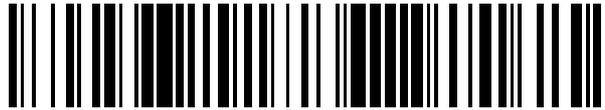


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 617**

21 Número de solicitud: 201231168

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.07.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.01.2014

71 Solicitantes:

**DIATER, LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO Y
APLICACIONES TERAPÉUTICAS, S.A. (100.0%)
Avda. Gregorio Peces Barba, 2, Parque
Tecnológico de Leganés
28918 Leganés (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**PALACIOS PELÁEZ, Ricardo ;
RODRÍGUEZ GIL, David;
ALCOVER DÍAZ, Javier y
PINEDA DE LA LOSA, Fernando**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **COMPOSICIÓN PARA LA ADMINISTRACIÓN INTRADÉRMICA DE ALERGOIDES**

57 Resumen:

Composición para la administración intradérmica de
alergoides.

Se describe una composición que comprende un
alergoide, obtenido mediante polimerización de un
extracto alergénico o de un alérgeno individualizado
con glutaraldehído, para su administración
intradérmica, útil para el tratamiento de alergias.

ES 2 439 617 A1

DESCRIPCIÓN

COMPOSICIÓN PARA LA ADMINISTRACIÓN INTRADÉRMICA DE ALERGOIDES

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se relaciona con una composición que comprende alergoides obtenidos a partir de extractos alérgicos o alérgenos individualizados, para la administración intradérmica de dichos alergoides, útil para el tratamiento de alergias.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La alergia, en términos generales, es una reacción o respuesta anormal y exagerada del sistema inmune frente a sustancias conocidas como alérgenos, que conduce a la síntesis de anticuerpos o inmunoglobulinas de la clase IgE (IgE) en los individuos alérgicos y que en población sana, sin embargo, son perfectamente tolerados. Los alérgenos pueden encontrarse en alimentos, polen de plantas, ácaros del polvo, epitelios de animales, venenos de insectos, etc. La IUIS ("International Union of Immunologic Societies") ha establecido un sistema de nomenclatura para identificar los alérgenos presentes en una fuente de sensibilización consistente en emplear las 3 primeras letras del género de la fuente sensibilizante, seguidas por la primera letra de la especie y de un número arábigo que indica el orden del descubrimiento del alérgeno; a modo ilustrativo, en el caso del ácaro del polvo doméstico *Dermatophagoides pteronyssinus*, su primer alérgeno descubierto se denominó Derp1.

15

20

La patofisiología de la reacción alérgica mediada por la IgE se pone de manifiesto en los pacientes alérgicos tras la unión del alérgeno con las IgE específicas del mismo, fijadas en la superficie de los mastocitos o células cebadas. Las señales ocasionadas tras la fijación conducen a la liberación de los mediadores almacenados en el mastocito. Los mediadores pueden encontrarse preformados (histamina, triptasa, etc.) o bien pueden responder a síntesis ulterior por acción de la ciclooxigenasa (prostaglandina D2 y tromboxano A2) y de la lipooxigenasa (leucotrienos B4, C4, D4, E4), así como a la secreción de citoquinas. La histamina es el mediador responsable de la mayor parte de los fenómenos asociados con la fase inmediata de la reacción alérgica.

25

30

El diagnóstico etiológico (fuente sensibilizante) en los pacientes alérgicos se suele realizar mediante las denominadas pruebas cutáneas, que pueden ser clasificadas en percutáneas ("Prick test") o intradérmicas, con el extracto alérgico obtenido a partir de la fuente de sensibilización. Cuando el extracto alérgico es introducido en la piel se produce una reacción local inflamatoria en forma de pápula y eritema a los pocos minutos que da lugar a la conocida como respuesta de tipo inmediato. La medida de las áreas o diámetros de las respuestas en forma de pápula o eritema permite establecer el diagnóstico etiológico, así como la sensibilidad del paciente a la fuente de sensibilización o extracto alérgico empleado. La prueba cutánea intradérmica está documentada ampliamente como de una mayor sensibilidad que el Prick test y, en general, emplea diluciones entre 1:100 y 1:1.000 de las concentraciones que se emplean en las pruebas por Prick ("Prick test"). Otra alternativa del diagnóstico etiológico, que muestra una elevada correlación con la prueba cutánea, es la cuantificación de la IgE específica del extracto alérgico presente en el suero de los pacientes mediante técnicas de ELISA.

35

40

El tratamiento de las enfermedades alérgicas parte inicialmente de establecer el adecuado diagnóstico etiológico que permite identificar la fuente de sensibilización alérgica, e incluye una serie de medidas preventivas y terapéuticas. Evitar o minimizar la exposición a la fuente de sensibilización alérgica constituye el primer paso del tratamiento. El segundo paso incluye el tratamiento farmacológico de los pacientes alérgicos y comprende (i) un tratamiento preventivo conducente a evitar o minimizar la liberación de los mediadores del mastocito, que con independencia de la patología, puede emplear diversos medicamentos, tales como las cromonas o las teofilinas, (ii) un tratamiento sintomático para evitar los efectos biológicos causados por los mediadores una vez que se han liberado, para el que se emplean los antihistamínicos o los antileucotrienos, y (iii) un tratamiento de fondo que permita resolver los fenómenos inflamatorios que se producen en el órgano diana (rinitis, asma), para el que se emplean, por ejemplo, los corticoides.

45

50

El tratamiento etiológico (específico) de la alergia incluye la Inmunoterapia. La Inmunoterapia con extractos alérgicos obtenidos a partir de la fuente de sensibilización es un tratamiento alternativo y concomitante con el farmacológico, reconocido por la OMS (Organización Mundial de la Salud) como el único tratamiento con capacidad de revertir a la normalidad la respuesta inmune alterada en el paciente alérgico. En términos generales, comprende la administración de dosis crecientes (volumen y concentración) del extracto alérgico hasta alcanzar una dosis máxima de mantenimiento. La inmunoterapia específica convencional con extractos alérgicos considera la administración del extracto por vía subcutánea exclusivamente desde hace más de 100 años, y, recientemente, otra nueva vía de administración, la vía sublingual, que sobre las mismas consideraciones de pauta, volumen y concentraciones 10 veces superiores a las empleadas en la vía de administración convencional subcutánea puede representar una alternativa.

55

60

65

El problema derivado de la práctica clínica de la inmunoterapia específica con extractos alérgicos, bien por vía subcutánea o sublingual, es común y referente a la seguridad en términos de su capacidad de inducir respuestas

alérgicas tras la administración de las dosis y de un modo especial en el escalado a la dosis de mantenimiento. Este hecho obliga a que el paciente se mantenga en observación durante, al menos, 20 minutos tras la administración de cada dosis. Por otro lado, el pautado hasta alcanzar la dosis máxima representa tediosos ensayos de búsqueda de dosis en función de la sensibilidad de los pacientes, además de que origina múltiples tipos de pautas de administración para minimizar el número de dosis a administrar hasta alcanzar la dosis de mantenimiento.

Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar un sistema alternativo a los existentes que permita subsanar la totalidad o parte de los problemas mencionados previamente; en concreto, sería conveniente aumentar la seguridad de un tratamiento por inmunoterapia en términos de ausencia de inducir respuestas alérgicas tras la administración de las dosis y en el escalado a la dosis de mantenimiento; asimismo, también sería conveniente reducir los tediosos ensayos de búsqueda de dosis hasta alcanzar la dosis máxima a administrar a los pacientes y minimizar el número de dosis a administrar hasta alcanzar la dosis de mantenimiento.

15 **COMPENDIO DE LA INVENCIÓN**

Los inventores han observado que los denominados alergoides obtenidos mediante polimerización de un extracto alérgico de, por ejemplo, *Phleum pratense*, con glutaraldehído muestran menor alergenicidad (capacidad de fijación de IgE alérgico específica), tal como se pone de manifiesto en las determinaciones de los valores Ag₅₀ y la liberación de histamina, pero mantienen la inmunogenicidad, tal como lo muestran los resultados derivados de los estudios de inmunización realizados en conejos, empleando las vías de administración subcutánea e intradérmica.

La invención contempla la administración por vía intradérmica de alergoides para tratar las enfermedades alérgicas mediante inmunoterapia. Una ventaja asociada con ello consiste en la eliminación de la dosis de escalado para alcanzar la dosis máxima tolerada por el paciente, dado que en el diseño del extracto alérgico polimerizado con glutaraldehído (alergoide), se considera una dosis de administración única, establecida en términos de seguridad como la dilución anterior de alergoide que negativiza la prueba cutánea intradérmica realizada con el mismo. La invención muestra que esta dosis es segura, dado que diagnóstico e inmunoterapia se realizan por la misma vía intradérmica y, por tanto, es posible fijar para cada alérgeno la dosis máxima tolerada en función de la sensibilidad del paciente, al ser ensayada sobre una población específicamente sensibilizada al alérgeno en cuestión. Además, la invención elimina la diversidad de los volúmenes a administrar en la inmunoterapia con extractos alérgicos, factor éste que origina posibilidades de inducción de reacciones por sobredosificación en la práctica clínica. Efectivamente, el volumen máximo a administrar siempre será de 0,1 mL, dado que esta acotación es inherente a la técnica de administración intradérmica.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica para administración intradérmica que comprende un alergoide y al menos un excipiente.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit farmacéutico que comprende dicha composición y los medios e instrucciones para administrar dicha composición.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de dicha composición farmacéutica para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la alergia humana y animal, en donde dicha composición farmacéutica está adaptada para su administración intradérmica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Título antisuero obtenido en conejo inmunizado con *Phleum pratense* nativo administrado por vía subcutánea.

Figura 2: Título antisuero obtenido en conejo inmunizado con *Phleum pratense* polimerizado administrado por vía subcutánea.

Figura 3: Título antisuero obtenido en conejo inmunizado con *Phleum pratense* nativo administrado por vía intradérmica.

Figura 4: Título antisuero obtenido en conejo inmunizado con *Phleum pratense* polimerizado administrado por vía intradérmica.

Figura 5: Liberación de histamina de un extracto alérgico de *Phleum pratense* nativo frente a un extracto alérgico de *Phleum pratense* polimerizado, utilizando sangre completa humana.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Composición de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica, en adelante "composición de la invención", para administración intradérmica que comprende un alérgoide y al menos un excipiente.

