



ESPAÑA

(19) ES	(11) NUMERO	(10) A1
(21)	<b>48 4702</b>	
(22)	FECHA DE PRESENTACION	
		- 9 OCT. 1978

**PATENTE DE INVENCION**

Concedido al Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

(30) PRIORIDADES: (31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
948 409	4.10.78	Estados Unidos.
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	A61K 39/36	
(64) TITULO DE LA INVENCION		
PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR UN ALERGENO TRATADO CON ALDEHIDO DE BAJA REACTIVIDAD ALERGENICA EN SERES HUMANOS ALERGICOS.		
(71) SOLICITANTE (S)		
The John Hopkins University.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Baltimore, Maryland 21218. USA.		
(72) INVENTOR (ES)		
David George Marsh.		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE		
D. JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO.		

Los pacientes que sufren de alergias del tipo inmediato (atopias) tienen capacidad para generar clases especiales de anticuerpos alérgicos (reagina) al exponerse a ciertas sustancias (alergenos) hacia las cuales son sensibles. Las reaginas llegan a adherirse fuertemente a ciertas células que contienen histamina, incluyendo las células mástiles del epitelio. Después de una exposición ulterior al material alergeno sensibilizante, tiene lugar una combinación física entre los alergenos y sus reaginas homólogas enlazadas con las células, dando por resultado manifestaciones alérgicas en los lugares de la combinación reagina-alergeno. Las personas alérgicas pueden producir también los llamados "anticuerpos de bloqueo" de un tipo que no es reagina que se pueden combinar con el alergeno inactivándolo, generalmente sin reacciones secundarias indeseables. La actividad reagónica se ha atribuido a la inmunoglobulina E (IgE) y la actividad "bloqueo" al IgG en el suero e IgA e IgG en las secreciones.

Desde hace tiempo la práctica normal ha consistido en inyectar a un paciente alérgico dosis gradualmente en aumento de extractos acuosos que contienen la materia o materias alergénicas hacia las que es sensible el paciente. Históricamente, la base para este tratamiento ha consistido principalmente en acumular la concentración de anticuerpo de bloqueo protector en el suero (y otros fluidos del cuerpo) hasta un nivel en el que pudiera competir eficazmente con la reagina enlazada a las células para el alergeno que penetre en el cuerpo, inhibiendo por lo tanto las reacciones alérgicas.

Se cree ahora que el mecanismo o mecanismos por los cuales la inmunoterapia conduce a la mejoría de los síntomas alérgicos es o son más complejos. En ciertos casos, esta terapia ha demostrado también suprimir la producción de reagentes y reducir la respuesta celular hacia los alérgenos inyectados.

Cualquiera que sea el mecanismo o mecanismos precisos por los cuales la inmunoterapia da por resultado un alivio sintomático, diversos estudios han demostrado que es esencial inyectar una dosis adecuadamente grande extracto al paciente con el fin de que el tratamiento pueda ser eficaz. Desgraciadamente, en el tratamiento tradicional las dosis inmunizantes del extracto alérgico deben aumentarse gradualmente con el fin de reducir al mínimo el riesgo de una respuesta alérgica general (anafiláctica) en el paciente.

Los inconvenientes principales de esta inmunoterapia son: (1) Son necesarias inyecciones repetidas muchas semanas, (2) el tratamiento es rara vez eficaz por completo para aliviar el síndrome alérgico, y (3) el riesgo de reacción anafiláctica general está siempre presente en cada etapa del tratamiento.

Por lo tanto, la terapia original se ha modificado con el fin de vencer estos inconvenientes. Las formas más recientes de tratamiento comprenden inmuni

zar al paciente con una emulsión de agua en aceite del extracto alergénico o incluyendo un adyuvante de desprendimiento lento como es el gel de alumina o un alginayo con un extracto del material alergénico. Dichos métodos no han demostrado ser enteramente satisfactorios debido a la aparición de algunas reacciones anafilácticas y algunas reacciones tóxicas en el paciente o a que estas preparaciones no son lo suficientemente eficaces clínicamente.

Diversos expertos han tratado materiales alergénicos química o físicamente en un intento de reducir virtualmente sus propiedades alergénicas, pero conservan su capacidad para proteger a una persona alérgica contra el alérgeno nativo. La inmunoterapia de persona alérgicas empleando los alérgenos modificados, según cabía esperar, conservarían las propiedades inmunizantes deseadas del alérgeno nativo, incluyendo su capacidad para inducir la formación de anticuerpo de bloqueo contra el alérgeno nativo en cantidades sustanciales. Además, la alergenicidad reducida de dichos materiales modificados permitirían el empleo de dosis mucho mayores de materia inmunizante y, por lo tanto, mejoraría notablemente la calidad del anticuerpo de bloqueo protector.

Se ha averiguado que empleando solución de formaldehído, con o sin ciertos aditivos de bajo peso molecular, la gran mayoría de las sustancias que

5 contienen alergeno se pueden modificar de modo que se resuelven los inconvenientes de los alergenos nativos con respecto a su uso en la inmunoterapia. (En adelante, cualquier sustancia que contenga alergeno se denominará simplemente como alergeno, aunque se comprenderá que no todos los componentes de una sustancia que contenga alergeno son necesariamente alergénicos).

10 Es conocido preparar materiales de polen modificados con dialdehido, hidrosolubles o poco hidrosoluble, que son útiles en potencia para el tratamiento de pacientes alérgicos. Tambien es conocido preparar polímeros de ambrosía modificados con glutaraldehido hidrosoluble. Un estudio ulterior del antígeno E de ambrosía modificado con glutaraldehido sugiere que esta materia  
15 puede ser útil en la terapia de los sujetos alérgicos a la ambrosia.

20 El solicitante ha descubierto ahora que se pueden obtener materiales con contenido de alergeno tratados con dialdehido alifáticos saturado inferior y formaldehido mejorados por reacción en una primera fase a baja temperatura normalmente de unos 10°C, con formaldehido y/o un dialdehido, seguido preferiblemente, aunque no necesariamente, por una segunda fase a temperatura elevada, normalmente de unos 32°C, seguido, si fuera necesario,  
25 por fases adicionales a temperaturas similarmente elevadas,

donde se pueden utilizar discrecionalmente aminas, amino-ácidos y compuestos relacionados en cualquier fase o en una combinación de fases, y donde el formaldehído o cualquiera de los dialdehídos se pueden utilizar en cualquier combinación o secuencia en el proceso por etapas. Al referirnos a los nuevos alérgenos tratados con aldehído, el término "modificado con aldehído" quedará restringido a describir alérgenos modificados en los cuales se han establecido reticulaciones intermoleculares o intramoleculares entre las propias moléculas del alérgeno o dentro de las mismas y entre las moléculas del alérgeno u otras moléculas reactivas presentes en la mezcla de reacción.

También es conocida la toxoidación de toxina de la difteria purificada con formalina en bicarbonato sódico (0,5% peso/volumen) a un pH de 7,5. La toxoidación prosigue a temperatura ambiente y aparece como completa en tres o cuatro semanas juzgado por pruebas intracutáneas en cobayas. Las pruebas de falta de toxicidad (200 unidades Lf en un volumen de 5,0 cc inyectado subcutáneamente en cobayas) ha demostrado una parálisis tardía en todas las cobayas. La incubación a 30-32°C durante tres semanas más, después de la toxoidación aparecía completa a temperatura ambiente, daba un producto que, después que se había eliminado la formalina libre por ultrafiltración, no presentaba toxicidad, no obstante, des

pues del almacenamiento revertía al estado tóxico. Según estas enseñanzas, la tendencia a la reversión o inversión se evita por adición de diversas aminas y aminoácidos.

5

10

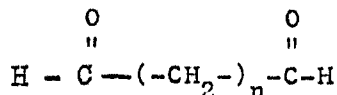
15

20

25

Brevemente, la presente invención describe nuevos derivados de alergeno tratados con formaldehído y con dialdehído alifático saturado inferior producido dejando que los alergenos reaccionen químicamente en condiciones suaves con los aldehídos diluidos incluyendo combinaciones de los mismos en una pluralidad de fases o etapas, preferiblemente la primera etapa a una temperatura baja de por encima del punto de congelación de la solución, y normalmente de unos 5° a unos 15°C, y la fase o fases subsiguientes a una temperatura o temperaturas del orden de aproximadamente 25° a 40°C, con la condición de que todas las reacciones que impliquen el empleo de formaldehído se lleven a cabo en un ambiente no fenólico. La reacción con combinaciones (mezclas) de aldehídos se puede llevar a cabo en una sola etapa.

Los alergenos así tratados se pueden hacer muy unificados, parcialmente unificados o como extractos crudos. Los dialdehídos tienen la fórmula:



donde n es del orden de 1 a 6. Según se emplea en la pre-

5           sente memoria, el término "aldehido" se refiere al formaldehido mencionado y a aldehidos alifáticos saturados inferiores como el glutaldehido (n=3), cualquiera de los cuales se puede utilizar solo o en cualquier combinación entre sí en el proceso progresivo.

10           El término "no fenólicos" significa que como máximo solamente habrán de existir trazas de compuestos fenólicos añadidos en el ambiente de la reacción del aldehido. No obstante, este último término no excluye la presencia de grupos hidroxifenólicos que se sabe que contienen de una forma natural los propios alérgenos, en la mayoría de los casos como parte de la estructura proteínica compleja.

15           El procedimiento de esta invención conduce a la producción de alérgenos tratados con aldehidos de baja reactividad alérgica en humanos alérgicos, porque conservan las propiedades inmunizantes deseadas de los alérgenos nativos (sin tratar) incluyendo, pero sin limitación, la capacidad de inducir cantidades sustanciales de anticuerpos de bloqueo, fuertemente interactivos con los alérgenos nativos, cuando se inyectan a seres humanos. La terapia prolongada con dichos alérgenos tratados con aldehido ha demostrado dar por resultado una supresión sustancial de los anticuerpos IgE del suero contra los alérgenos respectivos. Las dosis grandes terapéu-

20

25

ticamente eficaces de dichos alergen<sup>o</sup>s tratados con aldehido se pueden administrar a humanos alérgicos con un riesgo notablemente reducido de reacciones alérgicas sistémicas, si se compara con dosis grandes similares de alergen<sup>o</sup>s nativos, permitiendo que el doctor reduzca el número de inyecciones de alergen<sup>o</sup>s tratados con aldehido con relación a los de alergen<sup>o</sup>s nativos. Los alergen<sup>o</sup>s tratados con aldehido son también útiles para la inmunización de otros animales mamíferos para la finalidad de producción de anticuerpos de bloqueo.

Aún cuando no desea quedar limitado por teroría alguna, el solicitante cree que una de las razones principales del porqué los alergen<sup>o</sup>s modificados con aldehido son superiores a los descritos anteriormente consiste en la utilización de una temperatura baja de reacción en la primera fase o etapa. A esta temperatura baja, se produce una reticulación intermolecular e intramolecular lentamente sin desnaturalización perjudicial térmica o química de inmunodeterminantes inestables críticos en los alergen<sup>o</sup>s, cuyas reacciones perjudiciales son contrarias a la necesidad de conservar las propiedades deseadas de inmunización en el alergen<sup>o</sup> modificado con aldehido. Las reticulaciones resultantes estabilizan la molécula para reacciones ulteriores a mayor temperatura, que se pueden llevar a cabo en una o más etapas empleando

el mismo monoaldehido o dialdehido o uno diferente. Además, la utilización óptima de más de un dialdehido da lugar a una mayor flexibilidad en la secuencia de reacción de modo que los alergen<sup>os</sup> modificados con aldehido pueden llegar a ser menos alergenicos por medio de reacción con una variedad de aldehidos diferentes.

