

REPUBLICA DE COLOMBIA



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-155801- -00000-0000

Fecha: 2012-09-11 15:19:35

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 45

PATENTE DE INVENCION

EXPEDIENTE No. _____

Contiene los documentos relativos a la solicitud de Patente de:

Título: PROCESO PARA PRODUCIR UN EXTRACTO DE ALÉRGENOS.

Solicitante: LABORATORIOS LETI, S.L. UNIPERSONAL.

De: BARCELONA, ESPAÑA.

Apoderado: MAURICIO JARAMILLO C.

Bogotá, D.C., Septiembre de 2012

WF-4776

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I		☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II	
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)				
Solicitud Internacional No.		PCT/EP2011/052049		Fecha	11/02/2011
Publicación Internacional No.		WO 2011/098569		Fecha	18/08/2011
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)				
PROCESO PARA PRODUCIR UN EXTRACTO DE ALÉRGENOS					
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)				
A61K 39/35 (2006.01), A61P 37/08 (2006.01)					
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria				
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE		IDENTIFICACIÓN	TIPO
1. LABORATORIOS LETI, S.L. UNIPERSONAL					
6	DATOS DEL SOLICITANTE				
DIRECCIÓN		Gran Via des les Corts Catalanes, no. 184, E-08038		No. TELÉFONO	
CIUDAD		Barcelona		CORREO ELECTRÓNICO	
DEPARTAMENTO/ESTADO				NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	
PAÍS DE RESIDENCIA		España		España	
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria				
APELLIDOS		NOMBRES		NACIONALIDAD	
1. CARNES SANCHEZ		Jerónimo		España	
2.					
3.					
4.					
5.					
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:					
8	DATOS INVENTOR (ES)				
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO		CIUDAD	
1.España				Barcelona	
2.					
3.					
4.					
5.					
DIRECCIÓN					
Gran Via des les Corts Catalanes, no. 184, E-08038					
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)					
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.					
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO				
APELLIDOS		NOMBRES		IDENTIFICACIÓN	
JARAMILLO CAMPUZANO		MAURICIO		C.C.80.421.942 T.P.74.555	
DIRECCIÓN		Calle 67 No. 7 – 35, oficina 1204		No. TELÉFONO 3192900	
CIUDAD		Bogotá D.C.		CORREO ELECTRÓNICO jbenoit@gpzlegal.com	
PAÍS		Colombia		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☐ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1.España		ES	P201030199	2010/12/02
2.				
3.				
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>				
☐ SI ☐ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>				
☐ SI ☐ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>				
☐ SI ☐ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐				
Universidades públicas o privadas ☐				
Entidades sin ánimo de lucro ☐				
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.				
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N°	Fecha	
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)				
17	ANEXOS			
Documentación Técnica		Documentación Jurídica		
Solicitud Internacional en castellano				
1. X Descripción N° de folios: 35		9. ☐ Poderes, si fuera el caso.		
2. X Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 17		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.		
3. ☐ Dibujos y/o figuras N° folios:		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
4. X Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas		
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas		
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.		
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.		
		Universidades públicas o privadas		
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación		
		Entidades sin ánimo de lucro		
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.		
		☐ Hoja de información complementaria.		
		☐ Otros, especificar		
		14. X Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.		
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.		
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.		
		17. X Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.		

	EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN ☐ Patente de Invención ☐ Patente modelo de utilidad ☒ PCT
(21) No. de solicitud:	(51) int. Cl: A61K 39/35 (2006.01), A61P 37/08 (2006.01)
(22) Fecha de solicitud: 11/09/2012	(71) Solicitante(s): LABORATORIOS LETI, S.L. UNIPERSONAL
(30) Prioridad:	(72) Inventor(es): JERÓNIMO CARNES SÁNCHEZ
(31) No. Prioridad: P201030199	
(32) Fecha: 02/12/2010	
(33) País: España	(74) Apoderado(s): MAURICIO JARAMILLO CAMPUZANO
(54) Título: PROCESO PARA PRODUCIR UN EXTRACTO DE ALÉRGENOS	
Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT	
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional: 12/09/2012	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	(87) Publicación internacional
Fecha: 11/02/2011	Fecha: 18/08/2011
No. de solicitud PCT: PCT/EP2011/052049	No. Publicación: WO 2011/098569
Resumen reivindicación (es):	

(12) International Application Status Report

Received at International Bureau: 21 February 2011 (21.02.2011)

Information valid as of: 07 September 2012 (07.09.2012)

Report generated on: 11 September 2012 (11.09.2012)

(10) Publication number: WO2011/098569	(43) Publication date: 18 August 2011 (18.08.2011)	(26) Publication language: English (EN)
(21) Application Number: PCT/EP2011/052049	(22) Filing Date: 11 February 2011 (11.02.2011)	(25) Filing language: English (EN)
(31) Priority number(s): P201030199 (ES)	(31) Priority date(s): 12 February 2010 (12.02.2010)	(31) Priority status: Priority document received (in compliance with PCT Rule 17.1)

(51) International Patent Classification:
A61K 39/35 (2006.01); A61P 37/08 (2006.01)

(71) Applicant(s):
LABORATORIOS LETI, S.L. [/ES]; Calle des Sol, 5 E-28760 Tres Cantos (ES) (for all designated states except US)
CARNES SANCHEZ, Jeronimo [ES/ES]; c/o Laboratorios Leti, S.L. Unipersonal Gran Via des les Corts Catalanes, no. 184 E-08038 Barcelona (ES) (for US only)

(72) Inventor(s):
CARNES SANCHEZ, Jeronimo; c/o Laboratorios Leti, S.L. Unipersonal Gran Via des les Corts Catalanes, no. 184 E-08038 Barcelona (ES)

(74) Agent(s):
BAKER-MUNTON, Nicola Jane; Stratagem IPM Limited Fosters Wing Anstey Hall Maris Lane Trumpington Cambridge Cambridgeshire CB2 9LG (GB)

(54) Title (EN): PROCESS FOR PRODUCING AN ALLERGEN EXTRACT

(54) Title (FR): PROCÉDÉ DE FABRICATION D'UN EXTRAIT D'ALLERGÈNES

(57) Abstract:
(EN): The present invention discloses processes for producing native, depigmented and polymerised allergen extracts. The invention further discloses extracts produced via the processes, and pharmaceutical and vaccine compositions comprising the extracts, for diagnosis and treatment of allergy.
(FR): La présente invention porte sur des procédés de fabrication d'extraits d'allergènes indigènes, dépigmentés et polymérisés. L'invention porte en outre sur des extraits fabriqués par l'intermédiaire de ces procédés, ainsi que sur des compositions pharmaceutiques et de vaccins comportant les extraits, pour le diagnostic et le traitement des allergies.

International search report:
Received at International Bureau: 04 April 2011 (04.04.2011) [EP]

International preliminary examination report:
Not available

(81) Designated States:
AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL,

PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

European Patent Office (EPO) : AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR

African Intellectual Property Organization (OAPI) : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

African Regional Intellectual Property Organization (ARIPO) : BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW

Eurasian Patent Organization (EAPO) : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

Proceso para producir un extracto de alérgenos

Campo técnico

La invención se refiere a un proceso para producir un extracto de alérgenos purificado y a composiciones farmacéuticas y vacunas para su uso en el diagnóstico y
5 tratamiento de la alergia.

Antecedentes de la invención

La alergia es un trastorno adquirido de hipersensibilidad del sistema inmunológico y es activada por la exposición de sustancias ambientales inofensivas conocidas como alérgenos. La reacción de hipersensibilidad de tipo I es característica de las reacciones
10 alérgicas y da como resultado la producción de cantidades excesivas de anticuerpos IgE que, a su vez, activan a basófilos y mastocitos provocando una reacción inflamatoria. Los efectos pueden ser sistémicos, tales como vasodilatación, secreción de mucosidad, estimulación de nervios y contracción del músculo liso provocando una reacción anafiláctica, o pueden estar limitados a un área concreta del cuerpo, por ejemplo el
15 sistema respiratorio.

Las alergias alimentarias son un importante problema sanitario público emergente que afecta a aproximadamente 6% de niños en edad escolar y a aproximadamente 4% de adultos, y puede tener consecuencias graves, incluyendo reacciones anafiláticas fatales⁽¹⁾. Por tanto, las alergias pueden tener un impacto significativo sobre los aspectos
20 psicosociales de la calidad de vida que se extienden más allá de los efectos clínicos inmediatos del trastorno alérgico del paciente y las actividades diarias de las familias⁽²⁾. En la actualidad, el criterio de atención para este tipo de alergias incluye evitar estrictamente a los alérgenos ofensivos y el tratamiento con adrenalina.

La alergia a los cacahuetes es una respuesta inmunológica de hipersensibilidad de
25 tipo I (mediada por IgE) a sustancias de la dieta procedentes de cacahuetes que provoca una sobre-reacción del sistema inmunológico. The Asthma and Allergy Foundation of America estima que la alergia a los cacahuetes es la causa más común de muertes relacionadas con los alimentos en EEUU y ha estimado que afecta al 0,4-0,6% de la población. Los frutos secos, tales como las pacanas, los pistachos, los piñones y las
30 nueces, también son alérgenos habituales.

Hasta la fecha se han identificado once alérgenos (de Ara h 1 a Ara h 11) en el cacahuete (*Arachis hypogea*) y muchos de ellos se han secuenciado y clonado. Basándose en la nomenclatura de "the International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-Committee" (IUIS), estos alérgenos incluyen: Ara h 1, una
35 cupina (de tipo vicilina, globulina 7S) de 64 kDa; Ara h 2, un conglutina (albúmina 2S) de 17 kDa; Ara h 3, una cupina (de tipo legumina, globulina 11S, glicinina) de 60 kDa; Ara h 4, una cupina (de tipo legumina, 11S, glicinina) de 37 kDa; Ara h 5, una profilina de 15 kDa; Ara h 6, una conglutina (albúmina 2S) de 15 kDa; Ara h 7, una conglutina (albúmina 2S) de 15 kDa; Ara h 8, una proteína relacionada con la patogénesis, PR-10 de 17 kDa;

Ara h 9, una proteína 1 de transferencia de lípidos no específica de 9,8 kDa; Ara h 10, una oleosina de 16 kDa, y Ara h 11, una oleosina de 14 kDa.

La alergia a los gatos es muy común, y aparece hasta en un 25% de las personas con alergias. La alergia a los gatos es más común que la alergia a la caspa de los perros, que puede estar relacionado con la potencia del pelo y la caspa de gato como alérgenos, así como con el hecho de que a los gatos no se les baña en general. El alérgeno de los gatos es producido en grandes cantidades, en particular por gatos macho no castrados, porque el alérgeno tiene un control parcialmente hormonal. La caspa está constantemente con el aire, es pegajosa y se encuentra en sitios públicos, aunque no haya gatos. Esto es debido a que la ropa de los dueños de gatos porta la caspa que después se desprende en sitios públicos. Por tanto, el alérgeno de los gatos es un componente del polvo doméstico, incluso en hogares en que nunca haya vivido un gato. El tamaño de las partículas de la caspa de gato es muy pequeño, y se inhala hasta las vías inferiores en los pulmones. Por tanto, la caspa de gato es una causa habitual del asma alérgico, y los dueños de gatos que son alérgicos a los gatos son más propensos al desarrollo de síntomas de asma^(8, 9).

Los principales alérgenos de los gatos y perros se encuentran en extractos de pelo/caspa y saliva y, por tanto, se consideran alérgenos epiteliales. En el gato se han identificado ocho alérgenos diferentes y muchos de estos se han secuenciado y clonado. Basándose en el sitio Web de IUISⁱ, estos alérgenos incluyen: Fel d 1, una uteroglobina de 14 y 4 kDa; Fel d 2, una albúmina de 69 kDa; Fel d 3, una cistatina de 11 kDa; Fel d 4, una lipocalina de 22 kDa; Fel d 5, una inmunoglobulina A de 400 kDa; Fel d 6, una inmunoglobulina M de 800-1000 kDa; Fel d 7, una proteína de la glándula de von Ebner de 17,5 kDa; Fel d 8, una proteína de tipo laterina de 24 kDa. El principal alérgeno de gato, Fel d 1, se ha caracterizado a fondo mediante técnicas inmunoquímicas y de proteínas, y recientemente se ha expresado como un alérgeno recombinante. Fel d 1 representa un dímero de aproximadamente 36 kDa, que está compuesto por dos subunidades de 17 kd⁽¹⁰⁾.

La alergia a gramíneas es una de las formas más comunes y extendidas de alergia que afecta a las personas con historia de esta en ciertas estaciones del año. Está presente en el aire en los meses de finales de primavera y principios de verano, y puede provocar rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica y asma. El contacto directo de la piel con la hierba, tras sentarse sobre ella o segarla, puede provocar picores en la piel, urticaria y dermatitis atópica. Una de las especies más representativas es *Phleum pratense*, seleccionada como líder del grupo de gramíneas. Se han identificado nueve alérgenos diferentes de la especie *Phleum pratense*. Basándose en el sitio Web de la IUISⁱ, estos alérgenos incluyen: Phl p 1, una beta-expansina de 27 kDa; Phl p 2, un alérgeno del grupo II/III de gramíneas de 10-12 kDa; Phl p 4, una proteína de 55 kDa; Phl p 5 de 32 kDa; Phl p 6 de 11 kDa; Phl p 7, una proteína de unión al calcio de 6 kDa; Phl p 11, una proteína relacionada con Ole e 1 de 20 kDa; Phl p 12, una profilina de 14 kDa; y Phl p 13, una poligalacturonasa de 55 kDa.