5 Una composición farmacéutica, tal como aquí se utiliza, es una composición que comprende al menos un agente biológicamente activo (bioactivo), que está adaptada para ser administrada a un humano u otro animal, y que es útil para el mantenimiento de un estado de salud, el control, el alivio o el tratamiento de los síntomas, condiciones o enfermedades de etiología alérgica.

10 La administración intradérmica es uno de los cuatro tipos de administración parenteral de agentes bioactivos. La administración parenteral es aquella que introduce el agente bioactivo directamente en el organismo y por tanto aporta dicho agente bioactivo directamente a la circulación sistémica. Los otros 3 tipos de administración parenteral son la vía subcutánea, la vía intramuscular y la vía intravenosa. Cada tipo de administración parenteral presenta sus particularidades [GUÍA PARA LA ADMINISTRACIÓN SEGURA DE MEDICAMENTOS VÍA
15 PARENTERAL. Mayo 2011. Coordinador: Ernesto Sánchez Gómez. Ed. Hospital "Juan Ramón Jiménez". Huelva. ISBN: 978-84-694-1318-0].

De acuerdo con la presente invención, por "administración intradérmica" se entiende un modo de administración en el que se inyecta una composición farmacéutica que comprende una cantidad reducida de un agente bioactivo mediante una aguja de calibre fino de modo que se forme una pápula intracutánea o intradérmica. Generalmente, las zonas de administración incluyen la cara anterior o ventral de ambos antebrazos, la parte anterior y superior del tórax por debajo de las clavículas (excepto en mujeres), y la parte superior de la espalda en la zona inferior escapular. Esta vía de administración solo admite pequeños volúmenes, normalmente entre 0,05 y 0,1 mL. Dado que la dermis está poco irrigada, el efecto del agente bioactivo se prolonga durante bastante tiempo. Esta vía es
20 la vía habitualmente utilizada para las pruebas cutáneas diagnósticas de intradermorreacción en alergia. En general, para la administración intradérmica se utilizan agujas con una longitud de 9,5-16 mm, un calibre de 25-26 G (0,5 mm) y un bisel corto.

Tal como se utiliza aquí, la expresión "para la administración intradérmica" se entiende que significa lo mismo que adecuada o adaptada para la administración intradérmica; es decir, en otras palabras, la composición de la invención se compone y se procesa de tal manera que es adecuada para la administración intradérmica por
30 criterios generalmente aceptados.

Un excipiente es cualquier sustancia, o mezcla de sustancias, farmacológicamente inerte, farmacéuticamente aceptable, útil para la formulación de una composición farmacéutica. Para su empleo en la presente invención el excipiente o excipientes debe(n) ser excipiente(s) útil(es) para la producción de composiciones farmacéuticas para administración intradérmica.

Ejemplos de excipientes potencialmente útiles incluyen disolventes, co-disolventes, diluyentes, tensioactivos, co-tensioactivos, espesantes, estabilizantes, antioxidantes, solubilizantes, agentes de ajuste del pH, colorantes y similares. En una realización particular, la composición de la invención contiene un diluyente, solución salina fisiológica (NaCl 0,9%) y, opcionalmente, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. En otra realización particular, dicho excipiente comprende manitol, por ejemplo, manitol a 10 mg/mL.

Un alérgoide es un compuesto con una reactividad alérgica muy reducida en comparación con el alérgeno nativo del que deriva, manteniendo al mismo tiempo un alto grado de otras propiedades deseables, características del alérgeno nativo, incluyendo la capacidad de inducir síntesis de anticuerpos de tipo IgG neutralizante de alérgenos, protegiendo a los individuos atópicos de los síntomas alérgicos post-exposición y restaurando la inmunidad alterada en el paciente alérgico [Hans J Maasch & David G. Marsh, Standardized extract modified allergens allergoids. Clin Rev Allergy. (1987). 5: 89-106]. En otras palabras, un alérgoide mantiene la inmunogenicidad del alérgeno nativo pero con una alergenidad inferior a la del alérgeno nativo, por lo que, puede ser utilizado en inmunoterapia (IT) debido a que puede ser administrado a elevadas dosis, con bajo riesgo de reacciones sistémicas.

Los alérgoides pueden obtenerse por métodos conocidos por los técnicos en la materia a partir de los alérgenos correspondientes; aunque prácticamente cualquier método puede ser utilizado para la obtención de un alérgoide. En una realización particular, dicho método se basa en la polimerización con glutaraldehído [Patterson R. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. (1981). Vol. 68(2):85-90; Maasch & Marsh, citado *supra*]. Otros métodos emplean la modificación con formaldehído [Bousquet J. et al. J Allergy Clin Immunol. (1989). 84:546-56], glutaraldehído [Grammer LC et al. J Allergy Clin Immunol. (1985). 76:397-401] y alginato [Corrado OJ et al. Allergy. (1989). 44:108-15].

Un alérgeno es cualquier compuesto, sustancia o material capaz de evocar una reacción alérgica e inducir la síntesis de IgE. En general, se considera que los alérgenos constituyen una sub-categoría de los antígenos, los cuales son compuestos, sustancias o materiales capaces de evocar una respuesta inmune. Los alérgenos pueden ser naturales o nativos, sintéticos, recombinantes, etc. En términos de su naturaleza química o
65

bioquímica, los alérgenos suelen ser proteínas (o péptidos) nativas o recombinantes, variantes o fragmentos de dichas proteínas (o péptidos) nativas o recombinantes, proteínas de fusión, compuestos sintéticos (alérgenos químicos), compuestos sintéticos que imitan alérgenos, etc. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de alérgenos incluyen, entre otros, alérgenos del polen de plantas, alérgenos de derivados epidérmicos de animales, alérgenos de ácaros del polvo, alérgenos de hongos, alérgenos de alimentos, alérgenos de venenos de animales y alérgenos procedentes de látex (*Hevea brasiliensis*).

En una realización particular, el alérgico presente en la composición de la invención es un alérgico obtenido a partir de un extracto alérgico o de un alérgico individualizado del polen de plantas, un alérgico obtenido a partir de un extracto alérgico o de un alérgico individualizado de un derivado epidérmico de animales, un alérgico obtenido a partir de un extracto alérgico o de un alérgico individualizado de un ácaro del polvo, un alérgico obtenido a partir de un extracto alérgico o de un alérgico individualizado de un hongo, un alérgico obtenido a partir de un extracto alérgico o de un alérgico individualizado de un alimento, un alérgico obtenido a partir de un extracto alérgico o de un alérgico individualizado del veneno de un animal, o un alérgico obtenido a partir de un extracto alérgico o de un alérgico individualizado procedente de látex (*Hevea brasiliensis*).

En una realización particular, el alérgico presente en la composición de la invención es un alérgico obtenido a partir de un extracto alérgico o de un alérgico individualizado del polen de plantas, tales como, por ejemplo, gramíneas, hierbas, árboles, malezas, etc.; ejemplos ilustrativos, no limitativos de tales plantas incluyen *Agropyron*, *Acacia dealbata*, *Ainus glutinosa*, *Amaranthus spp*, *Ambrosia spp*, *Artemisia vulgaris*, *Avena sativa*, *Betula verrucosa*, *Chenopodium album*, *Chrysanthemum spp*, *Citrus sinensis*, *Corylus avellana*, *Cryptomeria japonicum*, *Cupressus arizonica*, *Cupressus sempervirens*, *Cynodon dactylon*, *Dactylis glomerata*, *Eucalyptus spp*, *Fagus silvatica*, *Festuca pratensis*, *Fraxinus excelsior*, *Helianthus spp*, *Hevea brasiliensis*, *Holcus lanatus*, *Hordeum vulgare*, *Jasminum spp*, *Juniperus oxycedrus*, *Ligustrum vulgare*, *Lolium perenne*, *Mercurialis annua*, *Morus alba*, *Olea europaea*, *Oryza sativa*, *Parietaria judaica*, *Phleum pratense*, *Phoenix canariensis*, *Phoenix dactylifera*, *Phragmites communis*, *Phytolacca dioica*, *Pinus silvestris*, *Plantago lanceolata*, *Platanus acerifolia*, *Poa pratensis*, *Populus deltoides*, *Quercus ilex*, *Quercus robur*, *Quercus virginiana*, *Robinia pseudoacacia*, *Rumex acetosella*, *Salix nigra*, *Salsola kali*, *Sambucus nigra*, *Schinopsis sp.*, *Secale cereale*, *Taraxacum officinale*, *Trisetum paniceum*, *Triticum aestivum*, *Ulmus campestris*, *Urtica dioica*, *Zea mays*, etc. En una realización concreta, dicha planta es *Phleum pratense*. En una realización más concreta el alérgico presente en la composición de la invención es un extracto alérgico de *Phleum pratense* que comprende Phlp5, o un extracto alérgico de *Phleum pratense* que comprende Phlp1, o un extracto alérgico de *Phleum pratense* que comprende Phlp2, o un extracto alérgico de *Phleum pratense* que comprende Phlp6, o un extracto alérgico de *Phleum pratense* que comprende Phlp11, o un extracto alérgico de *Phleum pratense* que comprende Phlp12, etc.

En una realización particular, el alérgico presente en la composición de la invención es un alérgico obtenido a partir de un extracto alérgico o de un alérgico individualizado de un derivado epidérmico de un animal; ejemplos ilustrativos, no limitativos de tales animales incluyen *Canis familiaris*, *Equus caballus*, *Felis domesticus*, etc.

En una realización particular, el alérgico presente en la composición de la invención es un alérgico obtenido a partir de un extracto alérgico o de un alérgico individualizado de un ácaro del polvo; ejemplos ilustrativos, no limitativos de tales ácaros incluyen *Acarus siro*, *Blomia kulagini*, *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Glycyphagus domesticus*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, etc.

En una realización particular, el alérgico presente en la composición de la invención es un alérgico obtenido a partir de un extracto alérgico o de un alérgico individualizado de un hongo; ejemplos ilustrativos, no limitativos de tales hongos incluyen *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, *Rhizopus nigricans*, etc.

En una realización particular, el alérgico presente en la composición de la invención es un alérgico obtenido a partir de un extracto alérgico o de un alérgico individualizado de un alimento; ejemplos ilustrativos, no limitativos de tales alimentos incluyen pescados, leche y derivados de la leche (lactoalbúmina, lactoglobulina, caseína, etc.), huevos y derivados del huevo (ovoalbúmina, ovomucoide, etc.), frutos secos (avellana, cacahuete, nuez, etc.), etc.