Esta invención tiene por objeto proporcionar nuevas clases mejoradas de alergen<sup>os</sup> modificados con aldehido.

Tambien la invención tiene por objeto proporcionar nuevas técnicas para la producción de dichos alergen<sup>os</sup> modificados con aldehido.

Estos y otros objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes por la descripción más detallada que sigue.

A pesar de no desear quedar limitados a teoría alguna, en las condiciones de reacción de esta invención, se cree que las reacciones de reticulación principales que comprenden formaldehido tienen lugar por el establecimiento de enlaces puente de metileno intermoleculares o intramoleculares entre amino por un lado y guanidino, acidamida y ciertos grupos aromáticos (especialmente residuos de tirosilo en proteínas) por otro lado. De nuevo, a pesar de no querer quedar limitados por teoría alguna, se cree tambien que las principales reacciones

de reticulación intermoleculares e intramoleculares que comprenden los aldehidos tienen lugar entre pares de grupos amino. La química de los dos tipos de reticulación es, por lo tanto, algo diferente, y la cinética del proceso de reticulación del dialdehido es apreciablemente más rápida que la que comprende formaldehido. Se observará además que cuando hay presente un aditivo apropiado en la mezcla de reacción, puede tener lugar una reticulación intermolecular extensa entre moléculas del alérgeno y el aditivo.

Quando se emplean alérgenos crudos, se deberán eliminar de preferencia aunque no necesariamente las sustancias grasas y materias no alérgénicas de bajo peso molecular en las sustancias nativas antes del tratamiento con aldehido.

Los preparados alérgénicos crudos que son particularmente idóneos para el tratamiento con aldehido se pueden preparar eliminando la grasa de la materia nativa que contiene alérgeno con éter dietílico exento de peróxido anhidro o éter del petróleo y extractando las materias exentas de grasa con una solución acuosa, preferiblemente tamponada a aproximadamente un pH de 6-8 (v.g.,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,125M). Las sustancias no alérgénicas de bajo peso molecular normalmente presentes, se pueden eliminar entonces del extracto por dialisis o ultrafiltración

a través de una membrana semipermeable (v.g., tubo Visking, membrana Millipore, dispositivo de fibra hueca Amicon de peso molecular apropiado normalmente del orden de 3000 a 10000 daltons y preferiblemente de 3000 a 5000 daltons),  
5 aunque se pueden emplear filtraciones de gel o un procedimiento similar con el que los expertos estén familiarizados para conseguir un resultado similar; como variante los materiales de elevado peso molecular se pueden precipitar sin desnaturación irreversible importante del extracto integral por un proceso de precipitación con sal o  
10 disolvente, y estos materiales de elevado peso molecular se pueden reconstituir a partir de los materiales precipitados en forma de solución acuosa. Las sustancias alergénicas purificadas, o parcialmente purificadas, se pueden  
15 preparar por cualquiera de los procedimientos empleados comúnmente para purificación de macromoléculas a partir de mezclas complejas. Se han descrito procesos de purificación apropiados en la literatura para alergenos de pescado, polen de ambrosía, polen del centeno y de la alfalfa,  
20 hongos, motas de polvo casero y veneno de los insectos, aunque estos no son los únicos procedimientos ni los únicos materiales alergénicos que se pueden emplear en el proceso de tratamiento con aldehido.

La presente invención no queda restringida a ningún material o extracto que contenga aler-  
25

geno en particular. No obstante, los materiales del polen de las plantas que contienen alergeno, particularmente los de hierbas, árboles y plantulas importantes en la aler-  
gia, se pueden extractar y tratar con éxito con los alde-  
5 hidos según la invención. Ejemplos de polenes procedentes de la familia de las hierbas (Graminae) que son útiles en la práctica de esta invención comprenden festuca del prado (Festuca elatior), graminea de Kentucky (Poa pratensis),  
y pata de gallo (Dactylis glomerata) de la tribu Festuceae;  
10 centeno pareneial (Lolium perenne) y cespel italiano (Lolium multiplorum) de la tribu Bordeae; alfalfa (Phleum pratense) y Agrostideae (Agrosti palustri) de la tribu Agrostideae; y veneno dulce (Antoxantum odoratum) de la tribu Phalaridae. Como ejemplos comparables de tres pole-  
15 nes se citan varias especies de nuez, como Juglans californica, de abedul (v.g. Betula alba), de roble (v.g., Quercus alba) y de álamo (v.g. Ulmus parvifolia). Los polenes útiles de malas hierbas comprenden la ambrosia corta (Ambrosia elatior), ambrosia alta (ambrosia trifida), cardo ru-  
20 so (Salsola pestifer), artemisa común (Artemisi tridentata) y el plátano inglés (Plantago lanceolata). Otras materias alergénicas que se pueden tratar comprenden: Extractos que contengan cuerpos integrales y/o excreta o secreta de motas de polvo casero del género Dermatofagoides y géne-  
25 ros relacionados, comprendiendo dichos extractos los ex-

tractos crudos de polvo casero; soluciones de alergenos de productos alimenticios (v.g., extractos de frutos secos, legumbres, huevos de gallina, etc.); extractos de hongos (v.g., Alternaria, Penicillium, Aspergillus, Helmin-  
5 tosporium, levaduras, basidiosporas, ascosporas, etc); extractos de semillas y fibras de plantas (v.g., algodón, ricino, etc.); extractos de cuerpos integrales o venenos de insectos con aguijón o picadores (v.g., abejas, avis-  
pas, avispones y mosquitos); y extractos de caspa/piel/  
10 pelo de animales (v.g., gatos, perros, caballos, cobayas, ratones, conejos, etc.).

Los alergenos muy purificados o par-  
cialmente purificados se pueden tratar tambien con alde-  
hido, por ejemplo, alergeno de polen del heno del grupo  
15 I, antígeno E de polen de ambrosía, extractos de polvo casero parcialmente purificados y fosfolipasa-A del veneno de la abeja.

La reacción entre los materiales  
alergénicos crudos o muy purificados y el aldehido o al-  
20 dehdos se pueden llevar a cabo en presencia de un aditi-  
vo de bajo peso molecular. Los aditivos apropiados que  
suelen contener menos de unos 8 átomos de carbono además  
de cualquier grupo funcional presente, comprende: Diamina-  
nas alifáticas, guanidinas, acidaminas alifáticas, áci-  
25 dos carboxílicos alifáticos que contienen grupos amino,

incluyendo aminoácidos alifáticos (ácidos monoamino monocarboxílicos, ácidos monoaminos carboxílicos y ácidos diamino monocarboxílicos), ácidos hidroxiamino alifáticos, y ácidos diamino dicarboxílicos alifáticos; y compuestos alifáticos que contienen combinaciones de permutaciones de uno o más grupos amino, guanidino y acidamino. Además, puede haber presente un número limitado de grupos hidroxilo en cualquiera de los tipos de compuestos mencionados. Las especies comprende 1,4 - diaminobutano, lixina, ácido 1,5-diaminopimelico, arginina, adiparmida, ácido aspártico, serina y alamina. El aditivo ha de ser de tal naturaleza que se combine químicamente con los componentes del polen durante el proceso del tratamiento con aldehído.

Por cada etapa del proceso, las concentraciones de alérgeno, aldehído y cualquier aditivo presente en la mezcla de reacción y el pH y periodo de incubación de la mezcla de reacción que dan por resultado condiciones óptimas del tratamiento con aldehído son interdependientes en cierto grado. Las condiciones siguientes son preferibles, estando sujeta cada condición a mantener otras condiciones dentro de límites apropiados para conseguir un alérgeno tratado por aldehído conveniente.

La concentración final de los materiales alérgénicos empleados para la reacción con aldehído

deberá ser preferiblemente: (1) De tal naturaleza que todos los componentes sean completamente solubles, y (2) compatibles con la concentración de aldehído y cualquier aditivo empleado. Cuando se trata de reacciones de formaldehído, las soluciones deberán prepararse en un tampón acuoso o reactivo compensador preferiblemente de un pH de 7,4 a 7,6 aproximadamente de molaridad apropiada para mantener este pH a aproximadamente 7,2 - 7,6 durante el curso de la reacción con el fin de hacer óptima la aparición de las reacciones de aldehído deseadas. Las concentraciones de aproximadamente hasta 12 mg/cc de materiales alergénicos (basadas en el peso en seco de sólidos/cc) en compensador de fosfato sódico 0,1M con un pH de 7,5<sup>±</sup> 0,1 suelen cumplir las exigencias mencionadas dependiendo la elección de la concentración de alérgeno en cierto grado de la temperatura de incubación y la concentración de aldehído.

Cuando se trata de reacciones de aldehído, el pH de las soluciones de reacción deberá ser preferiblemente de 7,0 a 8,0 y la concentración de alérgeno de 1,0 a 2,0 mg/cc.

La concentración de aldehído o aldehídos de la mezcla de reacción no deberá ser tan grande que afecte perjudicialmente a las propiedades inmunizantes deseadas del alérgeno resultante tratado con aldehído,

pero si suficientes para dar por resultado una destrucción extensa de la alergenicidad del alergeno nativo a la temperatura particular de la mezcla de incubación. La reducción resultante en alergenicidad suele ser del orden de 100 a 10.000 veces seguido de la finalización del proceso progresivo. Además de los factores mencionados, las gamas de concentración de aldehidos preferibles varían de acuerdo con la pureza del alergeno tratado en el sentido de que el extremo inferior de las gamas o límites especificados se utilizan del modo más apropiado con materiales muy purificados.

#### PREPARADOS DE ALERGENO

Cuando se trata de extracto alérgico, se eliminan materias grasas de la fuente de alergeno desecada (polen, caspa, hongos, etc.) por extracción con eter de petróleo desecado o dietileter desecado exento de peróxido. La materia alérgica exenta de grasa se extrae a una temperatura de 0° a 5°C por espacio de 15 minutos a 4 días con una solución tamponada apropiada (v.g.,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,125M) a un pH de 6,0 a 8,0. La duración de tiempo depende del tipo de extracto deseado y la naturaleza de la fuente de alergeno. El material sólido se elimina por filtración, centrifugación, o un proceso similar. Más del 90% de materiales de peso molecular bajo (esencialmente no alérgicos) se eliminan del extracto por dialisis

o ultrafiltración a través de una membrana o un dispositivo de fibra hueco (peso molecular 3.000 a 5.000 daltons) o por filtración con gel. La solución de alérgeno se pone a una concentración apropiada en términos de peso en seco del material que contiene alérgeno en estado sólido por cc (normalmente 1,5 a 2,0 veces el presente en la fase uno, que se expone más adelante), por ultrafiltración y dialisis contra un tampón, o liofilización y reconstitución en el tampón, por ejemplo fosfato sódico 0,1M ajustado a un pH de  $7,5 \pm 0,1$ .

Los alérgenos purificados o parcialmente purificados se preparan también en el mismo tampón para las reacciones que se describen a continuación.

Resumen de condiciones de las reacciones:

Formaldehído, fase una:

Concentración de alérgeno, 0,1 a 12,0 mg/cc; concentración de formaldehído 0,5 a 2,5M; temperatura 5 a 15°C, preferiblemente unos 10°C; pH 7,2 a 7,6; tiempo 8 a 32 días.

Formaldehído, fase "n" (donde  $n > 1$  y generalmente  $n=2$ )

Concentración de alérgeno, 1,0 a 3,0 mg/cc; concentración de formaldehído 0,36 a 0,5M; temperatura aproximadamente 25 a 40°C, preferiblemente 30 a 34°C; pH 7,2 a 7,6; tiempo 16 a 35 días.

