutatona sin ligar de su conjugado con la proteína.

De forma idéntica se pueden preparar el conjugado con otras proteínas y péptidos.

El siguiente ejemplo ilustra la capacidad inhibidora de la reacción alérgica de los complejos y métodos de la presente invención.

EJEMPLO 4

De acuerdo con el método descrito por Malley et al, J. Immunol. 100, 915 (1968), se determina la liberación de his-

5 tamina de tejido pulmonar de mono pasivamente sensibilizado con el suero de pacientes alérgicos. Los sueros empleados para sensibilizar el tejido pulmonar del mono proceden de una combinación de sueros de 20 pacientes sensibles a Timothy con un título de anticuerpos alérgicos por término medio de 1:750. El tejido pulmonar de mono se incuba entonces durante 2 horas a 37°C con el suero. Antes de competir con el alérgeno, el tejido sensibilizado se incuba durante 10 minutos a 37°C con el agente de inhibición. El combate antigénico se realiza mediante incubación con la concentración óptima de extracto de polen en bruto (WST) durante 15 minutos a 37°C.

15 Los resultados se ofrecen en la Tabla 1 en donde:
WST representa un extracto acuoso de polen de hierba de Timothy total dializado para separar fragmentos de bajo peso molecular;

D_1 representa los fragmentos de antígeno D de Timothy con un peso molecular de 5.000 aproximadamente;

D_2 representa el fragmento de antígeno D de Timothy con un peso molecular de 2.500 aproximadamente;

20 D_3 representa el fragmento de antígeno D de Timothy con un peso molecular inferior a 1.000 y comprende el complejo indicado anteriormente en donde T representa treonina;

HSA representa albúmina de suero humano;

25 dGL representa el copolímero de D-aminoácido de ácido glutámico y glicina que tiene un peso molecular de 40.000 aproximadamente;

. RhIg representa el IgG de Rhesus.

TABLA 1

Preparación	Método de conjugación	Relación	Conc. de conjugado (mg)	Conc. de antígeno WST (µg)	Antígeno de combate directo (µg)	Inhibición
WST	--	--	--	40	2,7	--
D ₁ - HSA		6,2:1	0,260	40	1,27	53
D ₁ - RhIgG	CNBr	15:1	0,580	40	0,14	95
D ₁ - dGL		4:1	0,500	40	0,35	87
Quercitina-glutaciona	Oxidación y Adición	1:1	1,5	40	0,32	88
			0,75	40	0,86	68
			0,37	40	1,2	55
Quercitina-glutaciona HSA	Oxidación y adición, luego reactivo K de Woodward	20:1	1,6	40	0,37	90
			0,80	40	0,70	74
			0,40	40	1,13	58

Como es evidente a partir de los resultados de la Tabla 1, los complejos de la presente invención constituyen unos potentes inhibidores de las reacciones alérgicas.

5 El siguiente ejemplo ilustra adicionalmente la capacidad inhibitoria de reacciones alérgicas de los complejos de la invención.

EJEMPLO 5

10 La reactividad de la piel por transferencia pasiva de los complejos de la invención se compara con los antígenos presentes en el polen de Timothy así como con complejos preparados mediante conjugación del péptido o proteína a los fragmentos de antígeno a través de mitades distintas a la mitad glucosa.

15 Se inyectan intradérmicamente, en la piel de un voluntario no alérgico, 0,1 ml de suero conteniendo anticuerpos alérgicos (procedente de una combinación de sueros de 20 pacientes sensibles a Timothy con un título medio P-K de 750). Transcurridas 48 horas se combate con diversos antígenos y complejos cada uno de los puntos previamente sensibilizados con los sueros. Los anticuerpos alérgicos de los sueros implan-
20 tados interactúan con los materiales antigénicos alergénicos para causar una reacción alérgica localizada. Si el material antigénico no inicia reacciones alérgicas, no se observará ninguna reacción localizada.

25 En la Tabla 2 se ofrecen los resultados de los diversos ensayos a base de los complejos de la presente invención así como a base del material antígeno del polen de Timothy.