En una realización particular, el alérgico presente en la composición de la invención es un alérgico obtenido a partir de un extracto alérgico o de un alérgico individualizado de un veneno de un animal; ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichos animales incluyen tanto insectos, en cualquier estadio de su desarrollo, por ejemplo, orugas, etc., como no insectos, por ejemplo, medusas, serpientes, etc. En una realización concreta, dicho insecto es un himenóptero, por ejemplo, un insecto perteneciente al género *Apis* (abejas), un insecto perteneciente a la familia *Vespidae* (avispas), por ejemplo, del género *Polistes*, *Vespula*, etc., un insecto perteneciente a la familia *Formicidae* (hormigas), etc. En otra realización concreta dicho insecto es un díptero,

por ejemplo, un insecto perteneciente al género *Aedes*, *Culex*, *Culicoides*, etc. En otra realización concreta dicho insecto pertenece al orden *Siphonaptera*, por ejemplo, un insecto perteneciente al género *Ctenocephalides*. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos insectos incluyen *Aedes aegypti*, *Apis mellifera*, *Culex pipiens*, *Culicoides spp.*, *Ctenocephalides sp.*, *Formica fusca*, *Polistes sp.*, *Vespula sp.*, etc.

5 En una realización concreta, el alérgico presente en la composición de la invención es un alérgico seleccionado del grupo formado por alérgicos obtenidos a partir de un extracto alérgico o de un alérgico individualizado de un alérgico de *Agropyron*, *Acacia dealbata*, *Alnus glutinosa*, *Amaranthus spp.*, *Ambrosia spp.*, *Artemisia vulgaris*, *Avena sativa*, *Betula verrucosa*, *Chenopodium album*, *Chrysanthemum spp.*, *Citrus sinensis*,
 10 *Corylus avellana*, *Cryptomeria japonicum*, *Cupressus arizonica*, *Cupressus sempervirens*, *Cynodon dactylon*, *Dactylis glomerata*, *Eucalyptus spp.*, *Fagus sylvatica*, *Festuca pratensis*, *Fraxinus excelsior*, *Helianthus spp.*, *Hevea brasiliensis*, *Holcus lanatus*, *Hordeum vulgare*, *Jasminum spp.*, *Juniperus oxycedrus*, *Ligustrum vulgare*, *Lolium perenne*, *Mercurialis annua*, *Morus alba*, *Olea europaea*, *Oryza sativa*, *Parietaria judaica*, *Phleum pratense*, *Phoenix canariensis*, *Phoenix dactylifera*, *Phragmites communis*, *Phytolacca dioica*, *Pinus silvestris*,
 15 *Plantago lanceolata*, *Platanus acerifolia*, *Poa pratensis*, *Populus deltoides*, *Quercus ilex*, *Quercus robur*, *Quercus virginiana*, *Robinia pseudoacacia*, *Rumex acetosella*, *Salix nigra*, *Salsola kali*, *Sambucus nigra*, *Schinopsis sp.*, *Secale cereale*, *Taraxacum officinale*, *Trisetum paniceum*, *Triticum aestivum*, *Ulmus campestris*, *Urtica dioica*, *Zea mays*, *Canis familiaris*, *Equus caballus*, *Felis domesticus*, *Acarus siro*, *Blomia kulagini*, *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Glycyphagus domesticus*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, *Rhizopus nigricans*, pescados, leche y derivados de la leche (e.g., lactoalbúmina, lactoglobulina, caseína, etc.), huevos y derivados del huevo (e.g., ovoalbúmina, ovomucoide, etc.), frutos secos (e.g., avellana, cacahuete, nuez, etc.), venenos de medusas, serpientes, orugas, etc., o de venenos de himenópteros, por ejemplo, veneno de un insecto perteneciente al género *Apis*, veneno de un insecto perteneciente a la familia *Vespidae*, por ejemplo, un insecto del género *Polistes*, *Vespula*, etc., un insecto perteneciente a la familia *Formicidae*, etc.; veneno de un díptero, por ejemplo, un insecto perteneciente al género *Aedes*, *Culex*, *Culicoides*, etc.; veneno de un insecto perteneciente al orden *Siphonaptera*, por ejemplo, un insecto perteneciente al género *Ctenocephalides*, etc., por ejemplo, veneno de *Aedes aegypti*, *Apis mellifera*, *Culex pipiens*, *Culicoides spp.*, *Ctenocephalides sp.*, *Formica fusca*, *Polistes sp.*, *Vespula sp.*, etc., alérgicos procedentes del látex (*Hevea brasiliensis*), o combinaciones de los mismos.

En una realización particular, la composición de la invención comprende un único alérgico. En otra realización particular, la composición de la invención comprende dos o más alérgicos diferentes.

35 En una realización particular, la composición de la invención se caracteriza, además, porque está libre de un adyuvante inmunológico. En otra realización particular, la composición de la invención comprende uno o más adyuvantes.

40 Un "adyuvante" inmunológico, tal como aquí se utiliza, es una sustancia (o combinación de sustancias) utilizada en combinación con un alérgico (caso particular de un antígeno) específico que produce una respuesta inmune más robusta que el alérgico solo. Esta definición incluye una amplia gama de materiales. Algunos adyuvantes inmunológicos que se utilizan en muchos productos comercializados como vacunas incluyen sales minerales, en particular, fosfato de calcio, fosfato de aluminio, etc., o bases, por ejemplo, hidróxido de aluminio, etc. Adyuvantes inmunoestimulantes más eficaces incluyen oligodesoxinucleótidos inmunoestimulantes, ARN
 45 inmunoestimulantes, proteínas, incluyendo anticuerpos o pequeñas entidades químicas sintéticas que se unen a los receptores de sustancias inmunoestimulantes o co-estimuladoras, tales como, por ejemplo, receptores Toll-like. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de adyuvantes incluyen saponinas (como QS21), citoquinas (tales como la IL-2, IL-12), MDP derivados, LPS, MLP y sus derivados, GM-CSF, lipopéptidos e imiquimod.

50 La cantidad de alérgico en la composición de la invención se seleccionará en base a la naturaleza del alérgico presente en la misma; no obstante, en una realización particular, el contenido de alérgico presente en una unidad de dosis de 0,1 mL está comprendido entre aproximadamente 0,001 µg y aproximadamente 1.000 µg por dosis.

55 No obstante, debe tenerse en cuenta que la potencia inmunológica puede variar sustancialmente entre los distintos alérgicos mencionados anteriormente. Por tanto, puede ser útil utilizar parámetros alternativos para definir la potencia del alérgico incorporada en la composición de la invención. A modo ilustrativo, pueden utilizarse unidades bioequivalentes que relacionen la cantidad de proteína del extracto alérgico polimerizado con la ausencia de reacción cutánea.

60 En una realización particular, la composición de la invención se formula como una formulación líquida para administración intradérmica. En otra realización particular, la composición de la invención se formula como una formulación de polvo liofilizado que tras su recomposición conduce a una formulación líquida para administración intradérmica, para lo cual se elegirán los excipientes más apropiados para ello. Tal como aquí se utiliza, la formulación líquida obtenida tras recomponer el liofilizado, se caracteriza por el estado líquido de por lo menos la fase continua de la composición. La formulación líquida puede contener una sola fase o, alternativamente, puede
 65

incorporar uno o más fases adicionales que se dispersan en la fase continua y que pueden (o no) ser líquidas. Por ejemplo, una suspensión es un líquido que comprende una fase dispersa sólida, y una emulsión es un líquido que comprende una fase dispersada líquido. Excipientes y técnicas de formulación para composiciones líquidas para administración sobre la piel son generalmente conocidos por el experto. Información adicional sobre los excipientes apropiados para la formulación de formulaciones líquidas para administración intradérmica puede encontrarse, por ejemplo, en el "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid; y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000). Entre los excipientes preferidos para la composición de la invención se encuentra el suero salino fisiológico y el manitol. Opcionalmente, se pueden incorporar uno o más co-disolventes. Dependiendo de su naturaleza química, el alergoide puede disolverse, dispersarse coloidalmente o ser suspendido (disperso) en la fase líquida. En una realización particular, el alergoide se incorpora en un estado disuelto o dispersado coloidalmente.

Excipientes adicionales opcionales para la formulación líquida de la composición de la invención incluyen agentes gelificantes, tensioactivos, co-tensioactivos, estabilizadores, agentes reguladores del pH tales como ácidos, bases y sales tampón, conservantes, azúcares, etc., farmacéuticamente aceptables.

En una realización particular, el alergoide presente en la composición de la invención está liofilizado.

En otra realización particular, el alergoide presente en la composición de la invención está disuelto en un excipiente adecuado para su administración por vía intradérmica. En una realización concreta, dicho excipiente es suero salino fisiológico y manitol a 10 mg/mL.

En otra realización particular, la composición de la invención se presenta en forma de monodosis. En una realización concreta, la composición de la invención se presenta en forma de monodosis en la que el contenido de alergoide por unidad de dosis de 0,1 mL está comprendido entre aproximadamente 0,001 µg y aproximadamente 1.000 µg por dosis.

Método de tratamiento

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de tratamiento de un sujeto que sufre de una alergia a un alérgeno que comprende administrar una composición de la invención, en donde dicha composición de la invención es una composición farmacéutica para administración intradérmica que comprende un alergoide y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las características de la composición de la invención ya han sido discutidas previamente y se incorporan aquí por referencia.

El término "sujeto" tal como aquí se utiliza incluye a cualquier animal, preferentemente, un mamífero, incluido el hombre.

El régimen de administración de la composición de la invención se elegirá en función de la gravedad de la enfermedad o condición del sujeto particular, la sensibilidad inmunológica del sujeto al alergoide(s) comprendido en la composición de la invención, etc.

Típicamente, la administración de la composición de la invención se realiza con una frecuencia que varía desde aproximadamente una vez al día a una vez al año, preferentemente, una vez cada dos días, tres veces por semana, dos veces por semana, una vez a la semana, y una vez cada dos semanas.

En general, el tratamiento tendrá una duración de un período de tiempo comprendido entre aproximadamente una semana y aproximadamente 6 meses, o más preferiblemente de aproximadamente 2 semanas a alrededor de 5 meses, por ejemplo alrededor de 1 mes, alrededor de 6 semanas, aproximadamente 2 meses, o alrededor de 3 meses, y en cualquier caso, cuando se demuestra la tolerancia al alérgeno del sujeto.