Phragmites es un género que pertenece al grupo de las gramíneas. Se han descrito varias especies, que incluyen *P. australis*, o *P. communis*. Se ha indicado que el polen de *Phragmites communis* es alergénico en diferentes áreas. La polinización se produce entre el verano y el otoño, dependiendo de la latitud y de la altitud. En el género

5 *Phragmites* se han identificado cinco proteínas diferentes con capacidad de unión a IgE. Basándose en el sitio Web de Allergomeⁱ, estos alérgenos incluyen: una expansina de 30 kDa; una proteína que pertenece al grupo 4 de gramíneas de 60 kDa; una ribonucleasa de 35 kDa; una profilina de 14 kDa; y por último una poligalacturonasa.

La ambrosía (*Ambrosia*) es una hierba que crece principalmente en Europa central. Un pie de planta vive sólo una temporada, pero la planta produce miles de granos de polen. El calor, la humedad y la brisa después del amanecer ayudan a liberar los granos de polen. Hasta la fecha se ha relacionado a tres especies diferentes con los síntomas de la alergia (*Ambrosia artemisiifolia*, *A. psilostachya* y *A. trifida*). Se han identificado diez alérgenos diferentes en *A. artemisiifolia*, y muchos se han secuenciado y

15 clonado. En el caso de *Ambrosia artemisiifolia* se denominan Amb 1 a Amb 10 según la nomenclatura internacional para alérgenos. Basándose en el sitio Web de IUIS¹, estos alérgenos incluyen: Amb a 1, una pectato liasa de 38 kDa; Amb a 2, una pectato liasa de 38 kDa; Amb a 3, una plastocianina de 11 kDa; Amb a 4, una proteína de tipo defensina de 30 kDa; Amb a 5, de 5 kDa; Amb a 6, una proteína de transferencia de lípidos de 10

20 kDa; Amb a 7, una plastocianina de 12 kDa; Amb a 8, una profilina de 14 kDa; Amb a 9, una polcancina de 10 kDa; y Amb a 10, una proteína de tipo polcalcina de 19 kDa. Sólo se ha descrito el alérgeno Amb p 5 para *A. psilostachya* con función biológica desconocida. Sólo se ha descrito un alérgeno de 5 kDa en *A. trifida*.

Las hierbas pueden dividirse en grupos homólogos según sus extractos alergenicos clasificados. La ambrosía se seleccionó como uno de los líderes de este grupo de plantas. Por esta razón, los resultados obtenidos con el extracto de este polen pueden extrapolarse a otras hierbasⁱ.

La alergia puede tratarse mediante una serie de métodos conocidos, que incluyen la inmunoterapia con alérgenos, la inmunoterapia específica (SIT) o la vacunación de

30 alergias específicas (SAV), que es una forma de inmunoterapia para trastornos alérgicos en que los pacientes son vacunados con dosis cada vez mayores de un extracto de alérgenos con el objetivo de inducir una tolerancia inmunológica. La inmunoterapia con alérgenos modula la respuesta inmunológica al alérgeno en lugar de mejorar los síntomas inducidos por una reacción alérgica, y puede reducir la necesidad de medicación, reducir

35 la gravedad de los síntomas o eliminar la hipersensibilidad en general.

Aunque existen muchas pruebas de que la inmunoterapia con alérgenos es el único medio, aparte de evitar los alérgenos, para tratar causalmente los trastornos alérgicos mediados por IgE provocados por alérgenos inhalados y picaduras de insectos del grupo *Hymenoptera*, la inmunoterapia con extractos de alérgenos no se emplea

40 habitualmente para el tratamiento de alergias alimentarias. Sólo dos estudios recientes

han demostrado una eficacia clínica moderada utilizando una inmunoterapia sublingual en individuos sensibilizados a las avellanas y al melocotón, respectivamente^(3, 4).

En estudios previos se ha intentado inducir una tolerancia a dosis bajas dando de comer minúsculos trozos de cacahuete a niños, trozos que gradualmente se van haciendo mayores para fortaleciendo el sistema inmunológico^(4, 6). Aunque datos de ensayos clínicos anteriores indican que la alergia a los cacahuets puede mejorarse utilizando una inmunoterapia⁽⁷⁾, en la actualidad no existe ningún tratamiento confirmado para prevenir o curar las reacciones alérgicas a los cacahuets, siendo la única opción eficaz para individuos atópicos el evitar alimentos que contengan o que estén contaminados con cacahuets enteros, partículas de cacahuete y aceites de cacahuete, y proporcionar un acceso sencillo a la epinefrina autoinyectable.

Uno de los riesgos de la inmunoterapia es que la inyección de un alérgeno a un paciente sensible puede provocar una reacción alérgica grave o anafilaxis. Desde su primer uso a principios del siglo XX se han realizado muchos esfuerzos para mejorar aún más la seguridad y la eficacia de la inmunoterapia con alérgenos. Una estrategia es emplear vacunas de alérgenos con alergenidad reducida pero manteniendo la inmunogenicidad.

Los documentos US 5.770.698 y EP 0662080 describen un proceso para la eliminación de sustancias y de otros materiales de bajo peso molecular para purificar el extracto de alérgenos y para aumentar el contenido final de alérgenos/proteínas. El proceso consiste en alterar las fuerzas electrostáticas, hidrófobas u otras fuerzas físicas bajo condiciones que despegan los compuestos no alergénicos de las proteínas alergénicamente activas. El proceso puede consistir en un tratamiento ácido suave disminuyendo el pH por debajo del pI de las respectivas proteínas de alérgenos.

Una de varias formas de reducir la alergenidad consiste en modificar químicamente extractos de alérgenos nativos con aldehídos (principalmente formaldehído y glutaraldehído) para producir alergoides. Este tratamiento con aldehídos conduce a unos productos de reacción (principalmente polímeros) que han perdido parte de su alergenidad (es decir, muestran una reducción de los epitopos de células B reactivos a IgE), reduciendo los efectos secundarios alérgicos. Al mismo tiempo, la inmunogenicidad nativa del alérgeno se mantiene debido a que los epitopos de células T no cambian. Esta vía de modificación de alérgenos ha sido elegida por algunos fabricantes de vacunas de alérgenos para desarrollar productos disponibles en el mercado basados en este principio. En general, existe una tendencia a purificar aún más los extractos de alérgenos, seleccionando cuidadosamente los alérgenos más importantes y los mas relevantes desde el punto de vista clínico

Los documentos EP 1834649 y EP 1834648 describen métodos para producir extractos de alérgenos; sin embargo, estos métodos no eliminan suficientemente las proteínas contaminantes de bajo peso molecular.

Es necesario aumentar aun más la seguridad y la eficacia de los medicamentos utilizados para la inmunoterapia de trastornos alérgicos mediante la optimización del proceso de purificación de alérgenos para asegurarse de que se eliminan las proteínas contaminantes de bajo peso molecular, y los componentes irritantes y tóxicos.

5 Sumario de la invención

Los inventores han desarrollado una etapa intermedia antes de la polimerización para mejorar aún más el proceso de polimerización y reducir la alergenicidad de ciertos extractos, tales como ácaros, polenes que incluyen gramíneas, hierbas y árboles, alérgenos epiteliales y alérgenos alimentarios, antes del tratamiento con glutaraldehído.

10 Un objeto de la presente invención es proporcionar un proceso para la preparación de extractos que comprenden alérgenos, y composiciones farmacéuticas y vacunas para el tratamiento de la alergia. Otro objeto es proporcionar un extracto de alérgenos óptimamente eficaz con menor capacidad de unión a IgE pero que mantenga su capacidad inmunogénica.

15 Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para producir un extracto de alérgenos, que comprende:

a) poner en contacto un material de origen que comprende un alérgeno con un agente de extracción líquida para producir una mezcla que contiene lípidos disueltos en la fase líquida, y una fase sólida que consiste en residuos del material de origen que
20 comprenden alérgenos y proteínas,

b) someter la mezcla a una primera etapa de separación para aislar los residuos del material de origen;

c) poner en contacto los residuos del material de origen con un agente de extracto de alérgenos para producir una mezcla de alérgenos disuelta en la fase líquida, y una fase
25 sólida que consiste en residuos no alergénicos,

d) someter la mezcla a una segunda etapa de separación para aislar los alérgenos disueltos en la fase líquida, para producir un extracto de alérgenos bruto,

e) someter al extracto de alérgenos bruto a una etapa de eliminación de fracciones de bajo peso molecular para eliminar las moléculas que tengan un tamaño molecular
30 menor que 3,5 kDa, y

f) llevar a cabo la etapa e) hasta que el extracto de alérgenos tenga una conductividad menor que 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 3-5°C para obtener un extracto de alérgenos nativos purificado.

Una etapa posterior del tratamiento puede comprender:

35 g) Hacer un tratamiento con un ácido suave del extracto de alérgenos nativos para eliminar las moléculas que tengan un tamaño molecular menor que 3,5 kDa, y neutralizar el pH para producir un extracto de alérgenos despigmentado.

El proceso también puede comprender una etapa de polimerización, que comprende:

h) poner en contacto un extracto de alérgenos nativos o un extracto de alérgenos despigmentado con un aldehído, y

i) eliminar las moléculas que tengan un tamaño molecular menor que 100 kDa.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un extracto de alérgenos que puede obtenerse según el proceso del primer aspecto de la presente invención.

Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona un extracto de alérgenos purificado para su uso como una sustancia terapéutica activa para el tratamiento de la alergia.

10 Definiciones

Un "alérgeno" puede definirse como una molécula capaz de inducir una respuesta de IgE y/o una reacción alérgica de tipo I.

El término "despigmentado" mencionado en la presente puede definirse como un extracto de alérgenos semipurificados obtenido de un extracto nativo mediante la eliminación de las sustancias irrelevantes, incluyendo los pigmentos adsorbidos que pueda contener.

Descripción detallada de la invención

Los extractos de alérgenos de la invención pueden derivarse de cualquier material de origen que comprenda alérgenos naturales conocidos por provocar una reacción inmunológica mediada por IgE en un individuo. Estos alérgenos pueden incluir alérgenos alimentarios (por ejemplo, cacahuetes), alérgenos aéreos (por ejemplo, polen de gramíneas, árboles, hierbas, ácaros del polvo, hongos y mohos), alérgenos de insectos (por ejemplo, cucarachas, pulgas, veneno de abeja y de avispa), y alérgenos epiteliales (pelo de animales, caspa de animales, por ejemplo caspa de gato y perro).

Los alérgenos del polen de árboles, gramíneas y hierbas se derivan del orden taxonómico Fagales (por ejemplo, *Alnus* y *Betula*), Lamiales (por ejemplo, *Olea* y *Plantago*), Poales (por ejemplo, *Phleum pratense*), Asterales (por ejemplo, *Ambrosia* y *Artemisia*), Cariofilales (por ejemplo, *Chenopodium* y *Salsola*), Rosales (por ejemplo, *Parietaria*), Proteales (por ejemplo, *Platanus*), etc. Los ácaros del polvo pertenecen al orden de Astigmata (por ejemplo, *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*). Los alérgenos aéreos se derivan de mohos y hongos que pertenecen al orden Pleosporales (por ejemplo, *Alternaria*), Capnodiales (por ejemplo, *Cladosporium*), etc.

El material de origen según la presente invención puede ser cualquier alérgeno, incluyendo alérgenos alimentarios, cacahuetes, cacahuetes enteros, alérgenos aéreos (por ejemplo, polen (polen de árboles, polen de hierbas, polen de gramíneas, polen de cereales), ácaros del polvo, hongos, mohos), ácaros, alérgenos de gramíneas, árboles y hierbas, alérgenos epiteliales (pelo de animales, caspa de animales, por ejemplo pelo y caspa de gato, y pelo y caspa de perro), y alérgenos de insectos (por ejemplo, cucarachas, pulgas, veneno de abejas y de avispas).

Un alérgeno alimentario carácter'sítico, dada su importancia alérgica es el cacahuete alérgeno(*Arachis hypogaea*).

Los alérgenos áereos pueden seleccionarse o se seleccionan de los grupos de polen de árboles (*Alnus glutinosa*, *Betula alba*, *Corylus avellana*, *Cupressus arizonica*,
5 *Olea europea*, *Platanus* sp.), polen de gramíneas (*Cynodon dactylon*, *Dactylis glomerata*,
Festuca elatior, *Holcus lanatus*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense*, *Phragmites communis*,
Poa pratensis), polen de hierbas (*Ambrosia elatior*, *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium*
album, *Parietaria judaica*, *Plantago lanceolata*, *Salsola kali*), y polen de cereales (*Avena*
10 *sativa*, *Hordeum vulgaris*, *Secale cereale*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*), ácaros del polvo
(*Acarus siro*, *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides microceras*,
Dermatophagoides pteronyssinus, *Euroglyphus maynei*, *Lepidoglyphus destructor*,
Tyrophagus putrescentiae), hongos y mohos (*Alternaria alternate*, *Cladosporium*
herbarum, *Aspergillus fumigatus*).

Los alérgenos epiteliales pueden seleccionarse de cualquier animal, incluyendo
15 pelo y caspa de gatos, pelo y caspa de perros, pelo y caspa de caballos, pelo y caspa
humanos, pelo y caspa de conejos, y plumas.

Los alérgenos de insectos pueden seleccionarse de hormigas, pulgas, ácaros
(*Acarus siro*, *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides microceras*,
Dermatophagoides pteronyssinus, *Euroglyphus maynei*, *Lepidoglyphus destructor*,
20 *Tyrophagus putrescentiae*), cucarachas, veneno de abejas, y veneno de avispas.