Dialdehído, fase una:

Concentración de alérgeno, 1,0 a 2,0 mg/cc; concentración de alérido de 0,01 a 0,1M, preferiblemente 0,25M aproximadamente; temperatura 5 a 15°C, preferiblemente unos 10°C; pH aproximadamente 7,0 a 8,0; tiempo 4 a 24 horas, preferiblemente 16 a 20 horas.

5

Dialérido, fase "n" (donde  $n > 1$  y generalmente  $n=2$ ).

Concentración de alérgeno 1,0 a 2,0 mg/cc; concentración de alérido 0,01 a 0,1M, preferiblemente 0,025M; temperatura aproximadamente 25 a 40°C preferiblemente de unos 30°C; pH aproximadamente 7,0 a 8,0; tiempo 16 a 32 horas, preferiblemente de unas 24 horas.

10

Al final de la incubación ó incubaciones, se elimina el exceso de aléridos por uno de los métodos siguientes: Dialisis extensa con varios cambios en el dialisato empleando una envoltura de celulosa como Visking de tamaño 18 dialisi/ultrafiltración extensa por membrana utilizando una membrana de Millipore, Amicon o equivalente o dispositivo de fibra hueca con un peso molecular de aproximadamente de 5.000 a 30.000 dlatons, o por filtración en gel sobre un xerogel apropiado como Sephadex G10 o G25 aproximadamente a 4°C.

15

20

Según esta invención, la reacción se lleva a cabo en una o más etapas, preferiblemente dos etapas. Cuando se utilizan dos o más etapas o fases, la

25

primera se distingue de las fases posteriores por las temperaturas diferentes empleadas. Cuando se trata de reacciones de fases múltiples, la secuencia de las reacciones se puede realizar con (a) formaldehído en la primera y fases posteriores, (b) con un dialdehído particular en la primera y fases posteriores, (c) con un formaldehído en la primera y un dialdehído particular en fases posteriores, (d) con un dialdehído particular en la primera y formaldehído en fases posteriores, (e) con cualquier combinación de formaldehído y uno o más dialdehídos en una serie de fases. Las combinaciones preferibles son generalmente los casos simples (e) o (b), pero los casos (c) y (d) ofrecen la ventaja de que una combinación de tipos diferentes de reacciones químicas empleando un protocolo relativamente sencillo. Las reacciones del tipo (e), a pesar de ser más complejas de realizar ofrecen las combinaciones de procesos de reacción que pueden dar lugar a la mayor reducción de propiedades alérgicas.

Las mezclas de formaldehído y dialdehído (normalmente glutaraldehído) se pueden utilizar en una serie de fases o etapas (normalmente dos). Esta forma de enfocar el problema elimina la eliminación del aldehído después de la primera fase antes de añadir el segundo aldehído. Como la reacción de dialdehído se completa esencialmente en unas 20 horas, la mezcla se puede

transferir entonces a la segunda fase para permitir una reacción más extensa que tenga lugar con el formaldehído. La concentración de alérgeno se mantiene completamente a aproximadamente 1,0 a 2,5 mg/cc, formaldehído a 0,36 a 0,5M y dialdehído a aproximadamente 0,025M, a un pH de 7,2 a 7,6. La primera fase se realiza en 4 a 24 horas (preferiblemente 16 a 20 horas) a una temperatura de 5 a 15°C (preferiblemente unos 10°C) y la segunda fase por espacio de 16 a 32 días a una temperatura de 30 a 34°C.

En la primera fase, la reacción se efectúa a una temperatura superior al punto de congelación de la solución (siendo la gama más eficaz del orden de 5 a 15°C) y preferiblemente a unos 10°C. La fase o fases ulteriores se llevan a cabo a una temperatura de aproximadamente 25°C a 40°C y preferiblemente a una temperatura de 30 a 34°C. La adhesión a esta secuencia de temperaturas ha demostrado aumentar sustancialmente la eficacia del producto final para la inmunización de personas alérgicas.

En el caso del procedimiento preferible en dos etapas, la primera etapa a menor temperatura se lleva a cabo generalmente en un periodo de unos 8 a 32 días en el caso del formaldehído y aproximadamente 20 horas en el caso de los dialdehídos, aunque en el último caso se pueden emplear periodos de incubación más cortos

de 4 horas. La duración de la segunda etapa es generalmen-  
te de 14 a 35 días con formaldehído y de aproximadamente  
24 horas con dialdehído.

5 Esta invención tiene aplicación con  
formaldehído, con todos los dialdehídos alifáticos satu-  
rados inferiores, particularmente glutaraldehído, y dial-  
dehído de la fórmula general  $(\text{CH}_2)_n \begin{matrix} \text{CHO} \\ \diagup \\ \diagdown \\ \text{CHO} \end{matrix}$  donde  $n = 1$  a 6  
y sus isómeros de cadena ramificada y precursores, y mez-  
clas de los mismos.

10 Los alérgenos tratados con aldehído,  
preparados como se ha descrito, son agentes inmunotera-  
péuticos apropiados para los mamíferos, incluyendo los  
seres humanos alérgicos. Un adyuvante como puede ser un  
alumbre o un alginato se pueden incorporar en el prepa-  
15 rado inmunizante deseado para mejora la eficacia immuno-  
génica. Los alérgenos tratados con aldehído se pueden  
emplear en pruebas diagnósticas antes de la inmunotera-  
pia o durante la inmunoterapia de seres humanos alérgi-  
cos.

20 Los alérgenos tratados con aldehído  
de esta invención se pueden administrar a mamíferos de  
una forma normal por ejemplo por vía intradermal, subcu-  
tánea o intramuscular. Además, la baja alérgenicidad de  
estos materiales permite la administración en forma de  
25 un aerosol en el morro y/o la boca para conseguir la in-



precipitado, se liofilizó y almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  en un recipiente hermético al aire hasta su utilización.

El extracto de alergen dializado (1) o (2) a 2 mg/cc se incubó con solución de formaldehído al 0,5M por espacio de 14 a 18 días a  $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  en  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  de 0,1M a un pH de  $7,5 \pm 0,1$  (tampón A), se transfirió directamente a una incubadora  $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y se incubó por un periodo adicional de 14 a 18 días. El exceso de formaldehído se eliminó por diálisis contra tampón A, agua salina tamponada fisiológica o agua destilada (vease la explicación más adelante).

#### EJEMPLO II

El extracto de alergen dializado (1) (2 mg/cc) se incubó con una solución de formaldehído 0,5M por espacio de 30 a 35 días a  $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y un pH de  $7,5 \pm 0,1$  en tampón A, se transfirió directamente a una incubadora a  $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y se incubó durante un periodo adicional de 30 a 35 días. El exceso de formaldehído se eliminó por diálisis contra tampón A, agua salinas tamponadas fisiológica o agua destilada.

#### EJEMPLO III

El extracto de alergen dializado (2) (2 mg/cc) se incubó con solución de formaldehído 0,5M por espacio de 8 días a  $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y pH 7,5 en tampón A, se transfirió directamente a una incubadora a  $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y se

incubó durante un periodo adicional de unos 32 días. El exceso de formaldehido se eliminó por dialisis contra el tampón A, aguas salinas tamponadas fisiológica o agua destilada.

5

EJEMPLO IV

El extracto de alergeno dializado (1) o (2) (10 mg/cc) se incubó con solución de formaldehido 2M por espacio de 14-18 días a  $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . La solución se diluyó cuatro veces (v.g., a 2,5 mg/cc de ambrosía y 0,5M formaldehido). La solución se reincubó por espacio de 14-18 días a  $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Se eliminó el exceso de formaldehido por dialisis contra tampón A, agua salina tamponada fisiológica o agua destilada.

10

EJEMPLO V

Se incubó el extracto de alergeno dializado (1) o (2) (8 mg/cc) con solución de formaldehido 2M por espacio de unos 14 a 18 días a  $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . La solución se diluyó cuatro veces (v.g., a 2,0 mg/cc de ambrosía y 0,5M formaldehido). La solución se reincubó por espacio de 14 a 18 días a  $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . El exceso de formaldehido se eliminó por dialisis contra tampón A, agua salina tamponada fisiológica o agua destilada.

15

20

EJEMPLO VI

Un extracto de alergeno dializado (1) de polen de ambrosía corta (2 mg/cc) se incubó con

25

solución de formaldehído 2M por espacio de 14 a 18 días a  $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  a pH  $7,5 \pm 0,1$  en tampón de fosfato sódico 0,1M (tampón A); la solución se dializó extensamente a 4 C contra varios cambios en tampón A para eliminar el formaldehído; se añadió lentamente formaldehído adicional (12,3M) para hacer solución 0,36M con respecto al formaldehído; y la solución se reincubó por espacio de 16 días a  $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y pH  $7,5 \pm 0,1$ . El exceso de formaldehído se eliminó por dialisis contra tampón A o agua salina tamponada fisiológica.

#### EJEMPLO VIII

Se incubó extracto de alergeno dializado (1) y (2) (2 mg/cc) con glutaraldehído 0,025M en tampón A por espacio de 18 horas a  $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . El exceso de glutaraldehído se eliminó por dialisis contra tampón A. Se añadió solución de formaldehído a la solución de alergeno tratado con glutaraldehído para hacerla 0,5M con respecto al formaldehído. Esta mezcla se reincubó entonces por espacio de unos 21 días a  $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . El exceso de formaldehído se eliminó por dialisis al final del experimento.

#### EJEMPLO IX

Se incubaron extractos de alergeno dializados (1) o (2) (2 mg/cc) con glutaraldehído (0,025M) a  $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por espacio de 20 horas y  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por espacio

de 24 horas a pH  $7,5 \pm 0,1$  en tampón A. El exceso de glutaraldehído se eliminó por dialisis contra tampón A o solución salina tamponada fisiológica al final del experimento. Se investigaron otras concentraciones de glutaraldehído (del orden de 0,0005 a 0,1M), pero se averiguó que con 0,025M se obtenía el mejor producto en términos de actividad alergénica y retención de las propiedades inmunizantes deseadas.

EJEMPLO X

Se desgrasó polen de ambrosía corta desecada (*Ambrosia elatior*) por extracción con Soxhlet empleando eter de petróleo. La acción de reflujo continuó hasta que el eluyente quedó libre del color impartido por el polen. El polen se secó al aire, se pesó y almacenó en recipientes herméticos a una temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$  a  $-30^{\circ}\text{C}$ . Se añadieron al polen 5 cc de tampón de bicarbonato amónico 0,125M por gramo de polen desgrasado y la mezcla se extractó con agitación constante a una temperatura de  $0^{\circ}$  a  $5^{\circ}\text{C}$  por espacio de 18 a 26 horas. Después de esta primera extracción, el extracto se eliminó de los granos de polen por filtración y la torta de polen se volvió a extractar con cuatro cc de tampón/gm de polen (peso inicial) por espacio de 2 a 4 horas a una temperatura de  $0^{\circ}\text{C}$  a  $5^{\circ}\text{C}$ , seguido por aclarado de 1 cc de tampón/gm de polen. Los tres extractos se combinaron y diali

zaron en tubo de celulosa sin costura tamaño 18 Visking  
contra un volumen 35 veces mayor de bicarbonato amónico  
0,002M durante 30 a 40 horas. Se llevó a cabo dialisis  
adicional de 12 a 14 horas contra agua destilada. El ex-  
tracto se filtró a través de una serie de filtros, fina-  
lizando con filtración esteril a través de un filtro de  
0,45 micrómetros. El extracto esteril se liofilizó y se  
pesó. La incubación de este extracto dializado (10 mg de  
sólidos de polen/cc) se realizó empleando formaldehido  
2M en tampón de fosfato sódico 0,1M a un pH de 7,2 a 7,6  
por espacio de 12 a 18 días a  $10^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ . La solución resul-  
tante se diluyó cuatro veces en el tampón de fosfato 0,1M  
y se incubó a un pH de 7,2 a 7,6 durante 18 a 24 días a  
 $32^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ . La solución resultante se dializó en envoltura  
Visking tamaño 47'62 mm. de diámetro contra 2 volú-  
menes de 35 veces de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,002M. La solución se com-  
probó para verificar la ausencia de formaldehido, se con-  
centró empleando un sistema de Millipore Pellicon Casset-  
te, se filtró por filtración esteril y se liofilizó.