El tratamiento puede comenzar antes, después o durante el tiempo de exposición al alérgeno causante de los síntomas en el medio ambiente, o bien antes, después o durante la temporada de polen para los sujetos con alergia al polen, o antes, después o durante la temporada de otoño a invierno para los sujetos con alergia a los ácaros del polvo y a los hongos. En cualquier caso, el alergoide puede ser administrado pre-estacionalmente, co-estacionalmente o post-estacionalmente en relación de la prevalencia del alérgeno o alérgenos en cuestión.

Durante un periodo de tratamiento, la dosis administrada o la potencia del alergoide por episodio puede permanecer sustancialmente constante, o puede ser ajustada.

Para sostener los efectos positivos de una terapia que se ha llevado a cabo durante un período de varias semanas o meses, puede ser útil continuar con una disminución de la frecuencia de administración, tal como

aproximadamente una vez cada mes, aproximadamente una vez cada 2 meses, aproximadamente una vez cada 3 meses, aproximadamente una vez cada 6 meses o una vez al año.

Uso

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de una composición de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la alergia humana o animal, en donde dicha composición de la invención es una composición farmacéutica para administración intradérmica que comprende un alergoide y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 Las características de la composición de la invención ya han sido discutidas previamente y se incorporan aquí por referencia.

Kit

15 En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit farmacéutico que comprende una composición de la invención y los medios e instrucciones para administrar dicha composición, en donde dicha composición de la invención es una composición farmacéutica para administración intradérmica que comprende un alergoide y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 Las características de la composición de la invención ya han sido discutidas previamente y se incorporan aquí por referencia.

25 En una realización particular, dicho alergoide está liofilizado y el kit comprende un vial con un excipiente adecuado para la administración, tras reconstitución, del alergoide por vía intradérmica.

Las instrucciones también pueden comprender cualquiera de las características opcionales o preferidas del método de tratamiento descrito anteriormente.

30 Ventajosamente, el kit de la invención puede comprender no sólo la composición de la invención y las instrucciones, sino también los medios para su administración, en particular, las agujas adecuadas para la administración intradérmica de la composición de la invención, los viales necesarios y otros dispositivos que faciliten la administración intradérmica del alergoide.

35 La composición farmacéutica y el kit pueden ser, de acuerdo con la invención, utilizados para el tratamiento de sujetos que sufren de una alergia. Tal como aquí se utiliza, el término “alergia” incluye cualquier forma de hipersensibilidad de tipo I latente o manifiesto, también conocida como hipersensibilidad inmediata o mediada por IgE. Este tipo de hipersensibilidad se caracteriza por la activación de los mastocitos y basófilos a través de la inmunoglobulina E (IgE), que conduce a la liberación de los mediadores contenidos en sus gránulos, originando una respuesta inflamatoria sistémica que puede causar una amplia gama de síntomas leves, moderadas y graves que van desde un goteo de la nariz (rinorrea), al potencialmente mortal choque anafiláctico. La diferencia fundamental entre una reacción de hipersensibilidad de tipo I contra un alérgeno y una respuesta humoral normalizada frente al mismo es que, en la hipersensibilidad, las células plasmáticas predominantemente secretan inmunoglobulinas de tipo E en lugar de tipo G, que son secretadas contra los antígenos reconocidos.

45 Las enfermedades alérgicas también pueden ser clasificadas de acuerdo a los síntomas predominantes que están asociados. Por ejemplo, la invención comprende el tratamiento de sujetos que sufren de rinitis alérgica estacional (fiebre del heno), rinitis alérgica perenne, conjuntivitis alérgica, y combinaciones de los mismos, tales como, por ejemplo, rinosinusitis, asma, dermatitis atópica, urticaria, así como de cualquier alergia alimentaria, alergia al polvo de la casa, o una alergia a cualquiera de los alérgenos aquí mencionados.

El alcance de la invención se extiende tan solo al tratamiento de cualquier sujeto alérgico, sin restricciones.

55 En una realización preferida adicional, el método de la invención se utiliza para el tratamiento curativo de los sujetos que tienen una enfermedad alérgica manifiesta o un mayor riesgo de desarrollar una alergia o una patología alérgica de mayor gravedad, como está demostrado en el tránsito de la rinitis al asma.

La administración intradérmica de alergoides de acuerdo con la presente invención presenta numerosas ventajas ya que:

- 60 1. La aplicación intradérmica de alergoides permite obtener un efecto inmunógeno, tal como se pone de manifiesto mediante los estudios de inmunización realizados en conejos, pero con una alergenicidad del extracto alérgico reducida, tal como se pone de manifiesto mediante la determinación de los valores de Ag₅₀ y la liberación de histamina.
- 65 2. La disminución de la alergenicidad y del volumen a administrar, máximo 0,1 mL del extracto alérgico polimerizado y la conjunción de la vía de administración intradérmica, asociada al empleo de los alergoides, resalta el incremento de la seguridad de los preparados vacunales.

3. Permite eliminar la dosis de escalado para alcanzar la dosis máxima tolerada por el paciente, dado que en el diseño del alérgoide, se considera una dosis de administración única, establecida en términos de seguridad como la dilución anterior de alérgoide que negativiza la prueba cutánea intradérmica realizada con el mismo. La invención pone de manifiesto que esta dosis es segura, dado que diagnóstico e inmunoterapia se realizan por la misma vía intradérmica y por tanto es posible fijar para cada alérgeno la dosis máxima tolerada en función de la sensibilidad del paciente, al ser ensayada sobre una población específicamente sensibilizada al alérgeno en cuestión. Por tanto, la aplicación intradérmica permite establecer la dosis máxima eficaz y segura de un alérgoide, considerando la diferencia de sensibilidad entre sujetos (pacientes) y permitiendo ajustarla en base a un escalado de dosis hasta poder llegar a fijarla.
4. El concepto dosis óptima – dosis tolerada de alérgoides puede ser ensayado mediante pruebas cutáneas intradérmicas (ID) en una población sensibilizada al alérgeno mediante titulación a punto final y adecuadamente establecido puesto que la administración de la inmunoterapia (IT) emplea la misma vía diagnóstica para cada alérgeno.
5. Permite eliminar la diversidad de volúmenes a administrar en la inmunoterapia con extractos alérgicos, factor este que origina posibilidades de inducción de reacciones por sobredosificación en la práctica clínica (el volumen máximo a administrar siempre será de 0,1 mL, dado que esta acotación es inherente a la técnica de administración intradérmica).
6. Permite mantener la estabilidad y actividad del alérgoide al contemplar la posibilidad de ser diseñado en forma de polvo liofilizado con un crioprotector (e.g., manitol) y minimizar al máximo posible las posibles variaciones y pérdidas de su actividad biológica.

La presente invención, por primera vez demuestra la posibilidad de empleo de la vía intradérmica con alérgoides con fines terapéuticos. Habiendo sido históricamente y hasta la fecha práctica habitual el empleo de pruebas intradérmicas con alérgeno con fines diagnóstico (práctica habitual en Estados Unidos para establecer el diagnóstico etiológico).

La invención al considerar la vía de administración intradérmica de alérgoides representa una innovación no ensayada con anterioridad. La vía intradérmica ha sido ensayada y ampliamente demostrada su seguridad y eficacia con otros agentes inmunizantes (e.g., vacunas BCG, rabia, y, recientemente, la vacuna de la gripe). Esta vía de administración permite mejorar el procesamiento y reconocimiento de los antígenos dada la amplia distribución de células presentadoras de antígenos y por tanto su papel modulador de la respuesta inmunitaria.

La invención se ilustra adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos que no deben entenderse que limitan el alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Protocolo general de obtención de un extracto alérgico de polen

1.1 Obtención de un extracto alérgico de polen

La materia prima de pólenes es adquirida a un productor, tal como, por ejemplo, Allergon, Pharmalerga, etc., y, una vez recibida, es almacenada en la cámara fría hasta su procesado.

Si el polen se compra sin desengrasar, se debe proceder en primer lugar a su desengrasado por métodos convencionales, por ejemplo, mediante éter dietílico.

El polen se pesa en un recipiente estéril, se anota la cantidad de Materia Prima a extraer y se vierte a un vaso de precipitado bajo flujo laminar en una campana. La extracción hidrosoluble se realiza por maceración con tampón fosfato salino (PBS), mediante agitación magnética suave en agitador (aproximadamente a 1000 rpm) y a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C (cámara fría) durante 4 horas. El pH del extracto se mantiene en un valor de 7,5-8,5 con HCl o NaOH 1N, mediante medida en pHmetro.

Tras este paso, el extracto se somete a centrifugación a 5.000 rpm durante 30 minutos en una centrífuga y el sobrenadante se pasa a través de filtros clarificantes Whatman nº1 y Millipore AP2009000, midiéndose la conductividad con un conductímetro y guardando el sobrenadante resultante a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C.

El sedimento de la centrifugación se resuspende en PBS y se extrae con éter dietílico en un dispositivo SOXHLET mediante arrastre con éter dietílico evaporado y condensando en continuo durante 17 horas aproximadamente, manteniendo el flujo de agua refrigerante y controlando que la temperatura producida en el interior de los matraces no supere los 47°C. Este segundo extracto se somete a centrifugación a 5.000 rpm durante 30 minutos, descartándose el sedimento y juntando el sobrenadante con el obtenido en la anterior centrifugación, para continuar con su procesado. El sobrenadante obtenido se pasa a través de filtros clarificantes Whatman nº1 y Millipore AP2009000 y se mide su conductividad.

Posteriormente, se procede a mezclar ambos sobrenadantes filtrados y el extracto crudo se somete a una concentración por ultrafiltración tangencial en un equipo apropiado, por ejemplo, un sistema Cogent M1 (Millipore) equipado con un sistema de membranas empaquetadas (Cassette) con un límite de exclusión molecular de 5.000 Daltons (Da) [3000 Da en caso de procesar *Parietaria judaica*, *Artemisia vulgaris* y *Ambrosia trifida*, por ejemplo]. La diálisis se realiza por adición de 5 volúmenes de agua de calidad inyectable respecto al volumen concentrado. Cuando el extracto crudo obtenido de pólenes sea inferior a 600 mL de volumen final, se realiza la diálisis en labscale por adición de 5 volúmenes de agua WFI respecto al volumen obtenido empleando cartuchos de 5 kDa. Se mide la conductividad con conductivímetro al final de proceso, que debe ser inferior a 1,5 mS.