Preferiblemente, el material de origen se selecciona de alérgenos alimentarios
(*Arachis hypogaea*), polen (*Alnus glutinosa*, *Betula alba*, *Corylus avellana*, *Cupressus*
arizonica, *Olea europea*, *Platanus* sp., *Cynodon dactylon*, *Dactylis glomerata*, *Festuca*
elatior, *Holcus lanatus*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense*, *Phragmites communis*, *Poa*
25 *pratensis*, *Ambrosia elatior*, *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium album*, *Parietaria judaica*,
Plantago lanceolata, *Salsola kali*, *Avena sativa*, *Hordeum vulgaris*, *Secale cereale*,
Triticum aestivum, *Zea mays*), ácaros del polvo (*Acarus siro*, *Blomia tropicalis*,
Dermatophagoides farinae, *Dermatophagoides microceras*, *Dermatophagoides*
pteronyssinus, *Euroglyphus maynei*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus*
30 *putrescentiae*), hongos y mohos (*Alternaria alternate*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus*
fumigatus), alérgenos epiteliales (pelo y caspa de gatos, pelo y caspa de perros, pelo y
caspa de caballos, pelo y caspa humanos, pelo y caspa de conejos, y plumas), alérgenos
de insecto (hormigas, pulgas, ácaros, cucarachas, veneno de abejas, y veneno de
avispas).

Más preferiblemente, el material de origen se selecciona de cacahuets (*Arachis*
35 *hypogaea*), polen (*Olea europaea*, *Parietaria judaica*, *Phragmites communis* y *Phleum*
pratense), ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*) y material epitelial (caspa de gato).

En una realización preferida de la invención, el material de origen se selecciona de
Arachis hypogaea, *Olea europaea*, *Parietaria judaica*, *Phleum pratense*,
40 *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Phragmites communis*, y caspa de gato.

En una realización aún más preferida de la invención, el material de origen se selecciona de *Arachis hypogaea*, *Phleum pratense*, *Phragmites communis*, *Parietaria judaica*, y caspa de gato.

En una realización más preferida de la invención, el alérgeno es de *Arachis hypogaea*.

Cuando el material de origen son cacahuetes preferiblemente se elimina la piel, o el material puede triturarse o pulverizarse. Los cacahuetes pueden estar tostados, frito o crudos.

El material de origen puede tratarse para crear una superficie específica máxima para que se ponga en contacto con el agente de extracción líquida. El material de origen puede estar homogeneizado, mezclado, triturado o en polvo para producir una suspensión homogénea para la extracción líquida. La etapa de extracción líquida es una etapa de "desgrasado" para eliminar los compuestos lipófilos, como lípidos y ácidos grasos del material de origen.

El agente de extracción líquida puede ser acetona, que puede estar fría. La etapa de extracción líquida puede realizarse con una proporción de 1:1 (peso del material de origen/peso del agente de extracción líquida), o cualquier proporción en la que el peso del agente de extracción líquida sea mayor que el peso del material de origen, por ejemplo 1:2, 1:3, 1:5, 1:10. La etapa de extracción líquida se realiza preferiblemente en una proporción de 1 kg de material de origen por 2 l del agente de extracción líquida. La etapa de extracción líquida se realiza preferiblemente durante un tiempo suficiente para que los lípidos en el material de origen se disuelvan en el agente de extracción líquida, que puede ser durante más de 1 minuto, preferiblemente más de 5 min, más preferiblemente más de 30 minutos, y lo más preferiblemente durante 1 hora o más. La etapa de extracción líquida puede realizarse entre 20-25°C, pero se realiza preferiblemente en frío entre 2-6°C, y lo más preferiblemente entre 3-5°C. Durante la etapa de extracción líquida, el material de origen se agita preferiblemente con el agente de extracción líquida.

La primera etapa de separación puede ser una filtración.

Después de la primera etapa de separación, el residuo del material de origen puede lavarse con el agente de extracción líquida. Opcionalmente, el residuo del material de origen puede extraerse otra vez con el agente de extracción líquida y después separarse. Preferiblemente se realizan una, dos o más etapas de extracción líquida posteriores. La extracción líquida del residuo del material de origen preferiblemente continúa hasta que el agente de extracción líquida se mantiene transparente tras ponerlo en contacto con el residuo del material de origen.

Después de la extracción líquida, el residuo del material de origen puede secarse. El residuo del material de origen puede secarse entre 2-25°C y se seca preferiblemente a temperatura ambiente. La etapa de secado continúa preferiblemente durante un tiempo suficiente para permitir la eliminación del agente de extracción líquida del residuo del

material de origen, que puede ser entre 1-24 horas, 6-18 horas, 10-14 horas y preferiblemente durante aproximadamente 12 horas.

Los alérgenos pueden obtenerse a partir del residuo del material de origen “desgrasado” mediante una extracción con un agente de extracción de alérgenos para producir un extracto de alérgenos bruto que comprende alérgenos disueltos en la fase líquida, y una fase sólida que consiste en residuos no alergénicos “no deseados”. El agente de extracción de alérgenos puede ser una disolución acuosa y comprende preferiblemente un agente tamponante. El agente de extracción de alérgenos puede comprender PBS y/o NaCl, por ejemplo una disolución de PBS 0,01 M/NaCl 0,15 M. El residuo del material de origen puede extraerse en el agente de extracción de alérgenos en cualquier proporción en la que el peso del agente de extracción de alérgenos sea mayor que el peso del residuo del material de origen, por ejemplo 1:2, 1:3, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50. Preferiblemente, el residuo del material de origen se extrae en el agente de extracción de alérgenos en una proporción de residuo del material de origen:agente de extracción de alérgenos 1:10 (en p/p). La proporción del residuo del material de origen al agente de extracción de alérgenos en la etapa de extracción puede variar, pero debería de ser de tal forma que los alérgenos en el residuo del material de origen puedan disolverse en el agente de extracción de alérgenos. La extracción del residuo del material de origen con el agente de extracción de alérgenos se realiza preferiblemente durante un tiempo suficiente para que los alérgenos en el residuo del material de origen se disuelvan en el agente de extracción de alérgenos, que puede ser entre 30 minutos a 12 horas, preferiblemente entre 1-6 horas, más preferiblemente entre 2-5 horas, y lo más preferiblemente durante aproximadamente 4 horas. La etapa de extracción de alérgenos puede realizarse entre 20-25°C, pero se realiza preferiblemente fría entre 2-6°C, y lo más preferiblemente entre 3-5°C. Durante la etapa de extracción de alérgenos, el residuo del material de origen se agita preferiblemente con el agente de extracción de alérgenos.

Después de la etapa de extracción de alérgenos, los alérgenos disueltos en la fase líquida pueden separarse del residuo no alergénico para producir un extracto de alérgenos bruto. La etapa de separación es preferiblemente una centrifugación aunque pueden utilizarse muchas técnicas para separar sólidos de líquidos, siendo éstas muy conocidas por los expertos en la técnica. Preferiblemente, los alérgenos disueltos en la fase líquida se centrifugan entre 2-6°C, y preferiblemente entre 3-5°C, durante un tiempo suficiente para sedimentar el residuo no alergénico como un sedimento, por ejemplo entre 1 minuto a 1 hora, o más de 1 hora. El extracto de alérgenos bruto (es decir, el sobrenadante que contiene los alérgenos disueltos) puede conservarse entre 2-6°C. El sedimento del residuo no alergénico puede extraerse otra vez con el agente de extracción de alérgenos utilizando las mismas condiciones que la primera etapa de extracción de alérgenos, y preferiblemente durante un periodo de extracción más largo, como entre 4-8 horas, 8-12 horas, o más de 12 horas. Después de la segunda etapa de extracción de alérgenos, los alérgenos disueltos en la fase líquida pueden separarse del residuo no

alergénico para producir un extracto de alérgenos bruto. Los extractos de alérgenos brutos procedentes de la primera y la segunda etapa de extracción de alérgenos preferiblemente se reúnen para su posterior tratamiento.

5 El extracto de alérgenos bruto puede filtrarse, por ejemplo utilizando un tamaño de poro de 0,45 μm . El extracto de alérgenos bruto puede someterse a una etapa de eliminación de fracciones de bajo peso molecular para eliminar las moléculas que tengan un tamaño molecular bajo, como sales y otros compuestos no alergénicos. El solicitante ha determinado de modo experimental que la composición de proteínas y alérgenos de los extractos de cacahuete es entre 8 y 150 kDa, y que estos alérgenos deben retenerse durante las etapas de eliminación de fracciones moleculares. Por ejemplo, la proteína de transferencia de lípidos (LTP) (un importante alérgeno) de cacahuete tiene 8 kDa y necesita retenerse durante la etapa de eliminación de fracciones de bajo peso molecular. En la etapa e), las moléculas que tienen un peso molecular menor que 8 kDa, o 7 kDa, o 6 kDa, o 5 kDa, 4 kDa o 3,5 kDa pueden eliminarse. La etapa de eliminación de fracciones de bajo peso molecular continúa preferiblemente hasta que la conductividad del extracto de alérgenos a 3-5°C es menor que 900 $\mu\text{S/cm}$, o menor que 800 $\mu\text{S/cm}$, o menor que 700 $\mu\text{S/cm}$, o menor que 600 $\mu\text{S/cm}$, o más preferiblemente menor que 500 $\mu\text{S/cm}$. La etapa de eliminación de fracciones de bajo peso molecular continúa preferiblemente hasta que la conductividad del extracto de alérgenos a 3-5°C es entre 200 y 1000 $\mu\text{S/cm}$, o entre 300 y 900 $\mu\text{S/cm}$, y lo más preferiblemente entre 400 y 800 $\mu\text{S/cm}$.

El extracto de alérgenos nativos purificado resultante puede filtrarse, por ejemplo utilizando un tamaño de poro de 0,45 y/o 0,22 μm .

El extracto de alérgenos nativos puede utilizarse para la preparación de una composición farmacéutica o una vacuna para objetivos de estandarización, diagnóstico, síntesis y vacunación.

El proceso también puede comprender una etapa de tratamiento posterior, en la que se eliminan los compuestos no alergénicos adheridos a las proteínas de alérgeno utilizando medios que rompan las fuerzas electrostáticas, hidrófobas u otras fuerzas físicas que son responsables de la adherencia de los compuestos no alergénicos a las proteínas. Los medios para romper las fuerzas electrostáticas, hidrófobas u otras fuerzas físicas pueden seleccionarse del grupo de medios químicos que consisten en materiales ácidos y alcalinos, incluyendo materiales de intercambio aniónico y catiónico, sales y corrientes eléctricas. Los medios químicos ácidos y alcalinos pueden utilizarse en una cantidad que provoque que se exceda el punto isoeléctrico de las proteínas. El extracto de alérgenos resultante de esta etapa de tratamiento posterior se denomina en lo sucesivo en la presente el extracto de alérgenos despigmentado.

Esta etapa de tratamiento posterior puede comprender:

g) acidificar el extracto de alérgenos nativos, eliminar las moléculas que tengan un tamaño molecular menor que 3,5 kDa, y neutralizar el pH para producir un extracto de alérgenos despigmentado.

Esta etapa de tratamiento posterior comprende preferiblemente un tratamiento ácido suave. En el tratamiento ácido suave, el pH de las proteínas de alérgeno puede reducirse a un pH menor que 3, por ejemplo a un valor de pH entre 2,0 y 2,5. El pH de las proteínas de alérgeno puede estar entre 2,0 y 6,0. El solicitante ha identificado de modo experimental que el pH óptimo para despegar los compuestos no alergénicos adheridos a las proteínas de alérgeno es entre pH 2,0 y 2,1. Un valor de pH menor que 2,0 conduce a que el perfil de proteínas del extracto de alérgenos despigmentado sea incompleto, y un pH insuficientemente bajo, por ejemplo mayor que 3,0, conduce a la eliminación incompleta de los compuestos no alérgicos en el extracto de alérgenos despigmentado resultante.

El pH del extracto de alérgenos nativos puede reducirse utilizando un ácido adecuado, por ejemplo HCl. El extracto acidificado puede mantenerse a un pH bajo durante 1-60 minutos, preferiblemente 5-30 minutos, más preferiblemente 10-20 minutos, y lo más preferiblemente aproximadamente 15 minutos. Las moléculas que tienen un tamaño molecular menor que 3,5 kDa pueden eliminarse en una etapa de eliminación de fracciones de bajo peso molecular.

Después de la etapa de tratamiento posterior, el extracto despigmentado resultante puede recogerse, y el pH del extracto de alérgenos de cacahuete puede neutralizarse utilizando un álcali adecuado, por ejemplo NaOH. El pH puede ajustarse hasta un valor en que se evite la precipitación de las proteínas, por ejemplo mayor que pH 7,0, preferiblemente entre pH 7,0 y 8,0, más preferiblemente entre pH 7,0 y 7,5, y lo más preferiblemente entre pH 7,3 y 7,4.

La etapa de tratamiento posterior comprende:

g) acidificar el extracto de alérgenos nativos hasta pH 2-2,1 y mantener el extracto acidificado durante 5-30 minutos, seguido de someter al extracto a una etapa de eliminación de fracciones de bajo peso molecular para eliminar las moléculas que tengan un tamaño molecular menor que 3,5 kDa, y ajustar el pH a 7,3-7,4 para producir un extracto de alérgenos despigmentado.

La etapa de tratamiento posterior puede comprender acidificar el extracto de alérgenos nativos hasta un pH de 2,0 a 4,0.

Los medios para romper las fuerzas electrostáticas pueden comprender corrientes eléctricas en forma de una electroforesis. Los compuestos no alergénicos pueden tener un peso molecular menor que 8.000 daltons, 5.000 daltons y preferiblemente menor que 3.500 daltons, y pueden comprender flavonoides y/o sus glicósidos.