TABLA 2

Preparación	Método de conjugación	Relación Conj.	Conc. Antígeno	Reacción P-K
WST	--	--	1 μ g	4+
D ₁ - HSA	Activación con CNBr mitad azúcar	6,2:1	500 μ g	Neg
D ₁ - dGL		4:1	500 μ g	Neg
D ₁ - RhIgG		20:1	580 μ g	Neg
D ₂ - RhIgC		7,2:1	500 μ g	Neg
D ₂ - dGL		2,8:1	500 μ g	Neg
D ₃ - HSA		5:1	500 μ g	Neg
D ₁ - HSA	Reactivo K de Woodward	2,6:1	25 μ g	2+
D ₁ - HSA	Activación	4:1	25 μ g	4+
D ₃ - HSA	Grupos COOH	11,3:1	100 μ g	4+
Quercitina-Glutationa	Oxidación y Adición	1:1	1,5 mg	Neg
Quercitina-Glutationa-dGL	Reactivo K de Woodward	12:1	100 μ g	Neg
Quercitina-Glutationa-HSA	Reactivo K de Woodward	20:1	1,6 mg	Neg

Los resultados anteriores indican que los complejos de la presente invención no inician reacciones alérgicas. En adición, debe observarse que los complejos de los fragmentos de antígeno D conjugados con la proteína a través de mitades distintas a la mitad glucosa, son unos iniciadores potentes de las reacciones alérgicas, indicando con ello la característica crítica de la conjugación a través de la mitad glucosa del fragmento de antígeno D.

EJEMPLO 6

Este ejemplo ilustra la capacidad de los complejos de la invención para suprimir la formación de anticuerpos alérgicos.

Estudios preliminares han demostrado que ratones LAF₁ desarrollaron buenas respuestas IgE (anticuerpos alérgicos) contra el polen de Timothy.

Los animales son inyectados intraperitonealmente con 10 μ g de WST en alumbre y transcurridas 3 semanas reciben una segunda inyección intraperitoneal de 10 μ g de WST en alumbre. Los títulos IgE, después de la inmunización inicial, se elevan a títulos comprendidos entre 1/100 y 1/200, medido por PCA. Los títulos IgE, después de la segunda inyección de antígeno, suben hasta valores comprendidos entre 1/600 y 1/800, medido por PCA.

La anafilaxis cutánea pasiva (PCA) se mide por inyección de 0,025 ml de dilución de suero en el lomo de un ratón o rata. Transcurridas 72 horas (ratón) o 3 horas (rata) los animales compiten con WST en tinte azul de Evans inyectado intravenosamente. La interacción del antígeno en circulación y de los IgE fijados al tejido, se traduce en una reacción alérgica localizada cuyo punto se hace visual por la fuga del

tinte azul al área reaccionada. El título IgE se define como la dilución más baja que proporciona una reacción PCA positiva.

5 El IgA del ratón de estos animales se prepara contra el mismo determinante antigénico como el expresado en los fragmentos de antígeno D.

Los dos complejos de la invención elegidos para los fines de ensayo son:

10 1) Antígeno D_2 -dGL (D_2 -dGL): un copolímero no inmunogénico de ácido d-glutámico y d-lisina (peso molecular 40.000) con una media de 2,8 grupos de antígeno D_2 /mol de dGL unido. La conjugación se lleva a cabo por modificación de la mitad azúcar con bromuro de cianógeno antes de la adición a dGL.

15 2) Quercitina-glutationa-dGL (Q-G-dGL): preparado por conjugación de quercitina-glutationa a dGL con una media de 12-20 grupos Q-G/mol de dGL.

Administración de Q-G-dGL ó D_2 -dGL por vía intraperitoneal 3 días antes de la inmunización secundaria de WST.

20 día: 0 18 21 28
inyección: | | | |
 WST D_2 dGL WST Sangrar
 en 2 ó en
 alumbre Q-G-dGL alumbre

25 Resultados: Los animales de control suministrados con salina en el día 18 tienen el siguiente título IgE:600; respuesta media en 18 animales.