A continuación, el extracto es alicuotado y taponado en viales a razón de 30 mL/vial que, posteriormente, se congelan a -20°C (en caso de no ser liofilizados inmediatamente).

Para la liofilización, los viales se introducen en una cámara estéril en un liofilizador, por ejemplo, un liofilizador Telstar (PB-079). Finalizado el ciclo de liofilización, se procede a pesar el contenido de 1 vial para calcular el rendimiento, expresado en gramos de producto intermedio liofilizado por 100 gramos de materia prima. Finalmente, se entrega el producto obtenido y la documentación a Control de Calidad para su caracterización.

Siguiendo el protocolo indicado previamente, se ha obtenido un extracto alergénico nativo de *Phleum pratense* que se utilizó en los Ejemplos 4 y 5.

1.2 Caracterización del extracto alergénico nativo

1.2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Tampones y disoluciones

Acrilamida/Bisacrilamida, 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (Stacking); Disolución del dodecilsulfato sódico (SDS) al 10 %; Persulfato amónico 30 mg/mL; Temed: (Tetramethylethylenediamin reagent); Tampón de muestra (Sample buffer) 5X; Tampón de electrodos pH 8,3; Patrón de pesos moleculares; Fijador de plata; Acelerador de plata; Tinción de plata (Agua pura, Solución Silver Complex Solution, Solución Reduction Moderator Solution y Solución Image Development Reagent). Disolución de Coomassie (Tinción); Solución desteñidora de Coomassie.

Método

Los geles empleados se preparan con las siguientes proporciones de acrilamida: gel separador 12,5% y gel apilador 4%.

Para los alérgenos (diferentes a los neumoaérgenos) así como para los alergoides obtenidos por polimerización del alérgeno con glutaraldehído, se cargan 15 µg proteína/calle para la tinción de Coomassie (se cargan 10 µL de una muestra diluida a 1,5 mg proteína/mL) y 0,5 µg proteína/calle para la tinción de plata (se cargan 10 µL de una muestra diluida a 0,05 mg proteína/mL).

Una vez diluidas las muestras a la concentración de proteína necesaria para el tipo de tinción que se vaya a emplear, se procede a preparar las muestras; para ello, se toman en un eppendorf 80 µL de la dilución obtenida anteriormente y 20 µL de tampón de muestra (Sample buffer) 5X (relación 4:1) y la mezcla se calienta durante 8 minutos aproximadamente a 100°C. Tras su enfriamiento (temperatura ambiente), los restos insolubles se eliminan por centrifugación durante 5 minutos a 14.000 rpm.

Condiciones electroforéticas.

Se dispensan:

- una calle con 7 µL de patrón de pesos moleculares para Tinción de Coomassie, o una calle con 4 µL de patrón de pesos moleculares para Tinción de Plata;
- una calle con 10 µL de IHR (patrón de referencia interno, del inglés "in house reference") para el caso de extractos alergénicos estandarizados (en el caso de los extractos alergénicos no estandarizados esta calle se obviará); y
- 3 calles con 10 µL de extracto alergénico a analizar.

Cuando el frente de migración se encuentre cerca del final del gel, aproximadamente a los 45 minutos de haberse iniciado la electroforesis, se desconecta la fuente y se saca el gel. Posteriormente se procede a la tinción y destinción del gel dependiendo de la concentración de proteína que tenga cada muestra:

- Tinción de Coomassie: Se coloca el gel en una placa de 10 cm x 10 cm y se añade la solución de Coomassie. Tinción: 1 hora a 60°C, 2 h a 37°C, o 12 h a temperatura ambiente.

- Solución destefnidora de Coomassie: Se añade la solución destefnidora de Coomassie, hasta que el fondo del gel quede casi transparente y se visualicen bien las bandas del patrón y las muestras. Una vez que esté totalmente decolorado, desechar la solución y añadir agua para que se encuentre en las condiciones óptimas de hidratación.

5

La determinación de los pesos moleculares se lleva a cabo por el método de Weber y Osborn [Weber, K. & Osborn, M. J. Biol. Chem. 244:4406-4412 (1969)], construyendo una recta de calibrado, representando la movilidad (en mm) manifestada por una serie de proteínas frente al logaritmo de su peso molecular (conocido). La movilidad se mide desde el comienzo del gel separador hasta el punto medio de la banda. Una vez demostrada la correlación entre ambas variables ($r > 0,90$), la determinación de pesos moleculares se lleva a cabo con un programa informático (Diversity database) basado en el método de Weber y Osborn. Los pesos moleculares de las proteínas utilizadas como patrones son: 250, 150, 100 y 75 Daltons.

10

1.2.2 Determinación de proteína

15

Reactivos y preparación

La lectura se realiza a 595 nm en un espectrofotómetro (por ejemplo, un espectrofotómetro BECKMAN COULTER DU 640), con cubeta de cuarzo visible. Para la realización del ensayo se utiliza el reactivo concentrado de BIO-RAD (Protein assay. Ref: 500-0006) para la determinación de contenido en proteínas, que se prepara en una proporción de 0,2 mL de reactivo de BIO-RAD por mL de reactivo (e.g., 20 mL reactivo de BIO-RAD + 80 mL agua pura). Se realiza una recta patrón partiendo de un stock de seroalbúmina bovina (BSA) a 1 mg/mL. Para ello, se preparan diversas concentraciones: 2; 4; 6; 8 y 10 $\mu\text{g/mL}$. Esta recta se realiza por triplicado en un eppendorf de 1,5 mL, con un volumen final de 1 mL a completar con el reactivo. Se toma como blanco 1 mL del reactivo ya diluido, que se leerá previamente en el espectrofotómetro.

20

25

Preparación de las muestras

Se inicia preparando alícuotas de 900 μL de reactivo preparado en eppendorf de 1.5 mL hasta un total de 6 por muestra.

30

Límites de aceptación

El valor absoluto obtenido relativo a la cantidad de proteína que contiene la muestra, deberá ser un $\pm 50\text{-}150\%$ respecto al lote IHR (según monografía Phr. Eur EMEA/BWP/304831/2007).

35

1.2.3 ELISA inhibición con suero humano

Se pesan los productos a analizar (aproximadamente 5-6 mg) en balanza. Las muestras pesadas se reconstituyen a 10 mg/mL con agua pura, se agita y se centrifuga durante 5 minutos a 14.000 rpm.

40

Se prepara una solución del extracto referencia (IHR) a analizar en tampón carbonato/bicarbonato 50 mM pH 9,6 a una concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ (6 mL de tampón carbonato/bicarbonato y 150 μL del IHR 10 mg/mL a analizar).

45

Se pipetea 50 μL de la solución del IHR (250 $\mu\text{g/mL}$) en los 96 pocillos de la placa de ELISA y se cubre la placa para evitar la evaporación. Se incuba a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C en nevera durante toda la noche.

50

La placa de ELISA se lava con PBS-Tween® 20 0,05%, pH 7,4, en un aparato lavador Biotek Elx50. A continuación, se bloquea añadiendo 200 μL /pocillo de BSA 1% en PBS-Tween® 20 al 0,05% y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora.

55

Preparación de las muestras a analizar. El IHR y las sustancias activas a analizar se preparan en un tubo eppendorf a 1 mg/mL con BSA 1% en PBS-Tween® 20 al 0,05%. A un nuevo tubo eppendorf se añaden 90 μL de las diluciones previamente preparadas de los productos a analizar más 90 μL del correspondiente suero humano.

60

Para la preparación del control positivo (BSA + suero humano) se añade a un tubo eppendorf 90 μL de BSA 1% en PBS-Tween® 20 al 0,05% (en lugar de la muestra) más 90 μL del correspondiente suero humano.

Para la preparación del control negativo (BSA) se añade a un tubo eppendorf 180 μL de BSA 1% en PBS-Tween® 20 al 0,05%.

65

Las muestras se incuban, junto con el control positivo y el control negativo, durante 1 hora a temperatura ambiente y en rotación. Transcurrido el tiempo de incubación de las muestras, se centrifugan durante 10

segundos a 14.000 rpm. Se pipetea 50 µL de las muestras en una placa de ELISA y se incuba la placa durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de bloqueo (2 horas), se lava la placa de ELISA con PBS-Tween® 20 0,05% pH 7,4. Se añade 50 µL/pocillo E-27-IgG Human IgE monoclonal antibody (Operón) a una dilución 1/1000 y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. La placa se lava con PBS-Tween® 20 0,05%, pH 7,4. A continuación, se añaden 50 µL/pocillo de anti-IgG murina (específico de cadena γ) a una dilución 1/500 y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan con PBS-Tween® 20 0,05% pH 7,4. Posteriormente, se añaden 50 µL/pocillo del conjugado estreptavidina-peroxidasa de *Streptomyces avidinii*, a dilución 1:250 (24 µL + 6 mL de BSA 1% en PBS-Tween® 20 al 0,05%) y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan con PBS-Tween® 20 0,05%, pH 7,4. Seguidamente, se añaden 50 µL/pocillo de H₂O₂ + ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) a una dilución 1:1000 (6 µL de H₂O₂ + 6mL ABTS). La lectura de la placa se realiza utilizando un lector de placas Multiskan Ascent V1.23.

Cálculos y presentación de resultados:

Porcentaje de unión: Tanto por ciento de IgE unida al fondo de la placa de ELISA, con respecto al 100% de unión, que corresponde a los pocillos control positivo, sin alérgeno (BSA + anticuerpo). Se obtiene multiplicando el valor promedio de absorbancia para cada concentración de alérgeno por 100, y dividiendo dicho producto entre el promedio de absorbancias del control positivo, según la ecuación:

$$\% \text{ unión} = \text{Abs media a cada conc} \times 100 / \text{Abs media Control} +$$

Porcentaje de inhibición: Porcentaje de anticuerpo no unido al fondo de la placa, que corresponde al total de anticuerpo menos el anticuerpo unido. Este valor se calcula como:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \% \text{ unión}$$

Coefficiente de correlación de la curva, que ha de ser mayor o igual a 0.980.

Log Ag50 y valor de Ag50: Se corresponden con la concentración media de alérgeno que produce una inhibición de la unión de IgE a la placa de un 50%.