La etapa de eliminación de fracciones de bajo peso molecular puede ser una etapa de diálisis, en la que el extracto se dializa contra un dializado, como agua purificada o un tampón. La etapa de eliminación de fracciones de bajo peso molecular puede realizarse entre 20-25°C pero se realiza preferiblemente en frío entre 2-6°C, y lo más preferiblemente entre 3-5°C. La etapa de eliminación de fracciones de bajo peso

molecular puede realizarse durante 12-24 horas, en las que el disolvente, o en el caso de la diálisis, el dializado, se cambia regularmente para mantener la reacción.

El extracto de alérgenos despigmentado resultante puede filtrarse, por ejemplo utilizando un tamaño de poro de 0,45 μm y/o 0,22 μm , y puede congelarse o liofilizarse para su conservación.

Cualquiera de los extractos producidos utilizando el proceso de la presente invención puede tratarse posteriormente. El proceso puede comprender además una etapa de polimerización, que comprende:

h) poner en contacto un extracto de alérgenos nativos o un extracto de alérgenos despigmentado con un aldehído, y

i) eliminar las moléculas que tengan un tamaño molecular menor que 100 kDa.

El aldehído puede ser cualquier aldehído adecuado, por ejemplo glutaraldehído o formaldehído.

La etapa de polimerización puede comprender:

h) poner en contacto un extracto de alérgenos nativos o un extracto de alérgenos despigmentado con glutaraldehído o formaldehído,

i) someter el extracto a una etapa de eliminación de fracciones moleculares para eliminar las moléculas que tengan un tamaño molecular menor que 100 kDa, y

j) llevar a cabo la etapa i) hasta que el extracto de alérgenos tenga una conductividad menor que 210 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 3-5°C y/o está ausente de glutaraldehído para obtener un extracto de alérgenos polimerizado o un extracto despigmentado polimerizado.

Cuando el extracto para la polimerización se liofiliza, puede reconstituirse en un tampón, por ejemplo PBS 0,01 M/NaCl 0,15 M, hasta una concentración final de 0,1-500 mg/ml, preferiblemente 1-100 mg/ml y lo más preferiblemente 10-50 mg/ml.

La reacción de polimerización se realiza preferiblemente hasta que se completa, de forma que las bandas de proteínas <100 kDa (por ejemplo, 14-25 kDa) no sean detectables mediante una SDS-PAGE no reductora en el extracto polimerizado. El solicitante ha determinado de modo experimental (véase la tabla 2) que dos parámetros influyen en las condiciones óptimas para la polimerización.

En primer lugar, la concentración final del glutaraldehído es importante, por lo cual concentraciones crecientes de glutaraldehído disminuyen el rendimiento del polímero y aumentan el rendimiento del residuo obtenido mediante centrifugación antes de la diálisis. Por contraste a las condiciones de polimerización previamente conocidas, que emplean una concentración de glutaraldehído de aproximadamente 5 mg/ml (es decir, 0,009 ml de glutaraldehído por ml de extracto de alérgeno), se determinó de modo experimental que la concentración óptima de glutaraldehído era aproximadamente el doble que la de la cantidad conocida, es decir, 10 mg/ml (0,02 ml de glutaraldehído por ml de extracto de alérgenos). El aldehído puede añadirse en un intervalo de 1-20 mg/ml. Mientras que el empleo de las cantidades previamente conocidas de concentración final de glutaraldehído puede conducir a que se produzca algo de polimerización de los alérgenos, se prefiere

que el aldehído se añada a una concentración final de 10 mg/ml o en una proporción de 0,02 ml de glutaraldehído por ml de extracto para lograr una polimerización óptima.

En segundo lugar, el solicitante ha determinado que disminuyendo la velocidad de adición del glutaraldehído se disminuye el rendimiento del polímero y se aumenta el rendimiento del residuo. El aldehído puede añadirse al extracto a una velocidad
5 constante, por ejemplo entre 0,001-0,5 ml por minuto (1-500 μ l/min, 60-3000 μ l/hora).

La reacción de polimerización puede mantenerse entre 1-12 h, preferiblemente durante 7 horas a temperatura ambiente. La reacción de polimerización puede detenerse utilizando glicina en una proporción de 40 mg por ml de disolución de extracto
10 polimerizado. La reacción de detención puede mantenerse durante la noche a 3-5°C, preferiblemente con agitación. Los alérgenos polimerizados en la fase líquida pueden separarse del residuo insoluble para producir un extracto de alérgenos polimerizado o un extracto de alérgenos despigmentado polimerizado. La etapa de separación es preferiblemente una centrifugación, aunque son aplicables muchas técnicas de
15 separación, siendo éstas conocidas por los expertos en la técnica. Preferiblemente, el extracto se centrifuga entre 2-6°C, y preferiblemente entre 3-5°C, durante un tiempo suficiente para sedimentar el residuo insoluble como un sedimento, por ejemplo entre 1 minuto a 1 hora, o más de 1 hora. El sobrenadante (que contiene los alérgenos solubles) puede recogerse y someterse a una etapa de eliminación de fracciones moleculares (i).

En la etapa i), las moléculas que tienen un tamaño molecular menor que 150 kDa
20 pueden eliminarse. Se ha descubierto que las moléculas con un peso molecular mayor que 3 Mda precipitan y también pueden eliminarse durante la etapa de polimerización.

Preferiblemente, la etapa de eliminación de fracciones moleculares es una etapa de diálisis, en la que el extracto se dializa contra un dializado, como agua purificada o un
25 tampón, a 3-5°C. La etapa de eliminación de fracciones moleculares puede continuarse hasta que la conductividad medida a 3-5°C sea menor que 200 μ S/cm, más preferiblemente menor que 175 μ S/cm, más preferiblemente menor que 150 μ S/cm, más preferiblemente menor que 125 μ S/cm, más preferiblemente menor que 100 μ S/cm, más preferiblemente entre 50 y 200 μ S/cm, y lo más preferiblemente entre 100 y 150 μ S/cm.

El extracto de alérgenos resultante puede filtrarse, por ejemplo utilizando un
30 tamaño de poro de 0,45 μ m y/o 22 μ m, y puede congelarse o liofilizarse para su conservación.

Cualquiera de las etapas de eliminación de fracciones de bajo peso molecular c),
e) o g) puede comprender una etapa de ultrafiltración, una etapa de diafiltración, una
35 etapa de diálisis, o una filtración.

En su forma más simple, el proceso de la presente invención puede comprender preparar un extracto de alérgenos nativos soluble, opcionalmente tratar después el extracto, por ejemplo mediante un tratamiento ácido suave, para eliminar los compuestos
40 no alergénicos que tienen un tamaño molecular pequeño, y polimerizar el extracto utilizando un aldehído. El extracto de alérgenos nativos solubles puede ser de alérgenos

de cacahuete, polen, hierbas, epiteliales, de mohos, hongos, insectos o ácaros. El proceso de la presente invención produce un extracto de alérgenos que muestra una capacidad de unión a IgE reducida pero que mantiene su capacidad inmunogénica.

5 La presente invención comprende además un tratamiento para la alergia y un fármaco de diagnóstico para la alergia, que comprenden extractos de alérgenos producidos mediante los procesos de la presente invención, como ingrediente activo. La alergia puede estar asociada a la exposición a diversos alérgenos que provocan una respuesta alérgica mediada por IgE, según se analiza en la presente.

10 Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un extracto de alérgenos que puede obtenerse según el proceso del primer aspecto de la presente invención. Se proporciona un extracto de alérgenos purificado para su uso como sustancia terapéutica activa. Se proporciona un extracto de alérgenos nativos, un extracto de alérgenos nativos polimerizados, un extracto de alérgenos despigmentado, un extracto de alérgenos despigmentado polimerizado, que pueden obtenerse según el proceso del
15 primer aspecto de la presente invención. Preferiblemente, el extracto es un extracto de alérgenos nativos polimerizado, y más preferiblemente un extracto de alérgenos despigmentado polimerizado.

El extracto de alérgenos puede seleccionarse de alérgenos de cacahuete (*Arachis hypogaea*), polen (*Olea europaea*, *Parietaria judaica*, *Phragmites communis*, *Parietaria judaica* y *Phleum pratense*), ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*), y epiteliales (casha de gato).

El extracto de alérgeno puede utilizarse para el tratamiento de la alergia. En una realización preferida, el extracto de alérgenos de *Arachis hypogaea* puede utilizarse para el tratamiento de la alergia a los cacahuetes.

25 El extracto de alérgenos despigmentado polimerizado puede caracterizarse mediante las siguiente propiedades fisicoquímicas y biológicas:

- i. es soluble en agua,
- ii. no hay alérgenos/proteínas no polimerizados con un peso molecular menor que 100 kDa (identificados con bandas en una SDS-PAGE en condiciones no reductoras),
- 30 iii. no existen bandas de reconocimiento de IgE con un peso molecular menor que 100 kDa (identificadas mediante una inmunotransferencia en condiciones no reductoras),
- iv. no existen moléculas polimerizadas con un peso molecular menor que 100 kDa (determinadas mediante una cromatografía de exclusión molecular con HPLC),
- v. presenta una reducción del 75% de los grupos amino libres con respecto al
35 extracto nativo (determinado mediante el método de fluram),
- vi. presenta una reducción de la potencia biológica (95%) con respecto al extracto de alérgenos nativo (determinada mediante experimentos ELISA de IgE utilizando un pool específico de sueros de individuos sensibilizados), y
- vii. no hay toxicidad anómala en ratones.

Los extractos de alérgenos de la presente invención pueden utilizarse como componente activo de un medicamento para el tratamiento de un individuo alérgico, con el objetivo de inducir tolerancia a ciertos alérgenos.

5 Se proporciona el uso de un extracto de alérgenos según la presente invención en diagnósticos de trastornos inmunológicos, preferiblemente para detectar una enfermedad alérgica. Se proporciona el uso de un extracto de alérgenos según la presente invención para el tratamiento de la alergia o para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la alergia. El uso puede ser para inmunoterapia. El uso puede ser para objetivos de estandarización, diagnóstico, síntesis y vacunación. El uso puede ser en un
10 tratamiento terapéutico de pacientes, preferiblemente en inmunoterapia. El uso puede ser para controlar a los pacientes durante una inmunoterapia.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un extracto de alérgenos según la presente invención. Se proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de la alergia, que
15 comprende como ingrediente activo una cantidad farmacéuticamente eficaz de un extracto de alérgenos según la presente invención y al menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Se proporciona una composición de diagnóstico para la alergia que comprende como ingrediente activo una cantidad diagnósticamente eficaz de un extracto de alérgenos según la presente invención.

20 Según otro aspecto de la presente invención se proporciona una vacuna que comprende un extracto de alérgenos según la presente invención. La composición farmacéutica y la vacuna también pueden comprender uno o más adyuvantes, diluyentes, conservantes o sus mezclas. La composición farmacéutica o la vacuna pueden comprender un vehículo fisiológicamente aceptable. Tal como se emplea en la presente,
25 la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa preferiblemente un medio aprobado por una agencia reguladora de un gobierno, o listado en la Farmacopea Europea o de EEUU u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en seres humanos.

Estos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluyendo los que tienen su origen en el petróleo, un origen animal,
30 vegetal o sintético, como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. También pueden emplearse disoluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glucosa como vehículos líquidos, en particular para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen manitol, albúmina de suero humano (HSA), almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina,
35 tiza, gel de sílice, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada deshidratada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona un proceso para producir una vacuna de alérgenos, que comprende formular un extracto de alérgenos

según la presente invención, con uno o más adyuvantes, diluyentes, conservantes o sus mezclas.

5 Se proporciona una vacuna que puede obtenerse según el proceso del otro aspecto de la presente invención. La vacuna puede ser para el uso subcutáneo o sublingual.

Se proporciona el uso de una vacuna según la presente invención para el tratamiento de la alergia cacahuètes, o para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la alergia.

10 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para evitar una sensibilización a alérgenos, que comprende la etapa de exponer un individuo a una cantidad eficaz de un extracto de alérgenos, la composición farmacéutica o la vacuna de la presente invención.

15 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para tratar una alergia en un individuo sensibilizado, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un extracto de alérgenos, la composición farmacéutica o la vacuna de la presente invención. El extracto de alérgenos, la composición farmacéutica o la vacuna puede administrarse por vía subcutánea o sublingual, y puede administrarse como una dosificación creciente o constante.

20 El individuo puede ser un ser humano o un animal, preferiblemente un ser humano.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Resume el proceso para la producción de extractos de alérgenos.

25 **Figura 2:** Análisis de HPLC del extracto de alérgenos de cacahuètes nativos: patrón de baja amplitud BioRad (carril 1), extracto nativo (carril 2), precipitado (carril 3), fracción 20 (carril 4), fracción 21 (carril 5), fracción 40 (carril 6), fracción 78 (carril 7), fracción 96 (carril 8), fracción 111 (carril 9).

Figura 3: Análisis de HPLC del extracto de alérgenos de cacahuete despigmentado polimerizado.

30 **Figura 4:** Análisis de HPLC del residuo del extracto de alérgenos de cacahuete despigmentado polimerizado: patrón de baja amplitud BioRad (carril 1), residuo del extracto despigmentado polimerizado (carril 2), precipitado (carril 3), fracción 21 (carril 4), fracción 51 (carril 5), fracción 74 (carril 6), fracción 75 (carril 7), fracción 120 (carril 8).