En cada uno de los ejemplos anterior-  
res, las incubaciones y dialisis se realizaron empleando  
tampón de fosfato sódico 0,1M, pH  $7,5 \pm 0,1$  y todas las  
soluciones se dializaron extensamente a aproximadamente  
 $4^{\circ} \text{C}$  contra varios cambios de grandes volúmenes de dializa-  
to para eliminar el aldehido sin reaccionar al final de

cada experimento. Las soluciones se almacenaron congeladas o, en varios casos, los alergenos modificados por aldehido se liofilizaron a partir de soluciones acuosas, procedimiento que da lugar a spolidos esencialmente exen-  
5 tos de aldehido con características de almacenamiento excelentes para largo plazo.

EJEMPLO XI

Alergeno. Se adquirió polen de ambrosía corta (Ambrosia elatior) de Greer Laboratories y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  en  
10 un recipiente hermético al aire hasta su utilización. El polen (150 gm) se desgrasó por 8 extracciones sucesivas con porciones de 1 litro de eter dietilico anhidro exento de peróxido (J.T. Baker Co) que permitía la eliminación de todo el material graso de color. Se dejó secar el  
15 polen y se evaporaron las trazas de eter in vacuo hasta el día siguiente. El polen desgrasado se extractó entonces a  $4^{\circ}\text{C}$  con suave agitación por espacio de 18 horas con 1,5 litros de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,125M y el polen se separó del sobrenadante por centrifugación. El extracto sobrenadante  
20 (1185 cc) se sometió a dialisis extensa en envoltura de celulosa tamaño 18 Visking (Union Carbide Cop) contra  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,002M (5x72 litros) y finalmente contra agua destilada ( 2 x 72 litros) en un periodo total de 4 días a  $4^{\circ}\text{C}$ . El extracto dializado se centrifugó para eliminar  
25 una pequeña cantidad de precipitado y se liofilizó (ren-

dimiento = a 14,104 gm). Este material, que se denominará "Alergeno de polen de Ambrosía, lote 11RWC", se almacenó -20°C en un recipiente hermético al aire hasta utilizarse.

5 Alergioide. Una parte del alergen<sup>o</sup> liofilizado se sometió a modificación por formaldehido mediante el "procedimiento de dos etapas" (preparado mezclando entre sí volúmenes apropiados de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1M (ambos de grado reactivo Baker) para dar un pH final de 7,50). El alergen<sup>o</sup> de polen de ambrosía (13,603 gm) se disolvió en tampón de fosfato 0,1M, pH 7,50 (453,4 cc) para dar una solución que contenía 30 mg de sólidos de polen por cc.

10 Esta solución se dializó (en tubo Visking tamaño 18) contra el tampón de fosfato (11,2 litros) por espacio de 24 horas a 4°C. Después de la dialisis el volumen final de la solución de alergen<sup>o</sup> se ajustó a 907 cc (15 mg de sólidos de polen/cc con tampón de fosfato 0,1M a pH 7,50).

15

La mezcla de reacción siguiente se preparó a 4°C. Una solución de formaldehido de 10 moles (270 cc) (preparado por dilución de formaldehido de grado reactivo (Fisher Scientific Co. 37% peso/peso) con agua desionizada). Se añadió muy lentamente y con cuidado con agitación constante a 900 cc de solución de alergen<sup>o</sup>, evitando concentraciones elevadas localizadas de formaldehido. El pH de la solución se verificó totalmente

20

25

y se añadió un total de 6,5 cc NaOH 2M (Baker Co) durante la mezcla para mantener el pH a  $7,50 \pm 0,1$ . El volumen final de la mezcla de reacción se ajustó a 1.350 cc empleando 170 cc de tampón de fosfato 0,2M a pH 7,50, 1,1 cc de NaOH 2M y 2,5 cc de tampón de fosfato 0,1M a pH 7,50, para obtener una solución que tenía la composición siguiente: Sólidos de polen, 10 mg/cc; formaldehído 2,0M; fosfato, aproximadamente 0,1M, a un pH de 7,50 medido a  $10^{\circ}\text{C}$ .

La solución anterior se incubó por espacio de 16 días a  $10^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}$ , en cuyo momento el pH se había reducido a pH 7,41. Después de esta primera incubación, la solución se diluyó 4 veces con fosfato 0,1M a pH 7,50 y se incubó a  $32^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante 16 días más. El pH inicial para esta segunda incubación era pH 7,49 (medido a  $32^{\circ}\text{C}$ ) y pH final era de 7,47 (a  $32^{\circ}\text{C}$ ). La solución alérgoide resultante se dializó sucesivamente contra 4 x 72 litros de agua desionizada a  $4^{\circ}\text{C}$  para eliminar formaldehído y sales de tampón. Se eliminó precipitado en trazas por centrifugación y la solución resultante se liofilizó, sirviendo no solamente para preparar un material seco estable sino también para eliminar trazas diminutas residuales posibles de formaldehído. El rendimiento de "alérgoide de polen de ambrosía, 11RWF" era de 13,135 gm (97,3% teórico). El alérgoide se almacenó a

20°C en un recipiente hermético al aire hasta que se utilizó.

Preparación de soluciones para inmunoterapia. Se prepara-

ron soluciones en términos "unidades de alergen/cc" o

"unidades de alergioide" donde la unidad de alergioide

era 50 veces mayor que la unidad de alergen en términos

de sólidos de polen y "equivalentes de antígeno E/cc

(AgE equiv./ml)". En el caso del alergen, se refiere al

contenido de antígeno E; en el caso del alergioide se re-

fiere al contenido de antígeno E en el alergen a partir

del cual se deriva (el antígeno E no es directamente men-

surable en el alergioide). Basados en experiencias pre-

vias se preparó la solución de material de alergenó

11RWC (1.000/cc) para contener 10 microgramos AgE equiv/

cc (0,28 mg de sólidos de polen no dializables/cc). De

un modo similar, la solución de material de alergioide

11RWF (1.000 unidades/cc) se preparó a 500 microgramos

AgE equiv/cc (14,1 mg sólidos de alergioide/cc). La solu-

ción de material de alergenó y alergioide se filtraron por

filtración estéril a través de una unidad de filtro Nage-

ne equipado con una membrana del tamaño de poro 0,45 mi-

crómetros (Nalge Sybron Corp, Rochester, N.Y.) y cada so-

lución se distribuyó ulteriormente en viales esteriles

aproximadamente 10 cc de contenido. Se preparó de este

modo un total de 30 viales de alergenó y 23 viales de



alergioide, distintas a las sometidas a prueba de esterilidad, se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

Las pruebas de toxicidad generales en las soluciones de alergen y alergioide se realizaron empleando el método de valoración descrito en "Párrafo 610.11, seguridad" de las reglas y reglamentaciones FDA. Estas pruebas se realizaron en ratones y cobayas bajo la dirección de Irving Levenstein, p.H.D, Leberco Laboratories, 123 Hawthorne Street, Roselle Park, N.J. Cada ratón recibió 0,5 cc y cada cobaya 5 cc de solución de alergen o alergioide administrados por vía intraperitoneal. Los resultados de estas pruebas no demostraron evidencia de toxicidad en el caso del alergen o el alergioide, evidenciado por no existir una pérdida de peso 7 días después de la inyección de los materiales.

Análisis inmunoquímicos. Se realizaron análisis del contenido de alergen de ambrosia, antígeno E, Ra3 y Ra5 en alergen de polen de ambrosia, lote 11RWC, por inmunodifusión radial (Baer, H, Maloney, C.J., Norman, P.S. y Marsh, D. G., 1974, J. Allergy Clin, Immunol. 54:157-164) empleando antisuero específico y antígenos de referencia. La referencia de antígeno E era el material NIH purificado adicionalmente por cromatografía Sephadex G75 y la referencia Ra3 procedían del Doctor Lawrence Goodfriend, McGill University, Montreal. La referencia de



los estudios anteriores han revelado que la inmunoterapia con extractos de ambrosía incluye en la respuesta inmunológica ulterior, cualquier tratamiento anterior con extracto de ambrosía sirvió automáticamente para excluir los pacientes del estudio. Finalmente todos los pacientes se juzgaron como buenos candidatos para estudio en término de empleo y estabilidad emocional.

Los pacientes se emparejaron en 7 parejas de acuerdo con sus sensibilidades de tratamiento previo de liberación de histamina de leucocitos y pruebas de la piel al alérgeno y alérgoide y niveles totales de suero IgE.

Régimen de tratamiento. Se programaron los pacientes para el tratamiento entre finales de Mayo y mediados de Agosto de 1977. En el primer día de tratamiento (día 0), recibieron inyecciones de una a 5 en cantidades en aumento de alérgeno o alérgoide en periodos de 30 minutos a 2 horas hasta los granos locales y reacciones de eritema o síntomas histéricos indicaban que la dosis estaba próxima al nivel tolerado. Se tomó un registro completo de inyecciones y reacciones locales y sistémicas inmediatas por cada paciente por parte del Doctor. El paciente registró reacciones locales retardadas en los lugares de la inyección y síntomas sistémicos (si es que aparecieron). Todos los pacientes se dispusieron de consulta médica durante

5 el periodo de 24 horas siguiente a las series de inyecciones y la información en cada forma fue confirmada por entrevista por teléfono con cada paciente. Todas las reacciones locales se graduaron de acuerdo con su intensidad máxima que normalmente tenía lugar a unas 24 horas después de la inyección. (La información concerniente al grado de reacciones locales y sistémicas se da en la nota al pie de la tabla V).

10 Después de la primera sesión de inyecciones se midió el anticuerpo IgG del suero a antígeno E a intervalos de aproximadamente 4 a 14 días y se dieron una segunda y ulteriores sesiones según alcanzaban las respuestas del anticuerpo niveles predominantes en los pacientes. Las reacciones a las inyecciones se registraron en cada ocasión según se ha descrito. Seis pa-  
15 cientes tratados con alergen y seis pacientes tratados con alergioide cumplieron con nuestro régimen de estudio, recibiendo cada uno cuatro o cinco sesiones de inyecciones entre finales de Mayo y mediados de Agosto  
20 de 1977 (Tablas I y II).

TABLA I

Dosis y números de inyecciones por sesión para pacientes tratados con alérgeno

párrafo y número	Paciente	Sesiones					Totales acumulati- vos
		1	2	3	4	5	
		Unidades de alógeno (no. de inyecciones en pa- rajas)					
1.	E.E.	6(4)+	15(2)	10(1)	60(2)	50(1)	141(10)
2.	L.L.	31(4)	170(3)	50(1)	350(3)	1200(3)	1801(14)
3.	M.K.	31(4)	70(2)*	50(2)	50(1)*	30(1)	231(10)
4.	G.J.	6(3)	15(2)	10(1)	60(2)*	20(1)	111(9)
5.	B.D.	4(5)	17(3)	70(2)	150(2)*	100(2)	341(14)
7:	L.D.	36(4)	164(3)	200(1)	700(2)	500(1)	1601(11)
	Promedio	19(4.0)	75(2.5)	65(1.3)	228(2.0)	317(1.5)	704(11.3)†
Desestimaciones:							
6	S.B.	31(4)	170(3)*	25(1)	-	-	226(8)

\* Reacción sistémica

† Dos inyecciones por día se administraron en dos días sucesivos.