El valor de LogAg50 se obtiene extrapolando los diferentes porcentajes de inhibición frente a los diferentes logaritmos de concentraciones de alérgeno, para calcular la concentración de alérgeno capaz de provocar un 50% de inhibición.

El valor de Ag50 se obtiene calculando el antilogaritmo del valor de LogAg50. Este valor sirve para comparar extractos alergénicos entre sí, así como una preparación, tratamiento o diagnóstico frente a su IHR.

Límites de aceptación: Los límites de aceptación de Ag50 de un ensayo concreto están comprendidos entre el 50%-150% sobre el valor de Ag50 del extracto de referencia (IHR). Estos límites vienen establecidos por la actual ICH.

1.2.4 ELISA *Phleum pratense* Phlp5

Se parte de una solución stock a 2 mg/mL en PBS de anticuerpo monoclonal anti-Phlp5 (1D11). En una placa de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos se pipetea 2.000 ng/pocillo de anticuerpo monoclonal 1D11, diluido en tampón carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9,6 (10 µL de anticuerpo monoclonal anti-Phlp5 en 10 mL de tampón carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9,6), y se deja incubar toda la noche a 4°C. Transcurrido ese tiempo los pocillos se lavan con PBS-Tween® 20 0,05% pH 7,4.

La placa se incuba durante 30 minutos con 100 µL de BSA al 1% en PBS-T (PBS con Tween® 20) al 0,05%.

Para la preparación de las muestras en las que se va a cuantificar el alérgeno mayor Phlp5 se parte de una solución madre a 10 mg/mL, tanto en el IHR como en las muestras problemas, que se lleva a una concentración de 1 mg/mL, usando como diluyente PBS-T 0,05%-BSA 1%. A partir de cada dilución de producto a analizar a 1 mg/mL se hacen diluciones 1/200, 1/400 y 1/800, en PBS-T 0,05%-BSA1%.

Paralelamente, se realiza una curva patrón. Para ello, se emplea el estándar "Universal allergen Standard rPhlp5a", que se encuentra a una concentración de 5.000 ng/mL (Indoor Biotechnologies). En el caso de la curva para el rPhlp5, tiene que abarcar un intervalo desde 250 a 0,98 ng/mL de rPhlp5a, a diluciones de 1:2 de una concentración a otra. Se pipetea directamente en los pocillos 10 µL de rPhlp5a (5.000 ng/mL) sobre 190 µL de BSA al 1% en PBS-T al 0,05% previamente añadidos al pocillo. Transcurridos 30 minutos de incubación en BSA 1%, los pocillos se lavan con PBS-Tween® 20 0,05% pH 7,4. El tratamiento de la placa, a la hora de añadir el estándar "Universal allergen Standard rPhlp5a" comprende, la adición, a cada pocillo, siguiendo el esquema establecido por el operario, de 100 µL de muestra de alérgeno diluido a diferentes diluciones, tanto del IHR como de la muestra problema, y se incuba la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo de incubación en PBS-T 0,05%-BSA 1%, los pocillos se lavan con PBS-Tween® 20 0,05% pH 7,4. La placa se incuba

5 durante 1 hora con 100 μ L de anticuerpo biotinilado Bo1 (Indoor Biotechnologies) previamente diluido a una dilución 1/1000 en PBS-T 0,05-BSA 1%, es decir, se toman 10 μ L de anticuerpo biotinilado Bo1 en 10 mL de PBS-T 0,05-BSA 1%. Este anticuerpo monoclonal se utiliza como anticuerpo secundario. Trascorrido ese tiempo de incubación en PBS-T 0,05-BSA 1%, los pocillos se lavan con PBS-T 0,05% pH 7,4. Posteriormente se añade el conjugado estreptavidina-peroxidasa de *Streptomyces avidinii*, a dilución 1:1000 en solución de bloqueo (10 μ L + 10 mL de PBS-T 0,05-BSA 1%), a razón de 100 μ L por pocillo, y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Trascorrido ese tiempo de incubación en BSA 1%, los pocillos se lavan con PBS-Tween® 20 0,05% pH 7,4.

10 Para el revelado de la placa se añaden 100 μ L por pocillo de H₂O₂ + ABTS dilución 1:1000 (10 μ L de H₂O₂ + 10 mL ABTS). La lectura de la placa se realiza en un lector de placas Multiskan Ascent V1.23 a 405 nm.

15 Los límites de aceptación de la concentración de alérgenos mayores de un ensayo concreto son del 50%-200% sobre el valor de alérgenos mayores del extracto de referencia (IHR). Estos límites vienen establecidos por Farmacopea Europea y Farmacopea FDA.

EJEMPLO 2

Obtención de un extracto alérgico de *Phleum pratense* polimerizado

20 En un eurotubo IVD estéril se pesan 0,4 g de un extracto alérgico (350 mg proteína/g de extracto) liofilizado de *Phleum pratense* que comprende Phlp1, Phlp2, Phlp5, Phlp6, Phlp11 y/o Phlp12 [Biopol (ALK)] y se diluyen en tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4 a una concentración de 1,4 mg/mL de proteína del extracto alérgico de *Phleum pratense* (100 mL). A continuación, se adicionan, gota a gota, 0,95 mL de glutaraldehído 0,025 M, con agitación suave (80 rpm) en un agitador magnético en cámara fría a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C, durante 24 horas, con lo que se obtiene un extracto alérgico polimerizado crudo.

30 Dicho extracto alérgico polimerizado crudo se somete a ultrafiltración (UF) tangencial (Labscale® Millipore) a través de un cartucho de 300 KDa de exclusión molecular (Pellicon® XL Filter Millipore), pasándose 10 volúmenes de agua calidad inyectable respecto al volumen de extracto alérgico de *Phleum pratense* polimerizado crudo, en concreto 1.000 mL. El extracto alérgico de *Phleum pratense* polimerizado resultante contiene las proteínas polimerizadas con un peso molecular superior a 100.000 Da. La concentración de proteína presente en el extracto alérgico nativo de partida puede determinarse tal como se indica en el Ejemplo 1.

EJEMPLO 3

Obtención de los viales para tratamiento con extracto alérgico de *Phleum pratense* polimerizado

35 El extracto alérgico de *Phleum pratense* polimerizado con glutaraldehído, sometido a UF tangencial, obtenido en el Ejemplo 2, una vez dializado en un sistema de ultrafiltración tangencial labscale, se somete a filtración y se ajusta la concentración del extracto alérgico polimerizado según se describe a continuación.

40 Para llevar a cabo la filtración esterilizante de dicho extracto alérgico polimerizado, sometido a UF tangencial, se procede, con carácter previo, a activar el filtro esterilizante de 0,22 micrómetros (μ m) de polietersulfona. Se añaden 2 mL de manitol (5 mg/mL) al filtro y se deja incubar durante 5 minutos; a continuación, se abre la válvula del sistema de vacío hasta que se filtre todo el tampón (manitol en agua de inyección a 5 mg/mL) y, posteriormente, se cierra la válvula del sistema de vacío. Este proceso se repite una vez más. A continuación, se deja secar el filtro durante 30 minutos (15 minutos con vacío abierto y otros 15 minutos con vacío cerrado), se añaden 2,5 mL de la muestra a filtrar (extracto alérgico polimerizado, sometido a UF tangencial) y se abre la llave el vacío hasta que se seque el filtro durante 10 minutos, repitiéndose este paso 2 veces más. Finalmente, el filtro se deja secar durante 10 minutos.

50 Una vez activado el filtro esterilizante de 0,22 μ m de polietersulfona, el extracto alérgico polimerizado, sometido a UF tangencial, se somete a filtración esterilizante. Para ello, antes de proceder a filtrar dicho extracto alérgico polimerizado sometido a UF tangencial, se toma una muestra de 2 mL para realizar la analítica de la carga biológica del producto. A continuación, se abre el vacío y se añade el extracto alérgico polimerizado sometido a UF tangencial para que se filtre y, una vez filtrado, se pasa a una cámara estéril a través del sistema SAS [del inglés "Security Air System"]. Una alícuota de 10 mL de dicho extracto alérgico polimerizado sometido a UF tangencial y a filtración esterilizante se analiza mediante el ensayo de Bradford [Bradford, M.M. (1976), Anal. Biochem. 72: 248-254] para determinar la cantidad de proteína presente en dicho extracto, y, posteriormente, producir el envasado a granel. El extracto alérgico polimerizado sometido a UF tangencial y a filtración esterilizante se diluye en diluyente crioprotector (manitol a 10 mg/mL) para obtener una concentración final de 0,01 mg/mL de proteína en el extracto alérgico polimerizado sometido a UF tangencial y a filtración esterilizante. Tras el ajuste a concentración de tratamiento de proteína el producto a granel obtenido es dosificado en viales de 2 mL de capacidad a razón de 1 mL/vial. Los viales, una vez dosificados, son liofilizados introduciéndolos en un liofilizador Telstar y realizando un ciclo completo de liofilización, terminando con el cierre al vacío de los viales.

65

EJEMPLO 4**Estudio de la inmunogenicidad a extractos alérgicos de *Phleum pratense* nativos y polimerizados**

5 Se realizó este ensayo en colaboración con el Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Farmacia (Universidad del País Vasco), para estudiar la inmunogenicidad a extractos alérgicos de *Phleum pratense* nativos y polimerizados.

10 Para ello, se obtuvieron antisueros frente a extracto alérgico de *Phleum pratense* nativo (*nPh.p*) o polimerizado (*pPh.p*) mediante inoculación subcutánea (SC) o intradérmica (ID) de dichos extractos en 10 conejos albinos neozelandeses de aproximadamente 2,5 kg de peso inicial, según la Tabla 1.

Tabla 1

<i>Phleum pratense</i>			
Vía subcutánea		Vía intradérmica	
Nativo	Polimerizado	Nativo	Polimerizado
2 conejos	2 conejos	2 conejos	2 conejos
Controles negativos (manitol)			
Vía subcutánea		Vía intradérmica	
1 conejo		1 conejo	

15 Inoculación

- Inoculación subcutánea (SC): los inóculos para la administración SC se prepararon diluyendo los viales conteniendo extracto alérgico de *Phleum pratense* nativo (10 µg en 1 mL de solución salina fisiológica fenolada al 0,2%, con hidróxido de aluminio como adyuvante), obtenido según el protocolo descrito en el Ejemplo 1, aplicado a la obtención de un extracto alérgico de *Phleum pratense* nativo, o extracto alérgico de *Phleum pratense* polimerizado con glutaraldehído y sometido a UF tangencial y filtración esterilizante ("alergoide") -de acuerdo a los Ejemplos 2 y 3 - (10 µg de alergoide y 10 mg de manitol en 1 mL de solución salina fisiológica fenolada al 0,2% y con adyuvante), inyectándose 0,5 mL por dosis.