35 **Figura 5:** Análisis de SDS-PAGE de 40 µg de extractos de alérgenos de cacahuete: STD (patrón de baja amplitud BioRad), carriles 1-4 bajo condiciones reductoras, carriles 5-8 bajo condiciones no reductoras, extracto nativo de cacahuete 230209/LN (carril 1), extracto despigmentado de cacahuete 230209/LD (carril 2), extracto despigmentado/polimerizado de cacahuete 030309/LP (carril 3), residuo del extracto despigmentado/polimerizado de cacahuete 030309/LP (carril 4), extracto nativo de cacahuete 230209/LN (carril 5), extracto despigmentado de cacahuete 230209/LD (carril

6), extracto despigmentado/polimerizado de cacahuete 030309/LP (carril 7), y residuo del extraco despigmentado/polimerizado de cacahuete 030309/LP (carril 8).

Figura 6: Análisis de IEF de 40 µg de extractos de alérgenos de cacahuete: patrones marcadores de IEF Bio-Rad, pl 4,45-9,6 (carriles 1 y 2), extracto nativo de cacahuete 230209/LN (carril 3), extracto despigmentado de cacahuete 230209/LD (carril 4), extracto despigmentado/polimerizado de cacahuete 030309/LP (carril 5), residuo del extracto despigmentado/polimerizado de cacahuete 030309/LP (carril 6).

Figure 7: Análisis de inmunotransferencia de 40 µg de extractos de alérgenos de cacahuete bajo condiciones reductoras (figura 7a) y bajo condiciones no reductoras (figura 7b) utilizando un pool de sueros de donantes alérgicos a los cacahuetes (dilución 1/20) y α-IgE-PO (120705, dilución 1/500), en la que en cada figura: extracto nativo de cacahuete 230209/LN (carril 1), extracto despigmentado de cacahuete 230209/LD (carril 2), extracto despigmentado/polimerizado de cacahuete 030309/LP (carril 3), residuo del extracto despigmentado/polimerizado de cacahuete 030309/LP (carril 4).

Figura 8: Análisis de la inhibición de inmunotransferencias de extractos de alérgenos de cacahuete bajo condiciones reductoras utilizando un pool de sueros de donantes alérgicos a los cacahuetes (dilución 1/20) y α-IgE-PO (120705, dilución 1/500), en la que el carril 1 es un control (sólo suero) y los carriles 2-4 utilizan los sueros agrupados junto con 800 µg de extracto de alérgenos de cacahuete despigmentado/polimerizado, 400 µg de extracto (carril 3), y 200 µg de extracto (carril 4).

Figura 9: ELISA basado en el análisis de la inhibición de IgE de extractos de alérgenos de cacahuete.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos que detallan procesos para la preparación, la purificación, el tratamiento posterior y la polimerización de extractos que comprenden alérgenos. Los métodos A-D detallan los procesos utilizados para fabricar los extractos de alérgenos, y los ejemplos 1-8 detallan la caracterización experimental de un extracto de alérgenos despigmentado polimerizado o despigmentado.

Métodos

A. Proceso de desgrasado del material de alérgenos bruto

Los extractos desgrasados se obtuvieron mediante diversos métodos dependiendo de la naturaleza del material bruto. Los métodos para cada alérgeno se definen en cada ejemplo.

En general, el material homogeneizado se desgrasa en acetona a 3-5 °C y se filtra. Esta etapa se repite hasta que la acetona es transparente. El material desgrasado se recupera y se seca a temperatura ambiente hasta que toda la acetona haya desaparecido.

B. Preparación del extracto de alérgenos nativos

El material desgrasado seco se pesó y se extrajo en PBS 0,01 M/NaCl 0,15 M en una proporción de 1:10 durante 4 horas a 3-5°C bajo agitación magnética. Después, la disolución se centrifugó durante 30 minutos a 4°C a 10.000 rpm. El sobrenadante

resultante se recogió y se conservó a 3-5°C, y el sedimento se reconstituyó en PBS 0,01 M/NaCl 0,15 M (1:10) y se extrajo durante la noche a 3-5°C bajo agitación magnética. Después la disolución se centrifugó durante 30 minutos a 3-5°C a 10.000 rpm y el sobrenadante se recogió y se mezcló con la fracción previamente obtenida. El extracto
5 reunido se filtró utilizando un tamaño de poro de 0,45 µm y se dializó extensamente en membranas de diálisis de límite de exclusión de 3 kDa hasta que la conductividad fue menor que 1000 µS/cm. El extracto entonces se esterilizó mediante filtración utilizando un tamaño de poro de 0,22 µm.

C. Preparación del extracto de alérgenos despigmentado

10 El extracto nativo en disolución salina y mantenido a 3-5°C se trató después utilizando el siguiente procedimiento. Bajo agitación magnética, el pH de la disolución se ajustó a 2-2,1 mediante la adición de HCl 0,1 M y se mantuvo bajo estas condiciones durante 15 minutos. Después el extracto se dializó en membranas de diálisis de límite de exclusión de 3,5 kDa con agua purificada durante 17 horas contra 10 volúmenes de agua
15 purificada a 3-5°C. El agua purificada se sustituyó 4 veces durante este periodo. Después del tratamiento ácido débil, el extracto se recogió y el pH se ajustó a 7,3-7,4 utilizando NaOH 0,1 M. Por último, el extracto se esterilizó mediante filtración hasta conseguir 0,22 µm, se congeló y se liofilizó.

D. Preparación del extracto de alérgenos despigmentado polimerizado

20 El extracto despigmentado liofilizado se reconstituyó en PBS 0,01 M/NaCl 0,15 M hasta una concentración final de 15 mg/ml con agitación magnética hasta que se disolvió completamente. El proceso de polimerización consistió en la adición de glutaraldehído, empleando 0,02 ml de glutaraldehído por ml de extracto despigmentado. El glutaraldehído se añadió al extracto despigmentado a una velocidad constante (36 ml/hora) utilizando un
25 inyector automático. La reacción de polimerización se mantuvo durante 7 horas a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de glicina en una proporción de 40 mg de glicerina por ml de disolución. La reacción se mantuvo durante la noche a 3-5°C bajo agitación magnética continua. Después la disolución se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos a 3-5°C. El sedimento se retiró y el sobrenadante se
30 recogió y se dializó extensamente en membranas de diálisis de límite de exclusión de 100 kDa con agua purificada (16,67 ml de agua por ml de extracto) en condiciones refrigeradas. Se consideró que el proceso había finalizado cuando la conductividad fue menor que 210 µS/cm, y se confirmó la ausencia de glutaraldehído mediante barrido de UV/luz visible. Por último, el extracto se esterilizó mediante filtración utilizando un tamaño
35 de poro de 0,22 µm, se congeló y se liofilizó.

El producto final consiste en un extracto despigmentado y polimerizado liofilizado que se conservó a 4°C en condiciones de liofilización.

Caracterización inmunológica

Contenido en proteínas

El contenido en proteínas de los extractos nativo, despigmentado y despigmentado/polimerizado y del residuo despigmentado/polimerizado se midió mediante el método de Lowry-Biuret siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados para un lote experimental del ejemplo 1 se muestran en la tabla 1.

5 Cromatografía de exclusión molecular (HPLC)

Una muestra liofilizada del extracto se resuspendió en agua muy purificada hasta una concentración final de 1 mg/ml y se agitó durante 10-15 minutos. La muestra se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se trasladó a un vial para la inyección automática. La columna utilizada para el análisis de HPLC fue PL-aquagel-OH
10 60 8 μ m (PolymerLabs), previamente equilibrada con agua, en la que el fraccionamiento se basa en las diferencias de tamaño. Las muestras se ensayaron con un caudal de 1 ml/min (siguiendo las recomendaciones del fabricante). Se detectaron las señales de UV a 254 nm y 280 nm para obtener un cromatograma. Las figuras 2-4 muestran los resultados del análisis de HPLC.

15 Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio

Se empleó un análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) para determinar el perfil antigénico/de proteínas de los extractos. Las muestras se ensayaron en geles de SDS-PAGE con acrilamida de 2,67%, C y 15%T al, en condiciones nativas o desnaturalizadas (la disolución tampón contenía β -
20 mercaptoetanol y se calentó durante 10 minutos a 95°C). Se cargaron 40 microgramos de material liofilizado de cada extracto en los geles. Como control se pusieron marcadores de referencia con pesos moleculares conocidos (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EEUU) en el mismo gel. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 (BioRad Laboratories). El perfil antigénico se estudió utilizando un escáner (Sharp JX-330; Sharp
25 Electronics Corp., Mahwah, NJ) y se analizó utilizando Image Master I-D Elite v. 4.00 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). La figura 5 muestra un gel teñido con azul de Coomassie, en el que el extracto de alérgenos despigmentado/polimerizados, bajo condiciones no reductoras (carril 7), muestra la ausencia de alérgenos/proteínas no polimerizadas con un peso molecular menor que 100 kDa.

30 Enfoque isoelectrico

Se empleó un análisis de enfoque isoelectrico (IEF) para determinar el perfil de proteínas/antigénico de los extractos según el punto isoelectrico de las proteínas. Las muestras se ensayaron en geles de electroforesis de poliacrilamida en condiciones
nativas. Se cargaron 40 microgramos de material liofilizado de cada extracto en los geles.
35 Se ensayaron marcadores de referencia con puntos isoelectricos conocidos (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EEUU) en el mismo gel. Los geles se tiñeron con azul Coomassie R-250 (BioRad Laboratories) y el perfil antigénico se estudió utilizando un escáner (Sharp JX-330; Sharp Electronics Corp., Mahwah, NJ) y se analizó utilizando Image Master I-D Elite v. 4.00 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Los carriles 3-6 de
40 la figura 6 muestran los resultados para el extracto nativo (carril 3), despigmentado (carril

4), despigmentado/polimerizado (carril 5) y para el residuo de extracto despigmentado/polimerizado (carril 6).

Inmunotransferencia

Las proteínas separadas mediante electroforesis se electrotransfirieron a membranas P-Immobilon (Millipore, Bedford, MA). Después de la transferencia, las membranas se secaron a temperatura ambiente durante 4 horas. Las membranas se incubaron durante la noche con un pool de sueros diluidos en salina tamponada con fosfato 0,01 M y Tween al 2%. Se detectó la unión específica a IgE utilizando un anticuerpo monoclonal anti-IgE humana conjugado con peroxidasa (Ingenasa, Madrid) durante 2 horas. El perfil alergénico se estudió utilizando el Sharp JX-330 y se analizó utilizando Image Master I-D Elite v. 4.00. Los carriles 1-4 de la figura 7b muestran los resultados para el extracto nativo (carril 1), despigmentado (carril 2), despigmentado/polimerizado (carril 3) y para el residuo de extracto despigmentado/polimerizado (carril 4) bajo condiciones no reductoras. El extracto de alérgenos despigmentado/polimerizado no muestra bandas de reconocimiento de IgE por debajo de 100 kDa. En la figura 8, se observa inhibición de IgE utilizando diluciones de extractos de alérgenos de cacahuete polimerizados, comparado con un pool de sueros de donantes alérgicos a los cacahuetes.

Inhibición de IgE

Se ensayó la actividad alergénica *in vitro* de los extractos (nativo, despigmentado y polimerizado) mediante ELISA de inhibición, estableciendo el punto de inhibición del 50% utilizando un extracto nativo como referencia. Se revistieron placas de microvaloración de plástico (Immulon IV; Dynex Technologies, Chatilly, VA) con el extracto nativo (10 µg de proteína/ml) durante la noche. Se realizaron varias diluciones a partir de los extractos nativo, despigmentado y polimerizado. Cada dilución se incubó con un pool de sueros durante 2 horas a temperatura ambiente. Después las diluciones de los extractos se trasladaron a las placas con extracto nativo revestidas y se incubaron durante 2 horas. Después de lavar se añadieron 100 µl de anti-IgE humana con peroxidasa y se dejó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar, las placas se revelaron durante 30 minutos y se detuvieron con ácido sulfúrico (1 N). Se observó la mayor inhibición de la unión de IgE utilizando el extracto de alérgenos despigmentado/polimerizado (figura 9).

Inhibición de IgG

Se ensayó la actividad alergénica *in vitro* de los extractos (nativo, despigmentado y polimerizado) mediante ELISA de inhibición, estableciendo el punto de inhibición del 50% utilizando un extracto nativo como referencia. Se revistieron placas de microvaloración de plástico (Immulon IV; Dynex Technologies, Chatilly, VA) con el extracto nativo (10 µg de proteína/ml) durante la noche. Se realizaron varias diluciones a partir de los extractos nativo, despigmentado y polimerizado. Cada dilución se incubó con un pool de sueros durante 2 horas a temperatura ambiente. Después las diluciones de los extractos se

trasladaron a las placas con extracto nativo revestidas y se incubaron durante 2 horas. Después de lavar se añadieron 100 µl de anti-IgG humana con peroxidasa y se dejó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar, las placas se revelaron durante 30 minutos y se detuvieron con ácido sulfúrico (1 N).

5 Fluram

La determinación de los grupos amino libres se detectó en extractos nativos, despigmentados y despigmentados-polimerizados. La polimerización reduce el número de grupos amino libres porque el entrecruzamiento entre alérgenos es mediado por este grupo reactivo. Se preparan extractos nativos y despigmentados a 25 µg/ml y extractos
10 despigmentados-polimerizados a 1000 µg/ml. Se emplea el ácido 6-aminocaproico a 2-10 mg/ml como patrón. Se añade disolución de Evans a todas las muestras. Los grupos amino se diluyen en este tampón. Después se añade tampón borato de sodio (0,2 M) a todas las muestras y se homogeneizan. Por último se añade fluorescamina, previamente diluida en acetona, a la mezcla, y la disolución se mide en un fluorímetro, con excitación a
15 390 nm y emisión a 480 nm.

Espectrofotometría de barrido de UV/visible

Los extractos nativo, despigmentado y despigmentado-polimerizado se diluyen a 1 mg/ml en PBS 0,01 M. Después de la dilución, las muestras se analizan a una λ entre 200 y 600 nm.