‡ El promedio de dosis acumulativa para todos los pacientes, excluyendo S.B., = 7,04 mg AgE equivalente.

TABLA II

Dosis y números de inyecciones por sesión de pacientes tratados con el alérgicoide

		Sesiones						
Pareja no.	Pacientes	1	2	3	4	5	Totales acumulativos	
		Unidades de alérgicoide (No. de inyecciones en parejas)						
5	1.	E.F.	31(4)	170(3)	100(1)	200(2)	200(2)	701(12)
	2.	D.H.	16(4)*	2(1)	5(2)	16(3)	- <sup>¶</sup>	40(10)
	3.	G.D.	32(4)	70(2)	125(2)	310(2)	1200(3)	1737(13)
	4.	J.B.	31(4)	170(3)	70(2)	300(2)	1200(3)	1771(14)
	5.	J.K.	37(4)	70(2)	150(2)	300(2)	300(2)	857(12)
10	7.	M.B.	32(3)	170(3)	300(2)	1200(3)	- <sup>¶</sup>	1702(11)
		-	30(3.8)	109(2.3)	125(1.8)	388(2.3)	725(2.5)	1135(12) <sup>‡</sup>
Destimaciones								
6	6	P.J.	26(4)	5(1)	6(2)	5(1)	-	42(8)

\*Reacción sistémica

¶ No se dió la quinta sesión de inyecciones.

15 ‡ Dosis acumulativa por término medio de todos los pacientes, excluyendo P.J. es igual a 567,35 mg AgE equivalentes.

Valoraciones de alérgenicidad relativa, alérgicoide/alérgico.

20 Las alérgenicidades relativas del alérgicoide al alérgico en nuestros sujetos de estudio se determinaron por valoración de histamina de leucocitos (Marsh, D.G., Lichtenstein, L.M. and Campbell, D.H. 1970, Inmunology, 18: 705-722) y valoración de piel de punto

25 final intradérmica cuantitativa (Norman, P.S. 1976, en:

Manual de inmunología Clínica (eds. N.R. Rose and H. F. F. redman), American Soc, for Microbiol, Washington, D.C. páginas 585). La relación de sensibilidad de los leucocitos de cada paciente se expresó como la relación de concentraciones de alérgicoide/alérgeno que producían una vibración del 50% de histamina de los leucocitos del paciente. Su relación de sensibilidad a las pruebas cutáneas era la relación de las concentraciones de alérgicoide/alérgeno que producían dos o más (8 a 10 mm diámetro de grano con eritema) en puntos finales de pruebas cutáneas.

Valoraciones de IgE de sueros totales. La medición del suero total IgE en un tratamiento previo y tres tratamientos posteriores de suero de todos los pacientes se realizó por un procedimiento de "RIST directo" desarrollado por Schelleberg and Adkinson (Schelleberg, R.R. and Adkinson, N.F. 1975. J. Immunol 115:1577-1583). El método era similar al método "PRIST" de Wide (Wide, L. 1971 En: Métodos de radioinmunovaloración (eds. K.E. Kirkham and W.M. Hunter), Livingstone, Edinburgo, página 173), excepto que la primera página de la valoración utilizaba anticuerpo específico anti-IgE (realizado en una cabra) acoplado a Sepharose 4B en lugar de disco de papel. Después de la incubación del suero del paciente con glóbulos inmunoabsorbentes de Sepharose, los glóbulos se lavaron y se incubaron ulteriormente con anti-IgE de conejo irradiado (anti-

cuerpo purificado específico de cadena E). Los glóbulos se lavaron entonces de nuevo y se contaron en un contador gamma. Las cuentas se compararon con las obtenidas con valoraciones en serie empleando suero de control de contenido de IgE conocido. Los experimentos anteriores se realizaron todos por duplicado con controles apropiados positivos y negativos y tres sueros normales internosáon contenido de IgE conocidos. Asimismo cada valoración se repitió al menos una vez y se repitieron los valores discrepantes (que diferían entre sí  $\pm$  10%) hasta que se obtuvieron valores con  $\pm$  10%.

Valoración de anticuerpo de IgG de suero a antígeno E.

Se midió anticuerpo de inmunoglobulina G a antígeno E empleando un procedimiento de radioinmunovaloración de anticuerpo doble altamente sensible similar al descrito por Black et al (Black, P.L. Marsh, D.G., Jarrett, E. Delepesse, G.J. and Biasm W.B. 1976. Immunogenetics 3:349-368). Se irradió antígeno purificado E con  $^{125}\text{I}$  por el procedimiento de Cloramina T, se ultracentrifugó para eliminar microagregados y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  en pequeñas partes alicuotas hasta que se empleó. Se incubaron diluciones dobles seriales apropiadas de suero normal (de un sujeto alérgico que se había tratado extensamente con extracto de ambrosía), el suero de pacientes del estudio y controles o testigos apropiados con la can-

5            tidad constante del antígeno E irradiado (aproximadamen-  
te 1,2 nanogramos a una concentración de 6,2 ng/cc) por  
espacio de cinco horas a 23°C. Con el fin de aumentar la  
sensibilidad de la valoración a bajas concentraciones  
de anticuerpos, el aglutinamiento no específico de radiac-  
10            tividad (principalmente a los tubos de ensayo de plásti-  
co) se redujo recubriendo a los tubos de ensayo con albu-  
mina de suero de bobino 0,3% (peso/volumen y diluyendo  
el antígeno irradiado en 5% de albumina (peso/volumen)).  
15            Todas las muestras de suero se diluyeron 1:50 en dilu-  
ción salina tamponada con borato (BBS), pH, 8,0 y se rea-  
lizaron diluciones apropiadas adicionales en BBS que con-  
tenía 1:50 de suero humano normal desprovisto de anti-  
cuerpo al antígeno E. Los tubos de control negativos con-  
20            sistían en una dilución 1:50 de este suero normal. Des-  
pues de la incubación inicial, se precipitó suero IgG (y  
complejos de antígeno-anticuerpo aglutinados) por adi-  
ción de un ligero exceso de anti-IgG de cabra (fragmento  
anti-Fc) e incubación hasta el día siguiente a 4°C. Los  
30            precipitados resultantes se lavaron y se contaron y el  
suero de la prueba se comparó con la curva de control nor-  
mal. Todos los resultados se expresaron en "unidades ar-  
bitrarias de anticuerpo IgG/cc de suero" basado en la  
40            curva de suero de control. En estudios previos (Platts-  
50            Mill T.A.E., vonMaur, R.K., Ishizaka, K., Norman, P.S. adn

Lichtenstein, L.M. 1976 J.Clin. Invest 57:1041-1050) se demostró que el suero de control sin diluir se aglutinaba aproximadamente a 24 µg de antígeno E/cc en exceso de antígeno. En esta base se calculó que una de nuestras unidades arbitrarias podría aglutinarse a 1,3 ng de antígeno E en exceso de antígeno. Suponiendo que, en tales condiciones, existiera antígeno enlazado como Ag<sub>2</sub>Ab complejos, una unidad  $\approx$  2,8 ng anticuerpo. En las concentraciones de antígeno de limitación de nuestro ensayo, se aglutinaba o enlazaba menos antígeno y la concentración de anticuerpo eficaz que podía ser aproximadamente 3 veces menor. (Plastt-Mills T.A.E., Snajdr, M.J. Ishizaka, K. and Frankland, A.W., 1978, J. Immunol., 120:1201-1210.

Se analizaron de 14 a 16 muestras de suero de cada uno de los pacientes para completar el estudio y varias muestras de cada uno de los desestimados. O imperfecto. Para que los cambios en las valoraciones de anticuerpo de IgG pudieran valorarse rápidamente con el fin de obtener una medición apropiada de la secuencia de inyección, medimos esta respuesta de los anticuerpos en un periodo de aproximadamente 3 días después de extraer las muestras de sangre. Todos los ensayos se realizaron por duplicado en cada experimento y se repitieron en el experimento subsiguiente. Los ensayos se repitieron según fue necesario hasta obtener valores dentro

de  $\pm$  10%.

5 Química de la sangre y análisis de orina. Se realizaron mediciones de química de la sangre y análisis de orina antes de la inmunoterapia y aproximadamente de una a 14 semanas después de completarse la terapia. Se determinaron los análisis de sangre normales SMA-11 por medio del The Good Samaritan Hospital Clinical Laboratory utilizando procedimientos analíticos automáticos. Se realizaron análisis de orina en nuestro laboratorio de alergia.

10 Evaluación de síntomas. Se evaluaron los síntomas de fiebre del heno durante la polinación de la ambrosía por cada paciente dos veces al día en un registro normal. Se ha demostrado que las puntuaciones de síntomas diarios por término medio (Norman, P.S. and Winkenwerder W:L 1965 J. Allergy, 36:284-292) por grupos de pacientes con fiebre del heno se correlacionan con las cuentas diarias de polen. Además de estas autoevaluaciones, cada paciente fué entrevistado por un Doctor dos veces durante la temporada de la ambrosía.

20 Resultados. La tabla III presenta los análisis inmunológicos del alérgeno y el alérgoide.

TABLA III

Análisis inmunoquímicos de los antígenos.

---

5	Alergeno de polen de ambrosía, 11RWC	: 35,5 µg AgE/mg sólidos liofilizados.
		: 6,5 µg Ra3/mg sólidos liofilizados.
		: 6,0 µg Ra5/mg sólidos liofilizados.
10		: 6390 PNU/mg sólidos liofilizados.
	Alergioide de polen de ambrosía, 11RWF	: 35,5 µg AgE equiv/mg sólidos liofilizados.
15		: 6100 PNU/mg sólidos liofilizados.
	1 unidad alergeno ≡ 0,01 µg AgE equiv ≡ 1,8 PNU	} 50 veces diferencia en peso.
20	1 unidad alergioide ≡ 0,5 µg AgE equiv ≡ 86 PNU	

---

Los análisis de otros preparados similares de alergeno de ambrosía dializado liofilizado mostraron las composiciones antegénicas siguientes por término medio: AgE (5 preps) = 24,3 µg/mg (range: 11,3-41,1 µg/mg); Ra3 (4 preps) = 7,1 µg/mg (range: 5,0-9,4 µg/mg); Ra5 (4 preps) = 4,1 µg/mg

(range 2,3-6,1 µg/mg).

5 El contenido de antígeno E, Ra3 y Ra5 en el alérgeno son generalmente mayores que los valores promedios obtenidos analizando varias partidas diferentes de alérgeno liofilizado (vease la nota la pie de la tabla III). Los valores PNU del alérgeno y el alérgioi de son similares, como cabía esperar. (Se observará que los extractos de ambrosía no dializados que contenían las mismas cantidades de sólidos de polen no dializables 10 daban aproximadamente el doble de estos valores de PNU debido al hecho de que la técnica daba una cierta medida de nitrógeno en material peptido dilizable). El antígeno de ambrosía E, Ra3 y Ra5 no son mensurables en el alérgiode; por lo tanto nos referimos a concentraciones 15 en términos de "AgE equiv/cc", etc., basado en el contenido respectivo de antígeno del alérgeno de ambrosía nativo.

20 La tabla IV muestra la liberación de histamina, prueba cutánea y datos totales de IgE en 7 parejas de pacientes al comienzo del estudio.