- Inoculación intradérmica (ID): los inóculos para la administración ID de extracto alérgico de *Phleum pratense* nativo (10 µg) [obtenido según el protocolo descrito en el Ejemplo 1, aplicado a la obtención de un extracto alérgico de *Phleum pratense* nativo] o extracto alérgico de *Phleum pratense* polimerizado con glutaraldehído y sometido a UF tangencial y filtración esterilizante -de acuerdo a los Ejemplos 2 y 3 - (10 µg de alergoide y 10 mg de manitol, se reconstituyeron en 0,2 mL de solución salina fisiológica fenolada al 0,2%), inyectándose 0,1 mL por dosis.

Pauta de inmunización

Las inmunizaciones se llevaron a cabo durante 7 semanas tras las cuales se procedió a la sangría final del animal, previa titulación del suero, cuyos resultados se expresan en tablas y figuras a continuación.

Resultados

Los resultados obtenidos se especifican en las figuras que se muestran más adelante (Figuras 1-4). En general, la titulación de los antisueros (sueros hiperinmunes) obtenidos de los conejos mostró que los títulos obtenidos por ambas vías de administración (SC e ID) para los extractos alérgicos de polen de *Phleum pratense* nativos y polimerizados mostraban curvas de titulación similares y que la vía SC permitía obtener mayores títulos (máximos 1:1 - 1:2000) en menor tiempo (7 semanas) que la vía ID (máximos 1:1 - 1:1000 en 14 semanas), si bien los volúmenes de extracto alérgico de *Phleum pratense* administrados por dosis fueron de 0,5 mL para la vía SC y de 0,1 mL para la vía ID y que en la vía SC empleó hidróxido de aluminio como adyuvante.

EJEMPLO 5**Disminución de alérgenicidad (Valores Aq50 y liberación de histamina)****50 5.1 Valores Aq50**

En el Ejemplo 1 se describe un protocolo para obtener y caracterizar un extracto alérgico de polen de *Phleum pratense* del que se podría obtener un polimerizado como el descrito en los Ejemplos 2 y 3. Ensayos realizados con dicho extracto alérgico de *Phleum pratense* polimerizado con glutaraldehído según los Ejemplos 2 y 3 han puesto de manifiesto la presencia de todos los alérgenos y sus isoformas descritas mediante HPSEC (del inglés, "High-Performance Size Exclusion Chromatography"); asimismo, el proceso de polimerización muestra la

ausencia de bandas fijadoras de IgE en los rangos de peso molecular (PM) de los alérgenos descritos mediante técnicas de inmunofijación y de ELISA inhibición que muestran la disminución de la capacidad fijadora de IgE del extracto polimerizado vs. el extracto nativo en términos de potencia relativa estableciendo una pérdida de la misma para el extracto polimerizado superior al 97%.

5 La Tabla 2 refleja las pérdidas de potencia (valores Ag50) de los tres lotes validados de extracto alérgico de *Phleum pratense* polimerizado con glutaraldehído y sometido a UF tangencial y filtración esterilizante de acuerdo con los Ejemplos 2 y 3.

10 Definición de Ag50: Ag50 se define como la concentración de extracto alérgico que inhibe el 50% de la IgE específica presente en el suero, mediante técnicas de enzimoimmunoabsorción o radioimmunoabsorción. La técnica consiste en valorar la potencia de un extracto alérgico frente a un suero rico en IgE específica frente a un determinado alérgeno. La competencia de la IgE por el alérgeno fijado o en solución, es determinada en
15 función a la denominada Ag50 o concentración del alérgeno que inhibe el RAST o el ELISA al 50%. En términos generales, se puede definir que un extracto alérgico es tanto o más potente cuanto más inhibe el RAST o el ELISA, es decir, cuanto menor sea la concentración del extracto alérgico que induce el 50% de inhibición (valor Ag50).

Tabla 2

Polimerizados <i>Phleum</i> : Ag50	Nativos <i>Phleum</i> : Ag50	Pérdida potencia
Phl p 003p-11: 16,90 µg/mL	Phl p 002-10: 0,18 µg /mL	98,9%
Phl p 005p-11: 22,87 µg /mL	Phl p 002-10: 0,48 µg /mL	97,8%
Phl p 006p-11: 16,04 µg/mL	Phl p 002-10: 0,37 µg /mL	97,7%

20 Polimerizados *Phleum*: Extracto alérgico de *Phleum pratense* polimerizado con glutaraldehído y sometido a UF tangencial y filtración esterilizante (Ejemplos 2 y 3).

25 Nativos *Phleum*: Extracto alérgico de *Phleum pratense* nativo [este extracto puede obtenerse siguiendo el protocolo descrito en el Ejemplo 1].

A este respecto, en términos de potencia relativa (PR), sobre la base de la determinación de las Ag50 establecidas para el extracto alérgico de *Phleum pratense* nativo vs el extracto alérgico de *Phleum pratense* polimerizado con glutaraldehído y sometido a UF tangencial y filtración esterilizante se muestra a continuación:

30
$$PR = \text{Valor Ag50 } Phleum \text{ polimerizado} / \text{Valor Ag50 } Phleum \text{ nativo}$$

donde

- "Valor Ag50 *Phleum* polimerizado" se refiere al Ag50 establecido para el extracto alérgico de *Phleum pratense* polimerizado con glutaraldehído y sometido a UF tangencial y filtración esterilizante; y
- 35 - "Valor Ag50 *Phleum* nativo" se refiere al Ag50 establecido para el extracto alérgico de *Phleum pratense* nativo.

De este modo, el valor de PR obtenido sería de $18,0603/0,343 = 52,654$, que resulta de dividir el valor de Ag50 *Phleum* polimerizado (media de los 3 lotes) entre el valor de Ag50 *Phleum* nativo (media de los 3 lotes), según los valores indicados en la Tabla 2.

5.2 Liberación de histamina

45 El ensayo de liberación de histamina de basófilos de pacientes alérgicos utilizado es un método aprobado para evaluar la alergenidad de las preparaciones alérgicas [Siraganian RP: An automated continuous flow system for the extraction and fluorimetric analysis of histamine. Anal Biochem 57:388-394, 1974. Hans J Maasch y David G. Marsh. Standardized extract modified allergens allergoids. Clin rev allergy. 5: 89-106; 1987].

50 Se trata de un ensayo *in vitro* para detectar histamina liberada por métodos de fluoroenzimoimmunoensayo tras la activación alérgica de basófilos por el uso de un método de detección fluorométrica patentado (Reflab, Denmark). La prueba se realiza con los leucocitos de una muestra de sangre completa heparinizada lavada y estimulada con extracto alérgico de *Phleum pratense* nativo y con extracto alérgico de *Phleum pratense* polimerizado con glutaraldehído y sometido a UF tangencial y filtración esterilizante (Ejemplos 2 y 3), sobre placas de ELISA. La histamina liberada es absorbida por una matriz de fibra de vidrio en el interior del pocillo
55 (altamente afin y selectiva) y posteriormente detectada fluorométricamente.

Los resultados revelan la variación en el reconocimiento de ambos extractos y por tanto su alergenidad. La reducción de la liberación de la histamina a igualdad de concentración proteica inducida por parte del alergoide de *Phleum pratense* respecto del extracto alérgico no modificado (nativo) puede variar de paciente a paciente.
60 Presumiblemente debido a que cada paciente reconoce diferentes determinantes alérgicos [Hans J Maasch y David G. Marsh. Standardized extract modified allergens allergoids. Clin rev allergy. 5: 89-106; 1987].

Los inventores establecieron un valor superior a, al menos 50, preferentemente, 200 veces en la liberación de histamina para el extracto alergénico de *Phleum pratense* nativo frente al extracto de *Phleum pratense* polimerizado con glutaraldehído y sometido a UF tangencial y filtración esterilizante, dato en consonancia con lo referenciado bibliográficamente por otros autores [Hans J Maasch & David G. Marsh, Standardized extract modified allergens allergoids. Clin Rev Allergy. (1987). 5: 89-106] (Figura 5).

Sin embargo, el grado de reducción de la alergenicidad en este tipo de pruebas puede variar entre individuos.

EJEMPLO 6

Seguridad y eficacia del procedimiento

La prueba intradérmica (ID) es una vía habitual para el diagnóstico del agente etiológico involucrado en la enfermedad alérgica. Una vez establecido el diagnóstico etiológico (alérgeno causal), la modificación de su estructura con glutaraldehído permite mantener su carácter inmunogénico y disminuir su alergenicidad (capacidad de inducir síntomas clínicos). El Ejemplo 4 ilustra el mantenimiento de la inmunogenicidad en el extracto alergénico de *Phleum pratense* polimerizado con glutaraldehído y sometido a UF tangencial y filtración esterilizante, al demostrarse los títulos de los anticuerpos específicos obtenidos en los conejos y la disminución de la alergenicidad mediante las pruebas de inhibición de IgE, potencia alergénica y liberación de histamina alérgica mostrados en el Ejemplo 5.

El procedimiento de utilización de la vía ID con fines terapéuticos, puede ser establecido sobre estos conceptos en términos de seguridad, conociendo la concentración del extracto de alérgeno polimerizado que negativiza la prueba cutánea ID, en términos de área de pápula o de eritema habituales para la interpretación correcta en el diagnóstico ID.

En cuanto a la eficacia, la vía ID ha mostrado que es una vía habitualmente empleada en la inmunización frente a agentes infecciosos [e.g., gripe, rabia, hepatitis A y B, influenza, paperas, tétanos, fiebre amarilla, difteria-tétanos-pertusis (Informe PATH - Intradermal Delivery of Vaccines. A review of the literature and the potential for development for use in low- and middleincome countries. August 27, 2009)].

En el caso específico de la inmunización con alérgenos, el rango de concentración de tratamientos habituales en inmunoterapia (IT) con alérgenos, se corresponde con la concentración preconizada por la OMS y detallada en los Ejemplos 2 y 3, y ratificada en cuanto a inmunogenicidad en el Ejemplo 4 y conforme a los valores de alérgenos del informe de la OMS sobre uso de IT con alérgenos [Allergy 44 (53), 2-42, 1998].