20 Potencia biológica mediante HEP

La actividad biológica de los extractos (nativo y despigmentado) se mide mediante una competición REINA. Placas de microtitulación de plástico se tapizatapizan con anti-IgE humana. Se añade un pool de sueros de individuos alérgicos a las microplacas y se incuban durante 30 minutos. Las muestras y una referencia interna (IHR) se diluyen
25 previamente y se incuban con la IHR marcada con peroxidasa. Después las microplacas se lavan y las muestras incubadas se añaden a las microplacas y se incuban durante 30 minutos. Por último, las microplacas se lavan y se incuban con cromógeno. Las placas se leen a 450 nm.

Toxicidad anómala en ratones

30 Siguiendo las recomendaciones de la Farmacopea Europea, se inyectaron ratones hembra (raza NMRI) con 1 ml de los extractos de cacahuete despigmentado y polimerizado a concentraciones de 0,1 mg/ml y 1 mg/ml. Se emplearon inyecciones intraperitoneales para la administración. El periodo de observación fue de 7 días después de los cuales no se observaron variaciones significativas en el peso o en el
35 comportamiento en los animales.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Extracto de alérgenos de cacahuete

Etapas A. Proceso de desgrasado del material de cacahuete bruto

40 Se homogeneizaron cacahuetes pelados en un mezclador para obtener una suspensión homogeneizada. El material homogeneizado se desengrasó con acetona fría

en una proporción de 1 kg de suspensión:2 l de acetona durante 1 hora a 3-5°C bajo agitación magnética continua para extraer los lípidos, los ácidos grasos y los flavonoides libres. La disolución resultante se filtró con un embudo Buchner. La acetona se retiró y el extracto de cacahuete se recogió en un filtro, y se lavó dos veces con acetona fresca. El proceso completo se repitió dos veces más hasta que la acetona recogida fue transparente. Después de terminar el proceso, el extracto de cacahuete desgrasado se recogió y se secó a temperatura ambiente bajo una campana de flujo laminar durante 12 horas, hasta que el material se secó totalmente y toda la acetona se hubo eliminado.

Se obtuvo un extracto de alérgenos de cacahuete despigmentado polimerizado según las etapas B-D del método.

Caracterización de los extractos de alérgenos de cacahuete

El producto de extracto de alérgenos de cacahuete despigmentado polimerizado tenía que cumplir las siguientes especificaciones:

- a. que el producto sea soluble en agua,
- b. que no haya alérgenos/proteínas no polimerizados con un peso molecular menor que 100 kDa (identificados como bandas mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras),
- c. que no existan bandas de reconocimiento de IgE con un peso molecular menor que 100 kDa (identificadas mediante inmunotransferencia en condiciones no reductoras),
- d. que no existan moléculas polimerizadas con un peso molecular menor que 100 kDa (determinadas mediante cromatografía de exclusión molecular con HPLC),
- e. que presente una reducción de los grupos amino libres (75%) con respecto al extracto nativo (determinada mediante el método del fluram),
- f. que presente una reducción de la potencia biológica (95%) con respecto al extracto nativo (determinada mediante experimentos de inhibición ELISA de IgE utilizando un pool específico de sueros procedentes de individuos sensibilizados),
- g. que no haya toxicidad anórmal en ratones.

El sedimento que comprende el residuo despigmentado/polimerizado se utilizó como control para la caracterización de los extractos nativo, despigmentado y despigmentado/polimerizado (véanse las tablas 1 y 2).

Cacah.	Lote	Rend.	ELISA de inh. (IgE), µg, inh. del 50% (% de pérdida de potencia)	ELISA de inh. (IgG), µg, inh. del 50% (% de pérdida de potencia)	Lowry-Biuret, µg de prot./mg de liof.	Fluram, µg de ACA/mg de liof. (% de pérdida de grupos amino)	UV-luz visible, 1 mg/ml
Nativo	230209/LN	5,95%	0,041	0,021	419,6	65,1	1,326 (264 nm)
Despigm.	230209/LD	85,3%	0,153	0,144	372,7	66,9	1,356

							(260 nm)
Despigm. y polimer.	030309/LP	9,08%	1,336 (96,9%)	0,699	348,3	6,45 (90%)	2,591 (260 nm)
Despigm. y polimer. (residuo)	030309/LP	46,3%	1,405 (97,1%)	0,627	234,6	2,82 (95,7%)	0,192 (260 nm)

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos con un lote experimental

Ejemplo 2 - Extracto de alérgenos de ambrosía (*Ambrosia artemisiifolia*)

5 Etapas A. Proceso de desgrasado del material de alérgeno bruto

Polen de ambrosía recogido de la planta después de la polinización se desengrasó con acetona fría en una proporción 1:4 (en p/v) bajo agitación continua durante 3 horas a 3-5 °C. La disolución resultante se filtró con un embudo Buchner y se lavó al menos tres veces con acetona fresca. Después de terminar el proceso, el extracto desgrasado se
10 recogió y se secó a temperatura ambiente bajo una campana de flujo laminar durante 12 horas, hasta que el material se secó totalmente y toda la acetona se hubo eliminado.

Se obtuvo el alérgeno de ambrosía (*Ambrosia artemisiifolia*) despigmentado polimerizado según las etapas B-D del método. El pH de la disolución se ajusta a 4-4,1 mediante la adición de HCl 0,1 M en la etapa 3.

15 El producto final consiste en un extracto de ambrosía despigmentado y polimerizado liofilizado que debe conservarse en condiciones de liofilización a 4 °C. El producto resultante tenía que cumplir las siguientes especificaciones:

- a. que el producto sea soluble en agua,
- b. que no haya alérgenos/proteínas no polimerizados con un peso molecular
20 menor que 100 kDa (identificados como bandas mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras),
- c. que no existan bandas de reconocimiento de IgE con un peso molecular menor que 100 kDa (identificadas mediante inmunotransferencia en condiciones no reductoras),
- d. que no existan moléculas polimerizadas con un peso molecular menor que 100
25 kDa (determinadas mediante cromatografía de exclusión molecular con HPLC),
- e. que presente una reducción de los grupos amino libres (75%) con respecto al extracto nativo (determinada mediante el método del fluram),
- f. que presente una reducción de la potencia biológica significativa con respecto al extracto nativo (determinada mediante experimentos de inhibición ELISA de IgE utilizando
30 un pool específico de sueros procedentes de individuos sensibilizados),
- g. que se detecten anticuerpos monoclonales del alérgeno principal Amb a 1,
- h. que no haya toxicidad anormal en ratones.

Contenido en el alérgeno principal

El contenido en el alérgeno principal Amb a 1 se midió utilizando el kit Indoor
35 Biotech (INDOOR Biotechnologies Inc., Charlottesville, Virginia, EEUU). Se tapizatapiza

un anticuerpo IgG policlonal anti-Amb a 1 (1:1000 del vial preparado a 1 mg/ml). Se prepara una curva patrón utilizando un extracto de ambrosía cuantificado y estandarizado frente a un extracto de la FDA de EEUU (referencia de inmunodifusión radial para Amb a 1, C14-RAS que contiene 30 U de Amb a 1/ml) que contiene una actividad 2,5 U/ml de Amb a 1. El anticuerpo secundario consiste en un anticuerpo biotinilado IgG policlonal generado contra el alérgeno de *A. artemisiifolia*. Las muestras nativa y despigmentada se diluyen a 500 ng/ml. Se calcula el contenido en el alérgeno principal en los extractos polimerizados utilizando estos valores.

El sedimento que comprende el residuo despigmentado/polimerizado se utilizó como control para la caracterización de los extractos nativo, despigmentado y despigmentado/polimerizado (véanse las tablas 3a y 3b).

Ambrosía	Rend. (%)	ELISA de inh. (IgE), inh. del 50% (µg) (% de pérdida de potencia)	Cont. en proteínas, µg de prot./mg	Fluram, µg de ACA/mg (% de reducción del grupo amino)	UV-visible, 1 mg/ml, Absorbancia (nm)	Amb a 1 U/mg liof.
Nativo	12,36	0,022	201	62,3	1,102 (272 nm)	61,3
Despigm.	77,4	0,011	288	82,4	0,766 (274 nm)	69,2
Despigm./ polimer. (0,009)	81,7	0,104	332	4,04 (93,5%)	1,665 (268 nm)	N/A
Despigm./ polimer. (0,013)	72,5	0,120	359	4,06 (93,5%)	1,687 (268 nm)	N/A
Despigm./ polimer. (0,02)	70,13	0,182	210	6,3 (89,9%)	1,610 (268 nm)	N/A
Despigm./ polimer. (0,018)	68,3	0,141	274	3,8 (93,8%)	1,502 (268 nm)	N/A

15 Tabla 3a - Resumen de los resultados obtenidos para el ejemplo 2 (ambrosía, *Ambrosia artemisiifolia*)

Ambrosía	SDS-PAGE (kDa)	Inmunotransferencia (kDa)	Tamaño molecular (kDa)
Nativo	10-100	10-100	10-100

Despigmentado	10-100	10-100	10-100
Despigmentado-polimerizado (0,009)	> 100	ausente	> 100
Despigmentado-polimerizado (0,013)	> 100	ausente	> 100
Despigmentado-polimerizado (0,02)	> 100	ausente	> 100
Despigmentado-polimerizado (0,018)	> 100	ausente	> 100

Tabla 3b - Resumen de los resultados obtenidos para el ejemplo 2 (ambrosía, *Ambrosia artemisiifolia*)

5 **Ejemplo 3 - Extracto de alérgenos del polen (*Olea europaea*)**

Polen de *Olea europaea* recogido del árbol después de la polinización se desengrasó con acetona fría en una proporción 1:4 (en p/v) bajo agitación continua durante 3 horas a 3-5 °C. La disolución resultante se filtró con un embudo Buchner y se lavó al menos tres veces con acetona fresca. Después de terminar el proceso, el extracto desgrasado se recogió y se secó a temperatura ambiente bajo una campana de flujo laminar durante 12 horas, hasta que el material se secó totalmente y toda la acetona se hubo eliminado.

Se obtuvo el extracto de alérgeno de polen despigmentado según las etapas B-C del método.

15 El producto final consiste en un extracto despigmentado liofilizado que debe conservarse en condiciones de liofilización a 4 °C. El producto resultante tiene que cumplir las siguientes especificaciones:

- a. que el producto sea soluble en agua,
- b. que tenga un perfil de proteínas similar al extracto nativo, determinado mediante SDS-PAGE y 2D,
- c. que tenga un perfil alergénico similar al extracto nativo, determinado mediante inmunotransferencia,
- d. que tenga un contenido en proteínas similar al extracto nativo,
- e. que tenga un contenido en alérgeno principal similar al extracto nativo,
- 25 f. que tenga una actividad biológica similar al extracto nativo.

<i>Olea europaea</i>	Rend. (%)	ELISA de inh. (IgE), µg, 50% de inh.	Cont. en proteínas, µg de prot./mg	UV-visible, 1 mg/ml	Potencia, HEP-L/mg
----------------------	-----------	--------------------------------------	------------------------------------	---------------------	--------------------

Nativo	3,64	0,009	321,6	1,577 (270 nm)	257,2
Despigmentado, pH 2	74,0	0,009	307,4	1,302 (274 nm)	196,8
Despigmentado, pH 3	62,0	0,007	324,2	1,365 (274 nm)	204,8
Despigmentado, pH 4	70,7	0,008	368,7	1,291 (274 nm)	221,3
Despigmentado, pH 5	78,2	0,009	348,8	1,374 (274 nm)	257,7
Despigmentado, pH 6	80,2	0,010	402,1	1,348 (274 nm)	247,0

Tabla 4 - Resumen de los resultados obtenidos para el ejemplo 3 (*Olea europaea*)

Ejemplo 4 - Extracto de alérgenos del polen (*Parietaria judaica*)

5 Polen de *Parietaria judaica* recogido de la planta después de la polinización se desengrasó con acetona fría en una proporción 1:4 (en p/v) bajo agitación continua durante 3 horas a 3-5 °C. La disolución resultante se filtró con un embudo Buchner y se lavó al menos tres veces con acetona fresca. Después de terminar el proceso, el extracto desgrasado se recogió y se secó a temperatura ambiente bajo una campana de flujo laminar durante 12 horas, hasta que el material se secó totalmente y toda la acetona se hubo eliminado.

Se obtuvo el extracto de alérgeno de polen desengrasado según la etapa B del método.

15 El producto final consiste en un extracto despigmentado liofilizado que debe conservarse en condiciones de liofilización a 4 °C. El producto resultante tiene que cumplir las siguientes especificaciones:

- a. que el producto sea soluble en agua,
- b. que tenga un perfil de proteínas similar al extracto nativo, determinado mediante SDS-PAGE y 2D,
- 20 c. que tenga un perfil alergénico similar al extracto nativo, determinado mediante inmunotransferencia,
- d. que tenga un contenido en proteínas similar al extracto nativo,
- e. que tenga un contenido en alérgeno principal similar al extracto nativo,
- f. que tenga una actividad biológica similar al extracto nativo.