TABLA IV

Sensibilidades de tratamiento previo al alergen y alérgico y datos totales de IgE

Pareja no.	Tratados con alergen				Tratados con alérgico.			
	Sensibles al alerge no.	Sensibles al aler- gicoide	Relaciones aler- gicoide/ alergen.	Total IgE U/cc	Sensibles al alerge no.	Sensibles al aler- gicoide.	Relacio- nes aler- gicoide/ alergen.	Total IgE U/cc
1	HR	$6.0 \times 10^{-4}$	$4.0 \times 10^{-2}$	67	HR	SIN determinar	---	196
	ST	$10^{-5}$	$3 \times 10^{-3}$	300	ST	$10^{-5}$	$3 \times 10^{-3}$	
2	HR	$6.8 \times 10^{-5}$	$6.0 \times 10^{-3}$	88	HR	$4.0 \times 10^{-5}$	$9.0 \times 10^{-4}$	23
	ST	$10^{-4}$	$10^{-2}$	100	ST	$10^{-6}$	$3 \times 10^{-4}$	300
3	HR	V. low release	---	---	HR	24% <sup>+</sup>	23% <sup>+</sup>	~100
	ST	$10^{-5}$	$10^{-2}$	1000	ST	$10^{-4}$	$10^{-1}$	1000
4	HR	$5.4 \times 10^{-5}$	$2.2 \times 10^{-1}$	278	HR	$1.0 \times 10^{-3}$	$1.8 \times 10^{-1}$	180
	ST	$10^{-5}$	$10^{-2}$	1000	ST	$3 \times 10^{-5}$	$10^{-2}$	300
5	HR	$2.3 \times 10^{-4}$	$2.2 \times 10^{-1}$	957	HR	$1.1 \times 10^{-4}$	$1.5 \times 10^{-2}$	136
	ST	$10^{-5}$	$10^{-2}$	1000	ST	$10^{-5}$	$10^{-3}$	100
6	HR	$1.2 \times 10^{-4}$	$3.6 \times 10^{-2}$	300	HR	$1.0 \times 10^{-4}$	$7.0 \times 10^{-2}$	700
	ST	$3 \times 10^{-5}$	$10^{-3}$	30	ST	$10^{-4}$	$10^{-1}$	1000
7	HR	Ninguna liberación	---	---	HR	37% <sup>+</sup>	No rel.	---
	ST	$10^{-3}$	$\sim 3 \times 10^0$	$\sim 3000$	ST	$10^{-5}$	$10^{-2}$	1000
Geom.	HR <sup>†</sup>	$1.4 \times 10^{-4}$	$5.3 \times 10^{-2}$	216	HR <sup>†</sup>	$1.4 \times 10^{-4}$	$2.0 \times 10^{-2}$	132
Promedio	ST	$3 \times 10^{-5}$	$7 \times 10^{-3}$	432	ST	$2 \times 10^{-5}$	$7 \times 10^{-3}$	432

\*Concentración (ug/cc) descubriendo 50% liberación de histamina (HR) o una prueba cutánea de dos más (ST).

† Baja liberación; porcentaje máximo de liberación citados.  
Relaciones estimadas donde era posible.

† Excluye pacientes con valores no mensurables.

5                    Todos los pacientes excepto los de  
la pareja no. 6 cumplieron con nuestro régimen de estudio  
y las comparaciones ulteriores se refieren principalmente  
a 12 personas que completaron el estudio. Encontramos ex-  
traordinariamente difícil emparejar nuestros pacientes com-  
pletamente en términos de todos los criterios, pero la li-  
beración de histamina por término medio geométrica en sen-  
sibilidades de pruebas cutáneas al alérgeno y al alérgioi-  
de y los niveles de totales de suero IgE se equipararon  
de una forma perfectamente razonable.

10  
15                    Las tablas I y II resumen las dosis  
de inyección, en términos de unidades de alérgeno o aler-  
gioide, para los grupos tratados con alérgeno y alérgioi-  
de. Los seis pacientes tratados con alérgeno que cumpli-  
eron con nuestro régimen de estudio recibieron cinco sesio-  
nes de inyecciones, entre 1 y 5 tratamientos por cada se-  
sión. En el grupo tratado por alérgioide dos pacientes  
recibieron tan solo cuatro sesiones y el resto cinco se-  
siones. La dosis acumulativa media para los pacientes  
tratados con alérgioide era de 567  $\mu$ g AgE equiv (1135,7  
unidades) que es 80,6 veces mayor que el promedio de  
dosis acumulativas de 7,0  $\mu$ g de AgE equiv (704 unidades)

20  
25

5 para el grupo tratado con alergeno. En general, las d6sis se podían aumentar sustancialmente en cada nueva sesión, siendo el promedio de impedimento la aparición de cinco reacciones sistemicas en el grupo tratado con alergeno (incluyendo una en el paciente que se desestimó o se consideró como imperfecto) y uno en el grupo tratado con alergioide; esto se indican por asteriscos en las tablas I y II y se calificaron de acuerdo con la frecuencia y gravedad en la tabla V.

10

TABLA V

Calificación de reacciones locales y sistémicas despues de la inyección de alergeno (Gen) o alergioide (Goid)

15

Pareja no.	Local (24 hr.)		Sistémico	
	Gen	Goid	Gen	Goid
1	9	17	0	0
2	20	19	0	2
3	16	15	2	0
4	17	4	2	0
5	3	14	1	0
7	1	4	0	0
Puntuaciones totales	66	73	5	2
Promedio por paciente	11.0	12.2	0.86	0.33
Promedio por inyección	2.2	2.6	0.17	0.07
Desestimados				
6	0	8	1	0

25

Las reacciones locales se graduaron como sigue:

- 1 + (1 punto) : cualquier inchazón hasta 10 cm de diámetro.
- 2 + (2 puntos) : inchazón de 10-20 cm de diámetro.
- 5 3 + (3 puntos) : mayor de 20 cm pero sin llegar a alcanzar el codo.
- 4 + (4 puntos) : inchazón que alcanzaba por debajo del codo (no se produjo en esta serie).

Las reacciones sistémica se graduaron como sigue:

- 10 1 + (1 punto) : cualquier sintoma sistémico más allá del área local de la inyección, pero sin exigir epinefrina;
- 15 2 + (2 puntos) : enjambres, fiebre del heno o síntomas de asma que exigian epinefrina, la tensión permanece normal;
- 3 + (3 puntos) : Síntomas alérgicos sistémicos con reducción de la tensión (no se produjo en esta serie);
- 20 4 - (4 puntos) : anafilaxis franca que exigía medidas de emergencia (no se produjo).

Las reacciones sistémicas tuvieron lugar en el periodo de media hora despues de la administración del antígeno y, si fuera necesario, se inverían con rapidez por administración de epinefrina. Las otras reacciones perfudiciales principales consistían en inchazón loca-

25

lizada en los lugares de administración de las dosis superiores de antígeno. Estas reacciones comenzaban a aproximadamente a las seis horas y alcanzaban su máximo a aproximadamente 24 horas después de las inyecciones. El promedio de calificaciones de dichas reacciones localizadas fue de aproximadamente igual en ambos grupos de pacientes (tabla V).

El examen del análisis de sangre (SMA-11) y el análisis de orina no reveló respuestas tóxicas perjudiciales como resultado del tratamiento con alergia o alérgico.

Como era necesario realizar dobles experimentos de ensayo radioinmunológico de anticuerpos para la medición del anticuerpo IgG del suero o antígeno E, se tuvo un considerable cuidado en asegurar una buena capacidad de reproducción de un experimento a otro. La figura 1 ilustra el alto grado de capacidad de reproducción obtenido por las curvas normales en 14 de los 15 ensayos realizados. La curva normal para el ensayo restante estaba fuera de los límites de los otros ensayos y los datos de este experimento no se tuvieron en consideración. Como las mediciones de anticuerpos se realizaron para adiciones de sueros simple en la mayor parte del estudio, era esencial asegurar que las pendientes de las curvas de enlace para cada paciente no se pudieran distinguir de

5 las del control o testigo. Por lo tanto, tomamos un suero elegido al azar de cada paciente y valoramos la curva de enlace completa; hallamos que las curvas de enlace para cada paciente no eran notablemente diferentes a los de la norma (figura 2), proporcionando la razón esencial para nuestra utilización de una sólida dilución en niveles de anticuerpo de ensayo en el suero restante.

10 Las figuras 2-4 muestran las respuestas de IgE de anti-antígeno E en las tres parejas de pacientes que cumplieron con nuestro régimen de estudio y la figura 6 muestra los dos imperfectos. Después de la primera serie de inyecciones en el día 0, las concentraciones de anticuerpos de IgG se elevaron sensiblemente en la mayoría de los pacientes y alcanzaron niveles notables entre dos y tres semanas. Habiéndose establecido que los niveles eminentes se habían conseguido verdaderamente en la mayoría de los pacientes midiendo valoraciones de anticuerpos en una serie de cuatro a cinco muestras de san-  
15 gre sucesivas, se administró una segunda serie de inyecciones entre los días 28 y 42. Después de otras tres a cuatro semanas, parece ser que alcanzamos niveles eminentes secundarios en la mayoría de los pacientes y se le administró una nueva serie de inyecciones. Se administraron dos a tres series más de inyecciones antes de la tem-  
20 porada de la ambrosía a mediados de agosto. Debido a la  
25

falta de tiempo antes de la temporada, no pudimos esperar a tener la seguridad de que se hubieran obtenido niveles eminentes en todos los pacientes entre la administración de estas últimas series.

5 Las figuras 2-5 ilustran que los  
pacientes comenzaron con niveles de anticuerpos muy diferentes a antes del tratamiento (3-114 unidades/cc). Los niveles de anticuerpos se elevaron en todos los pacientes despues del tratamiento, teniendo el grupo tratado con alergioide un promedio de elevación geométrico 5,7 veces mayor y una valoración máxima 5,2 veces mayor que el grupo tratado con alergenó. A excepción de la pareja no. 2, todos los pacientes tratados con alergioide produjeron mayores elevaciones de anticuerpos, normalmente de 5 a 20 veces mayores, que sus contrapartidas tratadas con alergenó. Es de importancia adicional el hallazgo de que, despues de tan sólo dos series de inmunización, los pacientes trados con alergioide producían, por término medio, un 47% (del orden del 15% al 91%) de las respuestas de anticuerpo máxima alcanzadas después del tratamiento completo de cuatro a cinco sesiones. Los datos correspondientes de individuos tratados con alergenó era del 32% (del orden del (%) al 43%) de respuesta máxima despues de dos series de inyecciones. La elevación geométrica por término medio al cabo de tan solo dos sesiones de trata-

10

15

20

25

miento era 7,9 veces mayor en el grupo tratado con aler-  
gioide que en el grupo tratado con alergeno. Inesperada-  
mente hallamos que todos excepto un paciente (G.T., Gen  
no. 4) alcanzaron valoraciones de anticuerpos de IgG entre  
5 el 50% al 100% de sus niveles máximos al cabo de tres  
meses y medio despues de la última inyección, o sea dos  
meses despues de la temporada de la ambrosía.