Animales tratados con D₂-dGL

	<u>Título</u> <u>PCA</u>	<u>Grupo de</u> <u>animales</u>
	350	6
	300	6
5	100	6

Animales tratados con Q-G-dGL:

	<u>Título</u> <u>PCA</u>	<u>Grupo de</u> <u>animales</u>
	600	6
	300	6
10	100	6

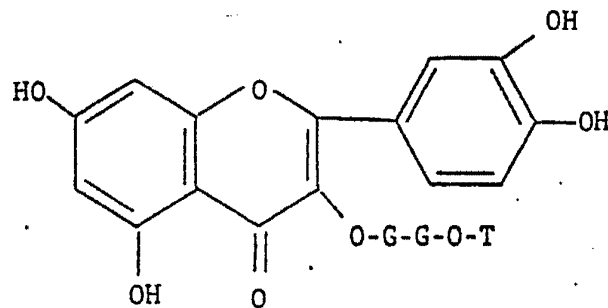
Los datos anteriores indican que ambos conjugados reducen significativamente el nivel IgE cuando se administran 3 días antes de la inyección de antígeno secundario, indicando con ello la neutralización y supresión de anticuerpos. Ensayos similares han indicado que la administración hasta 7 días antes de la inyección de antígeno secundario, proporciona esencialmente los mismos resultados.

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

REIVINDICACIONES

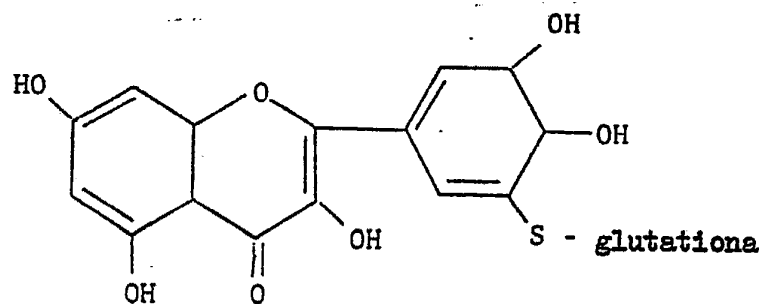
1.- Procedimiento de obtención de un complejo antígeno-proteína multivalente para bloquear reacciones alérgicas, que comprenden (1) al menos un fragmento antigénico D de Timothy que tiene la estructura determinante antigénica:

5

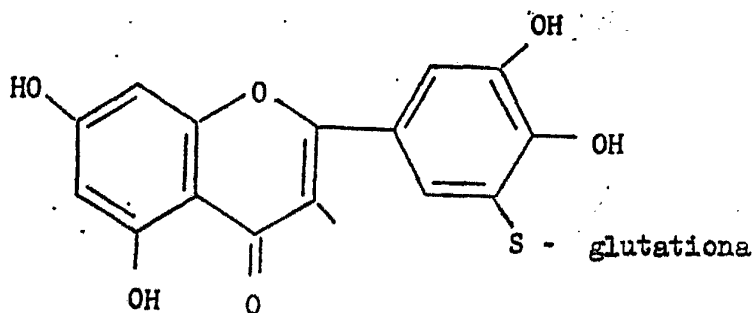


en donde G representa glucosa; y T representa treonina o un péptido enlazado a dicha estructura a través de una molécula de treonina; covalentemente enlazada a través de al menos una mitad glucosa a un péptido o proteína; (2) un conjugado que tiene la estructura:

10



ó (3) un conjugado que comprende al menos un conjugado de la estructura:



5 covalentemente enlazado a una proteina o péptido mediante un enlace péptido a través de la mitad glutatona; caracterizado porque comprende activar las mitades glucosa por reacción con un agente activante y reaccionar el intermediario así formado con un péptido o proteina.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el agente activante es un haluro de cianógeno.

10 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la proteina o péptido es albúmina de suero humano, un copolímero d-aminoácido de lisina y ácido glutámico o IgG humana.

15 4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque T representa treonina.

5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque T es un péptido conteniendo treonina tal que el peso molecular de dicho fragmento es de 5.000 aproximadamente.

20 6.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque T es un péptido conteniendo treonina tal que el peso molecular de dicho fragmento es de 2.500 aproximadamente.

7.- Procedimiento de obtención de un complejo antígeno-proteína multivalente para bloquear reacciones alérgicas, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

5

Esta Memoria consta de 23 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

16 ENE. 1978
RESEARCH CORPORATION.

J. M. GÓMEZ ACEBO Y PARRA
Dr. F. Fernández J. Suárez Díaz

A