25

<i>Parietaria judaica</i>	Rend. (%)	ELISA de inh. (IgE), µg, 50% de inh.	Lowry-Biuret, µg de prot./mg	UV-visible, 1 mg/ml	Potencia, HEP-L/mg
Nativo	4,07	0,031	219,7	3,073 (266 nm) 1,492 (342 nm)	281
Despigmentado, pH 2	82,7	0,018	197,9	2,680 (270 nm) 1,393 (342 nm)	397
Despigmentado, pH 3	79,5	0,015	228,6	2,943 (270 nm)	430

				1,519 (346 nm)	
Despigmentado, pH 4	83,5	0,017	213,5	2,769 (270 nm) 1,463 (348 nm)	534
Despigmentado, pH 5	79,9	0,012	245,4	2,658 (272 nm) 1,504 (344 nm)	1007
Despigmentado, pH 6	87,3	0,001	216,2	2,763 (272 nm) 1,539 (344 nm)	954

Tabla 5 - Resumen de los resultados obtenidos para el ejemplo 5 (*Parietaria judaica*)

Ejemplo 5 - Extracto de alérgenos de ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*)

- 5
- Se obtuvo el extracto de alérgenos de ácaros siguiendo la etapa B del método a partir de un cultivo maduro de *Dermatophagoides pteronyssinus*.
- El producto final consiste en un extracto despigmentado liofilizado que debe conservarse en condiciones de liofilización a 4 °C. El producto resultante tenía que cumplir las siguientes especificaciones:
- 10
- a. que el producto sea soluble en agua,
- b. que tenga un perfil de proteínas similar al extracto nativo, determinado mediante SDS-PAGE y 2D,
- c. que tenga un perfil alergénico similar al extracto nativo, determinado mediante inmunotransferencia,
- 15
- d. que tenga un contenido en proteínas similar al extracto nativo,
- e. que tenga un contenido en alérgeno principal similar al extracto nativo,
- f. que tenga una actividad biológica similar al extracto nativo.

Contenido en el alérgeno principal

- 20
- Indoor Biotech en *D. pteronyssinus*. Se revistieron anticuerpos IgG monoclonales anti-Der p 1 y/o anti-Der p 2 (1:1000 del vial preparado a 1 mg/ml para Der p 1, y 2 mg/ml para Der p 2) en pocillos de microtitulación de poliestireno (NUNC Maxisorp). Se prepara una curva patrón utilizando un patrón universal cuantificado y estandarizado (subestandarizado frente a la referencia de *D. pteronyssinus* de WHO/IUIS que contiene 2500 ng/ml de Der p 1, y 1000 ng/ml de Der p 2). Las diluciones de la curva control son de 250-0,49 ng/ml para Der p 1, y 100-0,2 ng/ml para Der p 2. Las muestras de ácaros se diluyeron en dos veces de forma rutinaria. Después de lavar la placa se añadieron 100 µl de las muestras y el patrón de alérgeno diluido y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar la placa se añadieron 100 µl de anticuerpo secundario (anticuerpo IgG monoclonal biotinilado) diluido 1/1000 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar la placa se añadieron 100 µl de estreptavidina-peroxidasa diluida 1/1000 y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último la placa se lava, se revela añadiendo 100 µl de ABTS 1 mM en tampón citrato fosfato 70 mM, pH 4,2,
- 25
-
- 30

que contenía una dilución 1/1000 de H2O2 al 30% (es decir, ABTS 10 µl/10 ml) y se leyó cuando la densidad óptica a 405 nm alcanzó 2,0-2,4.

<i>D. pteronyssinus</i>	Rend. (%)	ELISA de inh. (IgE), µg, inh. del 50%	Lowry-Biuret, µg de prot./mg	UV-visible, 1 mg/ml	Potencia, HEP-L/mg	µg de Der p 1/mg liofil.	µg de Der p 2/mg liofil.
Nativo.	4,59	0,161	251,7	1,909 (276 nm)	327	8,49	7,98
Despig. pH 2	34,7	0,268	238,1	1,851 (276 nm)	339	0,37	14,62
Despig. pH 2	63,7	0,136	257,8	2,057 (276 nm)	555	8,96	12,18
Despig. pH 2	67,6	0,110	271,4	2,188 (276 nm)	873	13,32	10,92
Despig. pH 2	79,1	0,127	265,5	2,122 (276 nm)	1221	14,10	8,40
Despig. pH 2	81,1	0,116	307,9	2,133 (276 nm)	1705	13,20	8,55

5 Tabla 6 - Resumen de los resultados obtenidos para el ejemplo 5 (*Dermatophagoides pteronyssinus*)

Ejemplo 6 - Extracto de alérgenos del carrizo (*Phragmites communis*)

10 Polen de *Phragmites communis* recogido de la planta después de la polinización se desengrasó con acetona fría en una proporción 1:4 (en p/v) bajo agitación continua durante 3 horas a 3-5 °C. La disolución resultante se filtró con un embudo Buchner y se lavó al menos tres veces con acetona fresca. Después de terminar el proceso, el extracto desgrasado se recogió y se secó a temperatura ambiente bajo una campana de flujo laminar durante 12 horas, hasta que el material se secó totalmente y toda la acetona se
15 hubo eliminado.

Se obtuvo el extracto del alérgeno de *Phragmites* despigmentado polimerizado según las etapas B-D del método. En la etapa D, el proceso de polimerización consiste en la adición de glutaraldehído utilizando un factor de 0,015 ml de glutaraldehído/ml de extracto.

20 El producto final consiste en un extracto de *Phragmites* despigmentado y polimerizado liofilizado que debe conservarse en condiciones de liofilización a 4 °C. El producto resultante tenía que cumplir las siguientes especificaciones:

- a. que el producto sea soluble en agua,

- b. que no haya alérgenos/proteínas no polimerizados con un peso molecular menor que 100 kDa (identificados como bandas mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras),
- c. que no existan bandas de reconocimiento de IgE con un peso molecular menor que 100 kDa (identificadas mediante inmunotransferencia en condiciones no reductoras),
- d. que no existan moléculas polimerizadas con un peso molecular menor que 100 kDa (determinadas mediante cromatografía de exclusión molecular con HPLC),
- e. que presente una reducción de los grupos amino libres (75%) con respecto al extracto nativo (determinada mediante el método del fluram),
- f. que presente una reducción de la potencia biológica significativa con respecto al extracto nativo (determinada mediante experimentos de inhibición ELISA de IgE utilizando un pool específico de sueros procedentes de individuos sensibilizados),
- g. que no haya toxicidad anómal en ratones.

El sedimento que comprende el residuo despigmentado/polimerizado se utilizó como control para la caracterización de los extractos nativo, despigmentado y despigmentado/polimerizado (véanse las tablas 7a y 7b).

<i>P. communis</i>	Rend. (%)	ELISA de inh. (IgE), inh. del 50% (µg) (% de pérdida de potencia)	Cont. en proteínas, µg de prot./mg	Fluram, µg de ACA/mg (% de reducción del grupo amino)	UV-visible, 1 mg/ml, Absorbancia (nm)
Nativo		0,486	240,7	145	1,074 (272 nm)
Despigm.		0,847	321,5	103	0,844 (274 nm)
Despigm./ polimer. (0,009)	80,7 (2,74)	2,051	329,8	3,6 (95,7)	1,891 (266 nm)
Despigm./ polimer. (0,045)	80,7 (3,1)	1,217	381,4	6,3 (95,7)	1,897 (268 nm)
Despigm./ polimer. (0,015)	64,8 (4,75)	5,080	306,2	1,6 (98,9)	2,206 (268 nm)
Despigm./ polimer. (0,02)	25,2 (2,5)	5,035	306,1	24,3 (83,2)	1,749 (266 nm)

Tabla 7a - Resumen de los resultados obtenidos para el ejemplo 6 (*Phragmites communis*)

<i>P. communis</i>	SDS-PAGE (kDa)	Inmunotransferencia (kDa)	Tamaño molecular (kDa)
Nativo	10-100	10-100	10-100
Despigmentado	10-100	10-100	10-100
Despigmentado-polimerizado (0,009)	> 100	ausente	> 100
Despigmentado-polimerizado (0,045)	> 100	ausente	> 100
Despigmentado-polimerizado (0,015)	> 100	ausente	> 100
Despigmentado-polimerizado (0,02)	> 100	ausente	> 100

Tabla 7b - Resumen de los resultados obtenidos para el ejemplo 6 (*Phragmites communis*)

5

Ejemplo 7 - Extracto de alérgenos epiteliales de gato

Se desengrasó pelo de gato con acetona fría en una proporción 1:4 (en p/v) manteniendolodurante cinco minutos de agitación cada hora durante 7 horas a 3-5 °C. El desengrasado continuó durante al menos 16 horas sin agitación. La disolución resultante se filtró con un embudo Buchner y se guardaron los matraces. El pelo de gato de nuevo se desengrasó con la misma acetona durante 1 hora a temperatura ambiente y se repitió dos veces. Los copos obtenidos se recogieron y se secaron a temperatura ambiente bajo una campana de flujo laminar durante 15 horas, hasta que el material se secó totalmente y toda la acetona se hubo eliminado.

10

15

En la etapa B, el material de copos de piel desengrasado secado obtenido de pelo de gato se pesa y se extrae en PBS 0,01 M/NaCl 0,15 M en una proporción 1:40 durante 4 horas a 3-5 °C y bajo agitación magnética.

Se obtuvo el extracto del alérgeno de gato despigmentado polimerizado según las etapas B-D del método.

20

El producto final consiste en un extracto de epitelio de gato despigmentado y polimerizado liofilizado que debe conservarse en condiciones de liofilización a 4 °C. El producto resultante tenía que cumplir las siguientes especificaciones:

25

- a. que el producto sea soluble en agua,
- b. que presente una reducción de los grupos amino libres (75%) con respecto al extracto nativo (determinada mediante el método del fluram),
- c. que presente una reducción de la potencia biológica significativa con respecto al extracto nativo (determinada mediante experimentos de competición REINA de IgE utilizando pool específico de sueros procedentes de individuos sensibilizados),

- d. que puedan detectarse anticuerpos monoclonales frente al alérgeno principal Fel d 1,
- e. que no haya toxicidad anormal en ratones.

Contenido en el alérgeno principal

5 El contenido de alérgeno principal Fel d 1 se midió utilizando el kit Indoor Biotech. Se tapizatapiza un anticuerpo IgG1 monoclonal anti-Amb a 1 (1:1000 del vial preparado a 1 mg/ml). Se prepara una curva patrón utilizando un patrón de alérgeno universal que contiene 1000 ng de Fel d 1/ml. El anticuerpo secundario consiste en un anticuerpo

10 nativa y despigmentada se diluyen a 250 ng/ml. Se calcula el contenido en el alérgeno principal en los extractos polimerizados utilizando estos valores.

El sedimento que comprende el residuo despigmentado/polimerizado se utilizó como control para la caracterización de los extractos nativo, despigmentado y despigmentado/polimerizado (véase la tabla 8).

15

Epitelio de gato	Rend. (%)	ELISA de inh. (IgE), inh. del 50% (µg) (% de pérdida de potencia)	Cont. en proteínas, µg de prot./mg	Fluram, µg de ACA/mg (% de reducción del grupo amino)	UV-visible, 1 mg/ml, Absorbancia (nm)	Potencia (HEPL/mg)	Fel d 1, µg/ml
Nativo	10,3	0,029	154	14	0,396 (280 nm)	1488	42
Despigm.	85,9	0,044	195	10,4	0,428 (280 nm)	1478	42
Despigm./ polimer. (0,009)	96,2	0,192	171	1,5 (8,9%)	0,701 (268 nm)	28	8
Despigm./ polimer. (0,013)	92,9	0,373	183	1,4 (90,6%)	0,698 (268 nm)	23	7
Despigm./ polimer. (0,02)	90,6	0,494	169	1,2 (91,5%)	0,769 (268 nm)	17	2

Tabla 8 - Resumen de los resultados obtenidos para el ejemplo 7 (epitelio de gato)

Ejemplo 8 - Extracto de alérgenos de *Phleum pratense*

Polen de *Phleum pratense* recogido de la planta después de la polinización se desengrasó con acetona fría en una proporción 1:4 (en p/v) bajo agitación continua durante 3 horas a 3-5 °C. La disolución resultante se filtró con un embudo Buchner y se lavó al menos tres veces con acetona fresca. Después de terminar el proceso, el extracto desengrasado se recogió y se secó a temperatura ambiente bajo una campana de flujo laminar durante 12 horas, hasta que el material se secó totalmente y toda la acetona se hubo eliminado.

Se obtuvo el extracto del alérgeno de *Phleum pratense* despigmentado polimerizado según las etapas B-D del método. En la etapa D, el proceso de polimerización consiste en la adición de glutaraldehído utilizando un factor de 0,009 ml de glutaraldehído/ml de extracto.

El producto final consiste en un extracto de *Phleum pratense* despigmentado y polimerizado liofilizado que debe conservarse en condiciones de liofilización a 4 °C. El producto resultante tenía que cumplir las siguientes especificaciones:

- a. que el producto sea soluble en agua,
- b. que no haya alérgenos/proteínas no polimerizados con un peso molecular menor que 100 kDa (identificados como bandas mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras),
- c. que no existan bandas de reconocimiento de IgE con un peso molecular menor que 100 kDa (identificadas mediante inmunotransferencia en condiciones no reductoras),
- d. que no existan moléculas polimerizadas con un peso molecular menor que 100 kDa (determinadas mediante cromatografía de exclusión molecular con HPLC),
- e. que presente una reducción de los grupos amino libres (75%) con respecto al extracto nativo (determinada mediante el método del fluram),
- f. que presente una reducción de la potencia biológica significativa con respecto al extracto nativo (determinada mediante experimentos de inhibición ELISA de IgE utilizando un pool específico de sueros procedentes de individuos sensibilizados),
- g. que no haya toxicidad anormal en ratones.

Contenido en el alérgeno principal

El contenido en el alérgeno principal Phl p 5 se midió utilizando el kit Indoor Biotech. Se tapizatapiza un anticuerpo IgG1 monoclonal anti-Phl p 5 (1:1000 del vial preparado a 2 mg/ml). Se prepara una curva patrón utilizando un Phl p 5a recombinante. El anticuerpo secundario consiste en un anticuerpo biotinilado IgG1 monoclonal generado contra el alérgeno de *Phleum pratense*. Las muestras nativa y despigmentada se diluyen a 250 ng/ml. Se calcula el contenido en el alérgeno principal en los extractos polimerizados utilizando estos valores.