La figura 6 ilustra la relación entre  
la dosis de antígeno acumulativa (expresado en  $\mu\text{g}$  de  
10 equivalentes AgE) y los aumentos generales en respuesta  
de anticuerpos IgG (respuesta máxima menos nivel inicial)  
para los doce pacientes que completaron el estudio. Exis-  
tía una clara relación entre la respuesta de anticuerpos  
y la dosis independiente de si el paciente se había tra-  
15 tado con alergeno o alergiaide. Como las líneas de regre-  
sión para los dos grupos no eran sensiblemente diferentes,  
agrupamos los datos para los doce pacientes. Con análi-  
sis de regresión lineal de logaritmo (valoración de anti-  
cuerpos) contra dosis en logaritmo, el coeficiente de co-  
20 rrelación  $r=0,83$ ;  $p<0,001$ . Los datos correspondientes  
para la respuesta de anticuerpos contra la dosis acumula-  
tiva al cabo de dos sesiones de inyecciones mostraron una  
correlación similar ( $r = 0,81$ ;  $p<0,001$ ).

El promedio de valoraciones de sínto-  
25 ma día a día en los dos grupos de pacientes en la temporada

de polen de ambrosía de 1977 (figura 7) muestra una tendencia hacia la sintomatología general menor en toda la temporada. Se llegó a esto por análisis del promedio de puntuaciones diarias por cada paciente, promediado en toda la temporada de ambrosía (figura 8A). El promedio de puntuación del grupo tratado con alergioide era de 1,1 unidades de síntoma menos que en el grupo tratado con alergenos. Estos resultados no fueron estadísticamente diferentes con estos nuevos pacientes. Los estudios anteriores (Norman, P.S. Winkernkewerder, W.L. y Lichtenstein, L.M. 1971. J. Allergy 47:273) han demostrado que el promedio de síntomas diarios en toda la temporada de la ambrosía por pacientes similarmente sensibles tratados con placebo normalmente estaba comprendido en el orden de 7 a 10 unidades, con puntuaciones diarias máximas por término medio de doce a catorce unidades. Por lo tanto la mayoría de los pacientes tratados parecía ir mejor que lo que cabría esperar para un grupo de placebo equiparado. Las puntuaciones de nuestros pacientes tratados eran similares a las halladas en pacientes (también previamente sin tratamiento) que habían seguido un régimen de tratamiento tradicional de 16 a 24 inyecciones semanales de antígeno en nuestro estudio de 1973 de alergen contra alericoide (figura 8B). Las valoraciones de los pacientes realizadas por los Doctores durante la temporada

de la ambrosía concurrían con las puntuaciones de síntomas anteriores de autoevaluación.

Discusión. El presente estudio representa el primer intento sistemático de tratar de definir el régimen de tratamiento óptimo, en términos de dosis de antígeno y espaciamiento de las inyecciones, para la inmunoterapia de pacientes alérgicos. Con este fin, hemos utilizado un régimen "de urgencia" intensivo que comprendía de 1 a 5 inyecciones en cada día de tratamiento. Este protocolo permite al doctor administrar una dosis óptimamente tolerada por el paciente. En la mayoría de los casos dichas dosis era de 100 a 10.000 mayores que las administradas normalmente en el primer día de tratamiento de un paciente. En el caso del alergiaide, la elevada dosis de tratamiento en el primer día de inyección da por resultado un aumento sustancial (de 10 a 100 veces mayor) en anticuerpo de IgG a antígeno E al cabo de 2 a 3 semanas después. Una segunda sesión de inyecciones a dosis más elevadas se puede administrar entonces dando por resultado una respuesta de anticuerpos que promedia aproximadamente el 50% de la conseguida ulteriormente al cabo de 2 o 3 sesiones adicionales de inyecciones con dosis elevadas de alergiaide.

Parece ser por nuestros estudios de anticuerpos que un espaciamiento de inyecciones de 2 a

4 semanas puede ser óptimo puesto que, en dicho periodo, el paciente ha alcanzado respuestas máximas a la inmunización. No obstante, es posible que un intervalo algo mayor que permita la recogida adicional de células productoras de anticuerpos IgG, pueda demostrar ser algo más eficaz en el supuesto que no se dejen que caigan demasiado drásticamente los niveles de anticuerpos.

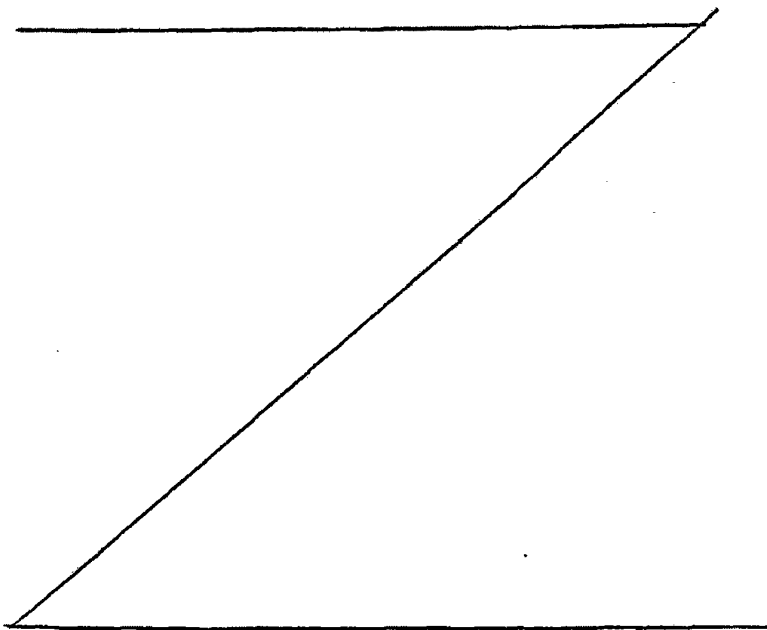
A pesar de los regímenes de elevadas dosis (especialmente con alergiaoide) no se observaron respuestas tóxicas perjudiciales en ninguno de los pacientes tratados.

Estos estudios demuestran ventajas evidentes del alergiaoide sobre el alergeno en el sentido de que se pueden administrar dosis muy elevadas de alergiaoide al paciente con un riesgo relativamente bajo de reacciones sistémicas, y con niveles resultantes elevados de anticuerpos IgG. En nuestro estudio, la única excepción a esta regla fue el paciente D.H. en la pareja de alergiaoide no. 2. Esta persona mostró una sensibilidad superior al término medio al alergiaoide y, retrospectivamente, parece ser con probabilidad que la sesión de tratamiento inicial fue demasiada en este caso. La incidencia de reacciones sistémicas en el grupo tratado con alergeno promedio 0,7 por paciente, con una puntuación de reacción por término medio de 0,8 por paciente (incluyendo el con-

siderado imperfecto). Esto resulta inaceptablemente elevado para que recomendemos dicho programa intensivo de dosificación para un tratamiento urgente con alergen.

5 Este estudio, realizado con dos pequeños grupos de pacientes tratados con alergen y alergiaide no anima a proseguir con mayores grupos de pacientes comparando el régimen de tratamiento que tradicional para el alergen con el régimen urgente modificado para el alergiaide.

10 Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo 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

5 1.- Procedimiento para producir un  
alergeno tratado con aldehido de baja reactividad aler-  
génica en seres humanos alérgicos, y que conserva las  
propiedades inmunizantes deseadas del alergeno nativo  
dando lugar a la mejoría de la sintomatología de perso-  
nas alérgicas y a la producción correspondiente de anti-  
cuerpos de bloqueo que se considera asociada con el  
alivio de síntomas, pero no unicamente responsable por  
10 necesidad del mismo, y que puede inducir en los animales  
mamíferos la formación de anticuerpos de bloqueo contra  
el alergeno nativo en concentración suficiente, caracte-  
rizado porque comprende dejar que los alergenos reaccio-  
nen químicamente en condiciones suaves con una solución  
15 elegida del grupo consistente en formaldehido, aldehidos  
difuncionales alifáticos saturados inferiores y combina-  
ciones de los mismos, en una pluralidad de etapas con la  
condición de que cualquier reacción de formaldehido se  
lleve a cabo en un ambiente no fenólico.

20 2.- Procedimiento según la reivindica-  
ción 1, caracterizado porque hay una reacción de prime-  
ra etapa que se lleva a cabo a una temperatura inmedia-  
tamente superior al punto de congelación de la solución  
a 15°C y cada etapa ulterior se lleva a cabo a una tempe-  
25 ratura del orden de aproximadamente 25 a 40°C, con

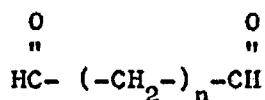
cualquier combinación de formaldehído y dialdehído en cada una de las etapas sucesivas.

5

3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el aldehído en todas las etapas es formaldehído.

4.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el aldehído en todas las etapas es un dialdehído que tiene la fórmula:

10



donde n es un entero de 1 a 6.

5.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el aldehído en todas las etapas es glutaraldehído.

15

6.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el aldehído es una combinación de formaldehído y dialdehído utilizados como mezcla en cada etapa o como aldehído individuales en etapas sucesivas.

20

7.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el aldehído es una combinación de formaldehído y glutaraldehído utilizada como una mezcla en cada etapa o como aldehídos individuales en etapas sucesivas.

25

8.- Procedimiento según la reivindicación

ción 2, caracterizado porque los alergenos se dejan reaccionar con el aldehido o aldehidos en dos etapas.

5 9.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque hay presentes junto con la solución de formaldehido diluida por lo menos un aditivo elegido del grupo consistente en 1,4-diaminobutano, lixina, ornitina, ácido 1,5-diaminopimelico, arginina, adipamida, ácido aspartico, serina y alanina.

10 10.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el material que contiene alergeno es un extracto acuoso de una sustancia de polen.

15 11.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el material que contiene alergeno es un extracto acuoso de una sustancia de polen de hierba.

12.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el material que contiene alergeno contiene un preparado de alergeno de polen de hierba del grupo I.

20 13.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el material que contiene alergeno es un extracto acuoso de una sustancia de polen de malas hierbas.

25 14.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el material que contiene

alergeno es un extracto acuoso de una sustancia de polen de árbol.

5

15.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el material que contiene alergeno contiene antígeno E de polen de ambrosia.

16.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el material que contiene alergeno es un extracto acuoso que contiene pizcas de polvo casero o sus residuos.

10

17.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el material que contiene alergeno es un extracto acuoso de un hongo u hongos.

15

18.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el material que contiene alergeno es un extracto acuoso de un producto de insecto o insectos.

20

19.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el material que contiene alergeno es un extracto acuoso de caspa/piel/pelo de animal.

20.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el material que contiene alergeno es un extracto acuoso de alergeno de la sangre.

25

21.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el material que contiene

alergeno es un preparado de alergeno purificado.

22.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se hace reaccionar a los alergenicos con una mezcla de por lo menos dos elementos elegidos del grupo consistente en formaldehido y un aldehido difuncional saturado inferior, por lo menos en una etapa.

23.- Procedimiento para producir un alergeno tratado con aldehido de baja reactividad alergénica en seres humanos alérgicos, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

Esta memoria consta de sesenta y dos hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

- 3 OCT. 1979

THE JOHN HOPKINS UNIVERSITY.

J. M. GOMEZ ACEBO Y PONBO  
Firmado J. Suarez

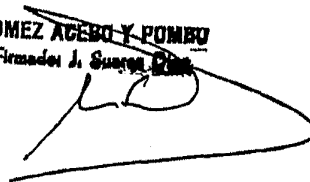
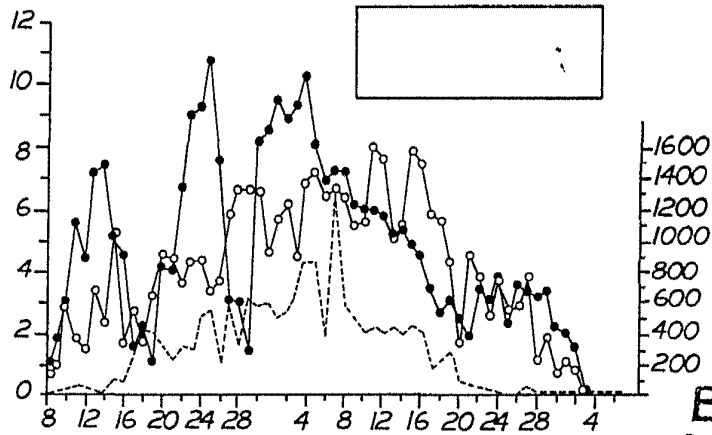
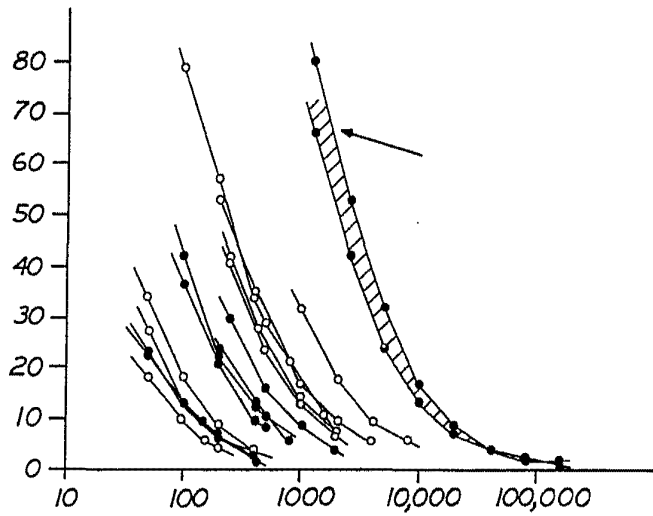


FIG.1



ESCALA VARIABLE

FIG.7

Madrid ~~1970~~

J. M. GOMEZ ACEBO Y PUMBU  
p. p. Firmador J. Suarez Diaz

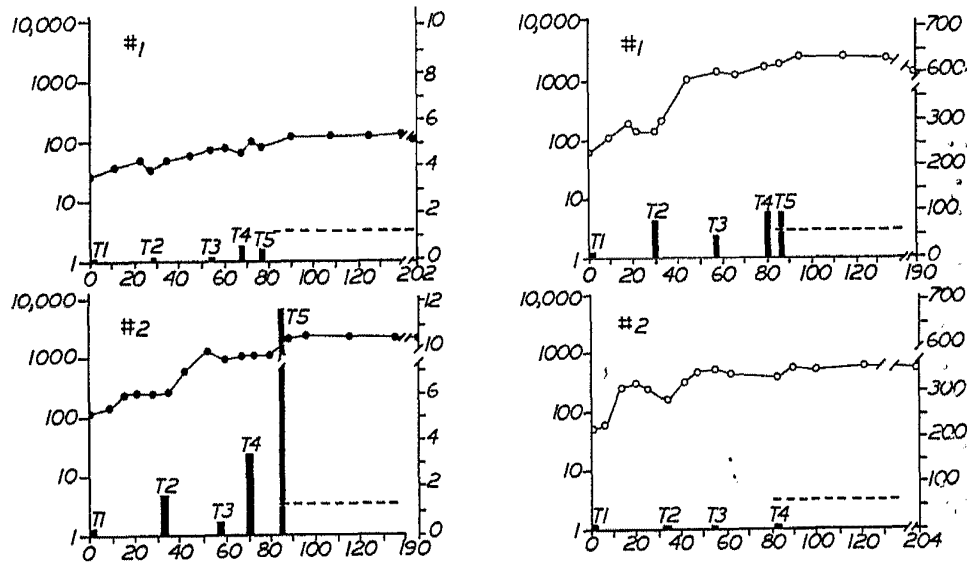


FIG.2

Madrid - 9 OCT 1970

J. M. GOMEZ ADEBO Y POMBU  
D. P. Firmado J. Suarez Diaz

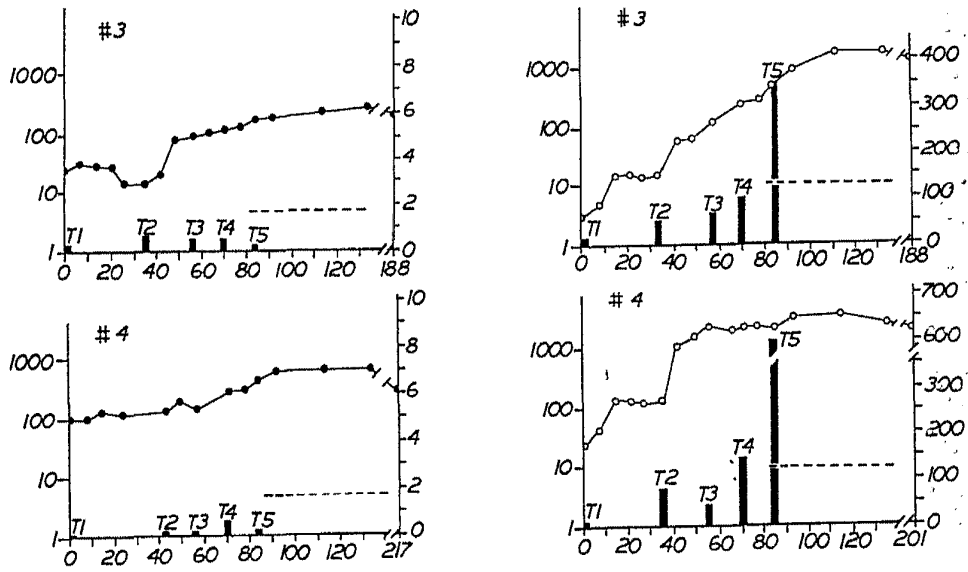


FIG.3

ESCALA  
VARIABLE

Madrid - 3 OCT. 1979

J. M. GOMEZ AGUIRRE Y MORAÑA  
D. P. Firmado: J. Suarez Diaz

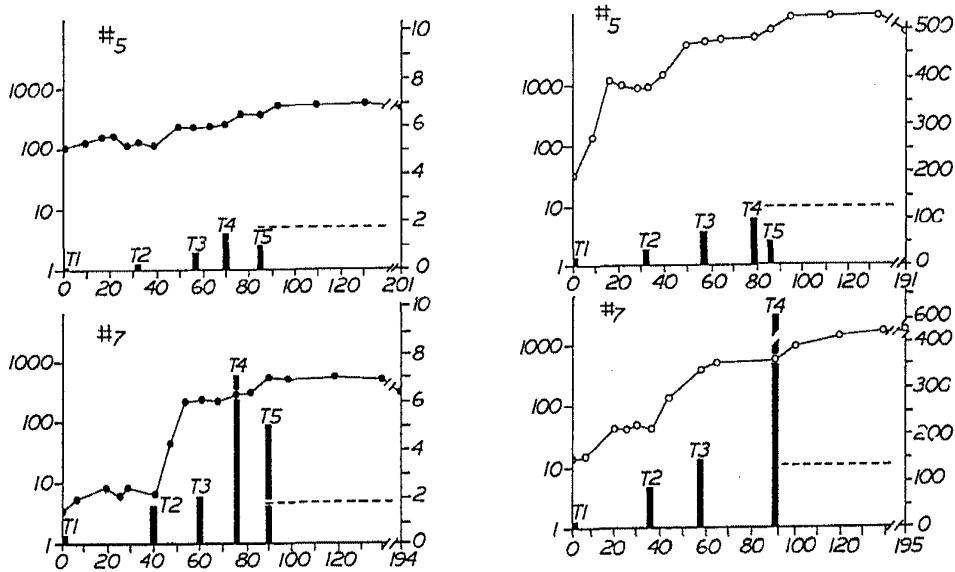


FIG.4

ESCUELA  
VALENTIN  
MIA

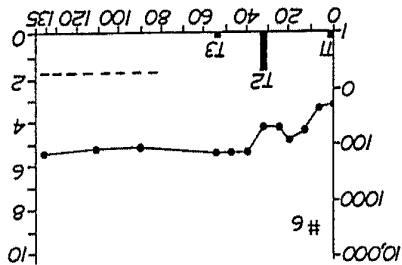
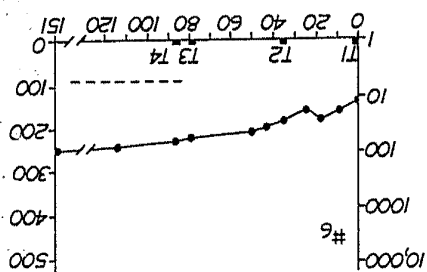
Madrid

J. de la Cruz, ARBO Y Familia  
D. p. Firmado: J. Suarez Diaz

ESCALA  
VARIABLE

~~Dr. J. Gomez Acebo y Ferraz~~  
~~Madrid - 3 OCT 1973~~

FIG. 5



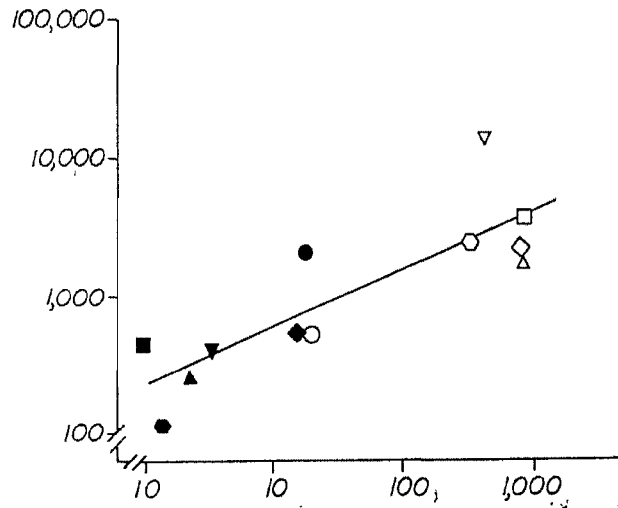


FIG.6

REPRODUCIBLE

Madrid - 3 OCT. 1979

J. M. CORNEJOS ACEBO Y PARRA

*[Handwritten signature]*

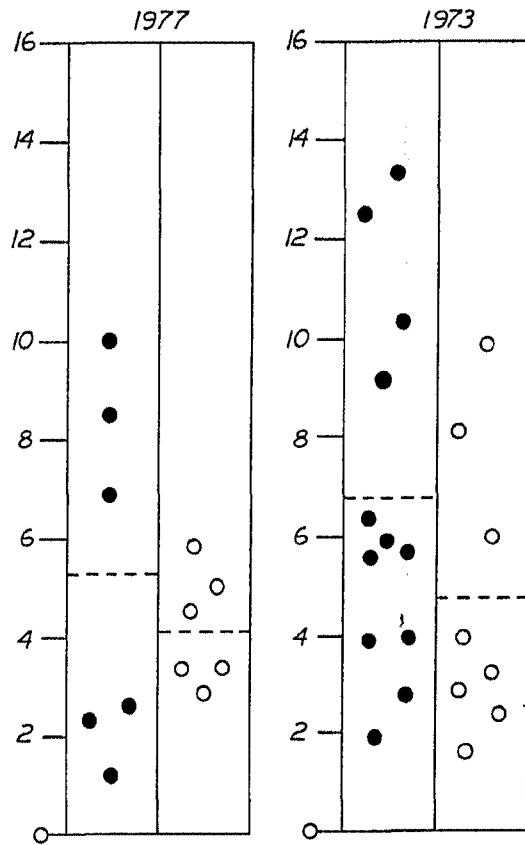


FIG. 8

ESCALA

Madrid - 3 OCT 1973

J. de la Cruz Ortega y Pujadas  
Instituto de Estadística de España