El sedimento que comprende el residuo despigmentado/polimerizado se utilizó como control para la caracterización de los extractos nativo, despigmentado y despigmentado/polimerizado (véase la tabla 9).

<i>Phleum pratense</i>	Rend. (%)	ELISA de inh. (IgE), inh. del 50% (µg) (% de pérdida de potencia)	Cont. en proteínas, µg de prot./mg	Potencia (HEPL/mg)	SDS-PAGE, kDa	Inmuno-transf.	Tamaño molec., kDa
Nativo	8,42	0,089	409,9	904,5	10-100	1478	10-100
Despigm.	45,0	0,341	446,0	35,3	10-100	28	10-100
Despigm./ polimer. (0,009)	98,0	0,305	464,3	13,2	> 100	ausente	> 100
Despigm./ polimer. (0,013)	19,85	0,429	420,5	19,3	> 100	ausente	> 100
Despigm./ polimer. (0,02)	57,5	1,274	1234,8	14,4	> 100	ausente	> 100

Tabla 9. - Resumen de los resultados obtenidos para el ejemplo 8 (*Phleum pratense*)

Referencias bibliográficas

5

1. Vickery, B., Burks, W., *Immunotherapy in the treatment of food allergy: focus oral tolerance*, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., 2009, 9:364-370.

2. King, R.M., Knibb, R.C., y Hourihane, J.O.B., *Impact of peanut allergy on quality of life, stress and anxiety in the family*, Allergy, 2009, 64:461-468.

3. Enrique, E., Pineda, F., Malek, T., Bartra, J., Basagaña, M., Tella, R., Castelló, J.V., Alonso, R., de Mateo, J.A., Cerdá-Trias, T., San Miguel-Moncín Mdel, M., Monzón, S., García, M., Palacios, R., Cisteró-Bahima, A., *Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study with a standardized hazelnut extract*, J. Allergy Clin. Immunol., 2005, 116(5):1073-1079.

10

4. Fernández-Rivas, M., Garrido Fernández, S., Nadal, J.A., Díaz de Durana, M.D., García, B.E., González-Mancebo, E., Martín, S., Barber, D., Rico, P., Tabar, A.I., *Randomized double-blind, placebo-controlled trial of sublingual immunotherapy with a Pru p 3 quantified peach extract*, Allergy, 2009, 64(6):876-883.

15

5. Hofmann, A.M., Scurlock, A.M., Jones, S.M., Palmer, K.P., Lokhnygina, Y., Steele, P.H., Kamilaris, J., Burks, A.W., *Safety of a peanut oral immunotherapy protocol in children with peanut allergy*, J. Allergy Clin. Immunol., 26 de mayo 2009.

20

6. Jones, S.M., Pons, L., Roberts, J.L., Scurlock, A.M., Perry, T.T., Kulis, M., Shreffler, W.G., Steele, P., Henry, K.A., Adair, M., Francis, J.M., Durham, S., Vickery,

B.P., Zhong, X., Burks, A.W., *Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy*, J. Allergy. Clin. Immunol., agosto 2009, 124(2):292-300, 300.

7. Clark, A.T., Islam, S., King, Y., *Successful oral tolerance induction in severe peanut allergy*, Allergy, agosto 2009, 64(8):1218-1220.

5 8. Wallace, D.V., *Pet dander and perennial allergic rhinitis: therapeutic options*, Allergy Asthma Proc., nov.-dic. 2009, 30(6):573-583.

9. Ling, M., Long, A.A., *Pet dander and difficult-to-control asthma: Therapeutic options*, Allergy Asthma Proc., sept. 2010, 31(5):385-391.

10 10. Grönlund, H., Saarne, T., Gafvelin, G., van Hage, M., *The major cat allergen, Fel d 1, in diagnosis and therapy*, Int. Arch. Allergy Immunol., 2010, 151(4):265-274, Epub 22 de oct. de 2009, artículo.

Referencias de sitios Web

ⁱ Allergen nomenclature. International Union of Immunological Societies, Allergen Nomenclature Sub-Committee, última actualización de la lista, 21 de julio, 2009.

15

	Cacahuete	Lote	Glutaraldehído Concentración final Factor (veloc. de adición)	Rendimiento del polímero (%)	Rendimiento del residuo (%)	Rendimiento total (%)	SDS-PAGE				Transferencia Western			
							Bandas<100 kDa Condiciones reductoras		Bandas<100 kDa Condiciones no reductoras		Bandas<100 kDa Condiciones reductoras		Bandas<100 kDa Condiciones no reductoras	
							polímero	residuo	polímero	residuo	polímero	residuo	polímero	residuo
Ensayos para establecer la concentración de glutaraldehído y la velocidad de adición apropiadas	Depigoid	250808/LP	4,5 mg/ml 0,009 (manual)	45	12,96	57,96	sí	sí	sí	sí				
	Depigoid	260808/LP	15 mg/ml 0,03 (manual)	7	5,85	12,85	sí	sí	sí	sí				
	Depigoid	270808/LP	50 mg/ml 0,1 (manual)	8,6	49,85	58,45	sí	sí	si	sí				
	Depigoid	020908/LP	4,5 mg/ml 0,009 (100 µl/min)	41,8	11,4	53,2	sí	sí	sí	sí				
	Depigoid	030908/LP	4,5 mg/ml 0,009 (10 µl/min)	41,3	24,3	65,6	sí	sí	sí	sí				
	Depigoid	040908/LP	4,5 mg/ml 0,009 (3 µl/min)	33,8	28,6	62,4	sí	sí	sí	sí				
	Depigoid	230908/LP	10 mg/ml 0,02 (133 µl/min)	14,3	41,13	55,43	sí	sí	no	sí				
	Depigoid	240908/LP	10 mg/ml 0,02 (20 µl/min)	12,83	42,15	54,98	sí	sí	no	sí				
	Depigoid	250908/LP	10 mg/ml 0,02 (6,6 µl/min)	*	44	*	*	sí	*	sí				
Cacahuete del proyecto (frito/crudo)	Depigoid	300908/LP	2,25 mg/ml 0,0045 (100 µl/min)	52,65	12	64,65	sí	sí	sí	sí				
	Depigoid	030309/LP	10 mg/ml 0,02 (100 µl/min)	9,1	46,3	55,4	sí	sí	no	sí	sí	sí	no	no
	Depigoid	030309/LP	10 mg/ml 0,02 (100 µl/min)	9,1	46,3	55,4	sí	sí	no	sí	sí	sí	no	no

* el polímero se perdió

Tabla 2. Efectos de la concentración final de glutaraldehído y de la velocidad de adición sobre la polimerización

REIVINDICACIONES

1.- Un proceso para producir un extracto de alérgenos que comprende:

- 5 a) poner en contacto un material de origen natural con un agente de extracción líquida para producir una mezcla que contiene lípidos disueltos en la fase líquida, y una fase sólida que consiste en residuos del material de origen que comprenden alérgenos y proteínas, entre otras muestras biológicas
- b) someter la mezcla a una primera etapa de separación para aislar los residuos del material de origen;
- 10 c) poner en contacto los residuos del material de origen con un agente de extracto de alérgenos para producir una mezcla de alérgenoalérgenos/proteínas disuelta en la fase líquida, y una fase sólida que consiste en residuos no alergénicos,
- d) someter la mezcla a una segunda etapa de separación para aislar los alérgenos disueltos en la fase líquida, para producir un extracto de alérgenos bruto,
- 15 e) someter al extracto de alérgenos bruto a una etapa de eliminación de fracciones de bajo peso molecular para eliminar las moléculas que tengan un tamaño molecular menor que 3,5 kDa, y
- f) llevar a cabo la etapa e) hasta que el extracto de alérgenos tenga una conductividad menor que 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 3-5°C para obtener un extracto de alérgenos nativos purificado.

20 2.- Un proceso según la reivindicación 1, en el que la etapa de eliminación de fracciones de bajo peso molecular continúa hasta que la conductividad es menor que 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 3-5°C.

3.- Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una etapa de tratamiento posterior que comprende:

- 25 g) acidificar el extracto de alérgenos nativos hasta pH 2-3,0 y mantener el extracto acidificado durante 5-30 minutos, seguido de someter al extracto a una etapa de eliminación de fracciones de bajo peso molecular para eliminar las moléculas que tengan un tamaño molecular menor que 3,5 kDa, y ajustar el pH a 7,0-8,0 para producir un extracto de alérgenos despigmentado.

30 4.- Un proceso según la reivindicación 3, en el que el extracto de alérgenos nativos se acidifica hasta pH 2-2,1.

5.- Un proceso según la reivindicación 3, en el que el extracto de alérgenos nativos se acidifica hasta pH 2,0-4,0.

35 6.- Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una etapa de polimerización que comprende:

- h) poner en contacto un extracto de alérgenos nativos o un extracto de alérgenos despigmentado con glutaraldehído o formaldehído,
- i) someter el extracto a una etapa de eliminación de fracciones moleculares para eliminar las moléculas que tengan un tamaño molecular menor que 100 kDa, y

j) llevar a cabo la etapa i) hasta que el extracto de alérgenos tenga una conductividad menor que 210 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 3-5°C y/o está ausente de glutaraldehído, determinado mediante barrido de UV o de luz visible, para obtener un extracto de alérgenos polimerizado o un extracto de alérgenos despigmentado polimerizado.

5 7.- Un extracto de alérgenos nativos que puede obtenerse según el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones.

8.- Un extracto de alérgenos despigmentado que puede obtenerse según el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4.

10 9.- Un extracto de alérgenos despigmentado polimerizado que puede obtenerse según el proceso de la reivindicación 5.

15 10.- Un extracto de alérgenos según las reivindicaciones 6-8, en el que el material de origen se selecciona de alérgenos alimentarios, cacahuetes, cacahuetes enteros, alérgenos aéreos (por ejemplo, polen (polen de árboles, polen de hierbas, polen de gramíneas, polen de cereales), ácaros del polvo, hongos, mohos), ácaros, alérgenos de gramíneas, árboles y hierbas, alérgenos epiteliales (pelo de animales, caspa de animales, por ejemplo pelo y caspa de gato, y pelo y caspa de perro), y alérgenos de insectos (por ejemplo, cucarachas, pulgas, veneno de abejas y de avispas).

20 11.- Un extracto de alérgenos según la reivindicación 9, en el que el material de origen se selecciona de alérgenos alimentarios (*Arachis hypogaea*), polen (*Alnus glutinosa*, *Betula alba*, *Corylus avellana*, *Cupressus arizonica*, *Olea europea*, *Platanus* sp., *Cynodon dactylon*, *Dactylis glomerata*, *Festuca elatior*, *Holcus lanatus*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense*, *Phragmites communis*, *Poa pratensis*, *Ambrosia elatior*, *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium album*, *Parietaria judaica*, *Plantago lanceolata*, *Salsola kali*, *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Secale cereale*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*), ácaros del polvo
25 (*Acarus siro*, *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides microceras*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Euroglyphus maynei*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*), hongos y mohos (*Alternaria alternate*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*), alérgenos epiteliales (pelo y caspa de gatos, pelo y caspa de perros, pelo y caspa de caballos, pelo y caspa humanos, pelo y caspa de conejos, y plumas), alérgenos de insecto (hormigas, pulgas, ácaros, cucarachas, veneno de abejas, y veneno de avispas).

30 12.- Un extracto de alérgenos de la reivindicación 9, en el que el material de origen se selecciona de cacahuetes (*Arachis hypogaea*), polen (*Olea europaea*, *Parietaria judaica*, *Phragmites communis* y *Phleum pratense*), ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*) y material epitelial (caspa de gato).

13.- Un extracto de alérgenos de la reivindicación 12, en el que el material de origen es *Arachis hypogaea*.

14.- Un extracto de alérgenos según una cualquiera de las reivindicaciones 6-13 para su uso en el tratamiento de la alergia.

15.- El uso de un extracto de alérgenos de la reivindicación 13 para el tratamiento de la alergia a los cacahuetes.

16.- Una composición farmacéutica que comprende un extracto de alérgenos según una cualquiera de las reivindicaciones 12-15.

5 17.- Una vacuna que comprende un extracto de alérgenos según una cualquiera de las reivindicaciones 6-13.

Lab Leti 4776

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0083792
		Bogotá D.C., Agosto 15 de 2012 - 14:50:14

RECIBIDO DE : GOMEZ PINZON ASEMARCAS S.A.					NI 830.121.797
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	513854574	14/08/2012	13.455.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
			<u>\$590.000.00</u>
		=====	

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-155801- -00000-0000
Fecha: 2012-09-11 15:19:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 45

44

Lab Leti 4776

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0083787
		Bogotá D.C., Agosto 15 de 2012 - 14:50:14

RECIBIDO DE : GOMEZ PINZON ASEMARCAS S.A.					NI 830.121.797
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	513854574	14/08/2012	13.455.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
7	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	210.000.00
				\$210.000.00
=====				

SON: **DOSCIENTOSDIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
-***-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-155801- -00000-0000
Fecha: 2012-09-11 15:19:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 45

15

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILID. ☐

Fecha: 2012-09-11 15:19:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 45

☐ Indicación que se solicita una patente.

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Descripción de la invención

☐ Dibujos de ser estos pertinentes

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐ Indicación que se solicita una PCT

☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐ Dibujos de ser estos pertinentes

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita Diseño industrial

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Representación gráfica de un esquema de trazado

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