Estos datos soportan que los conceptos de "dosis máxima tolerada" y "dosis óptima" pueden ser establecidos por la vía de administración ID, lo cual conlleva a que la administración de alérgenos en IT puede ser establecida de una forma segura, con ausencia de efectos secundarios, y, eficaz, pues el rango de concentraciones a emplear por cada alérgeno, puede ser establecido previamente mediante la prueba cutánea ID con el alérgeno.

La seguridad de la dosis óptima puede ser previamente establecida mediante un estudio de titulación a punto final con el extracto alergénico polimerizado (concentración anterior a la negativización de la prueba cutánea), en una población de pacientes sensibilizados frente al alérgeno causal, con el alérgeno polimerizado.

Por tanto, el concepto de dosis máxima eficaz queda establecido por la concentración del extracto polimerizado, conforme al informe de la OMS, al emplear un extracto polimerizado que permite incrementar las concentraciones y ajustar las dosis eficaces preconizadas por sus características demostradas en los Ejemplos 4 y 5 de disminución de su alergenicidad.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para administración intradérmica que comprende un alérgico y un excipiente, en donde dicho alérgico es un alérgico obtenido mediante polimerización de un alérgico con glutaraldehído.
- 5 2. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho alérgico es un alérgico obtenido a partir de un alérgico del polen de las plantas, un alérgico obtenido a partir de un alérgico de un derivado epidérmico de animales, un alérgico obtenido a partir de un alérgico de un ácaro del polvo, un alérgico obtenido a partir de un alérgico de un hongo, un alérgico obtenido a partir de un alérgico de un alimento, un alérgico obtenido a partir de un alérgico de un componente de un animal, o un alérgico obtenido a partir de un alérgico procedente de látex (*Hevea brasiliensis*).
- 10 3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que dicho alérgico es un alérgico seleccionado del grupo formado por alérgicos obtenidos a partir de un extracto alérgico o de un alérgico individualizado de un alérgico de *Agropyron*, *Acacia dealbata*, *Alnus glutinosa*, *Amaranthus spp*, *Ambrosia spp*, *Artemisia vulgaris*, *Avena sativa*, *Betula verrucosa*, *Chenopodium album*, *Chrysantemum spp*, *Citrus sinensis*, *Corylus avellana*, *Cryptomeria japonicum*, *Cupressus arizonica*, *Cupressus sempervirens*, *Cynodon dactylon*, *Dactylis glomerata*, *Eucalyptus spp*, *Fagus silvatica*, *Festuca pratensis*, *Fraxinus excelsior*, *Helianthus spp*, *Hevea brasiliensis*, *Holcus lanatus*, *Hordeum vulgare*, *Jasminum spp*, *Juniperus oxycedrus*, *Ligustrum vulgare*, *Lolium perenne*, *Mercurialis annua*, *Morus alba*, *Olea europaea*, *Oryza sativa*, *Parietaria judaica*, *Phleum pratense*, *Phoenix canariensis*, *Phoenix dactylifera*, *Phragmites communis*, *Phytolacca dioica*, *Pinus silvestris*, *Plantago lanceolata*, *Platanus acerifolia*, *Poa pratensis*, *Populus deltoides*, *Quercus ilex*, *Quercus robur*, *Quercus virginiana*, *Robinia pseudoacacia*, *Rumex acetosella*, *Salix nigra*, *Salsola kali*, *Sambucus nigra*, *Schinopsis sp.*, *Secale cereale*, *Taraxacum officinale*, *Trisetum paniceum*, *Triticum aestivum*, *Ulmus campestris*, *Urtica dioica*, *Zea mays*, *Canis familiaris*, *Equus caballus*, *Felis domesticus*, *Acarus siro*, *Blomia kulagini*, *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Glycyphagus domesticus*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, *Rhizopus nigricans*, pescado, leche y derivados de la leche, huevos y derivados del huevo, frutos secos, veneno de medusas, veneno de serpientes, veneno de orugas, veneno de un himenóptero, veneno de un díptero, veneno de un insecto perteneciente al orden *Siphonaptera*, látex (*Hevea brasiliensis*), o combinaciones de los mismos.
- 15 4. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho alérgico está liofilizado.
- 20 5. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho alérgico está disuelto en un excipiente adecuado para su administración por vía intradérmica.
- 25 6. Composición según la reivindicación 1 ó 5, en la que dicho excipiente comprende suero salino fisiológico y/o manitol.
- 30 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en forma de monodosis.
- 35 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el contenido de alérgico por unidad de dosis de 0,1 mL, está comprendido entre aproximadamente 0,001 µg y aproximadamente 1.000 µg por dosis.
- 40 9. Un kit farmacéutico que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y los medios e instrucciones para administrar dicha composición.
- 45 10. Kit según la reivindicación 9, en el que dicho alérgico está liofilizado y el kit comprende un vial con un excipiente adecuado para la administración, tras reconstitución, del alérgico por vía intradérmica.
- 50 11. Uso de un alérgico obtenido mediante polimerización de un alérgico con glutaraldehído en la elaboración de una composición farmacéutica para administración intradérmica para el tratamiento de la alergia frente a dicho alérgico.
- 55 60

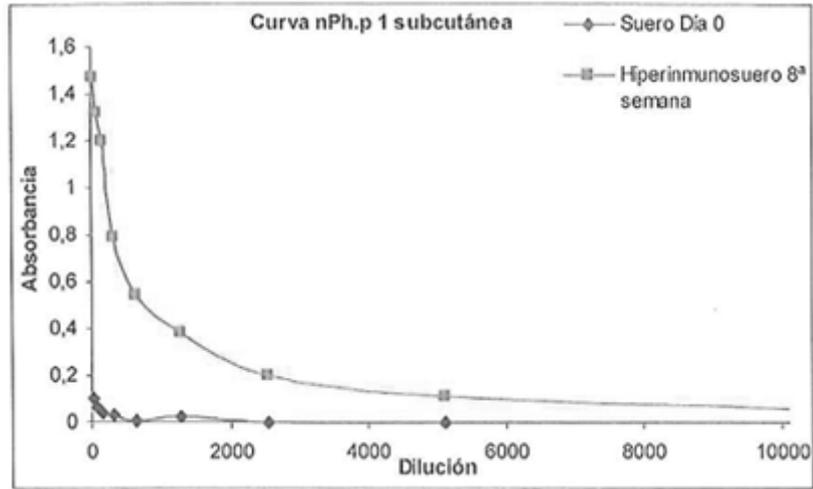


Fig. 1

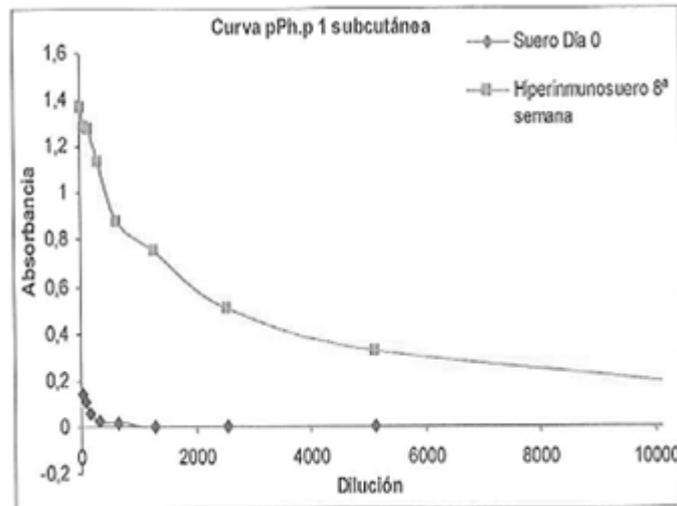


Fig. 2

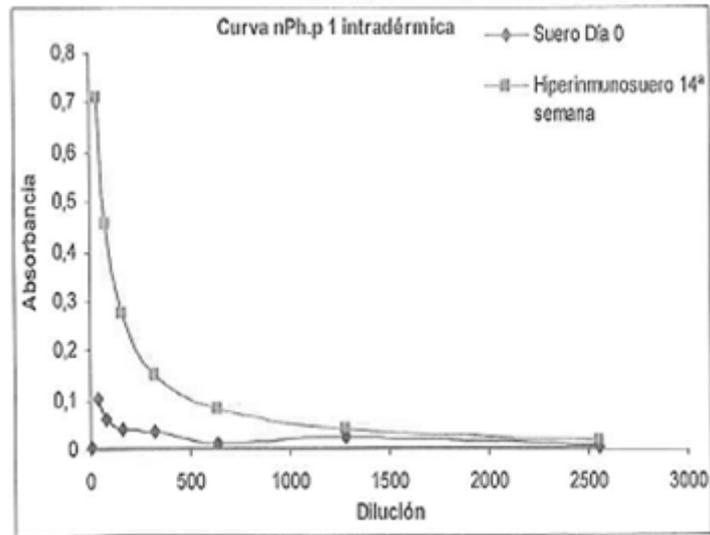


Fig. 3

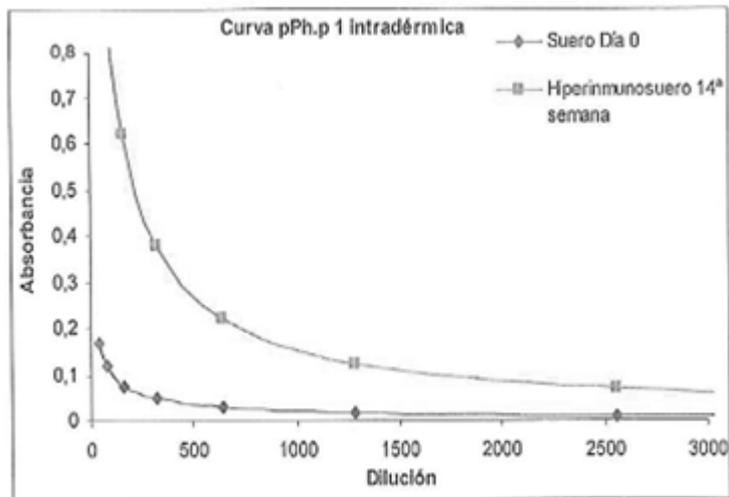


Fig. 4

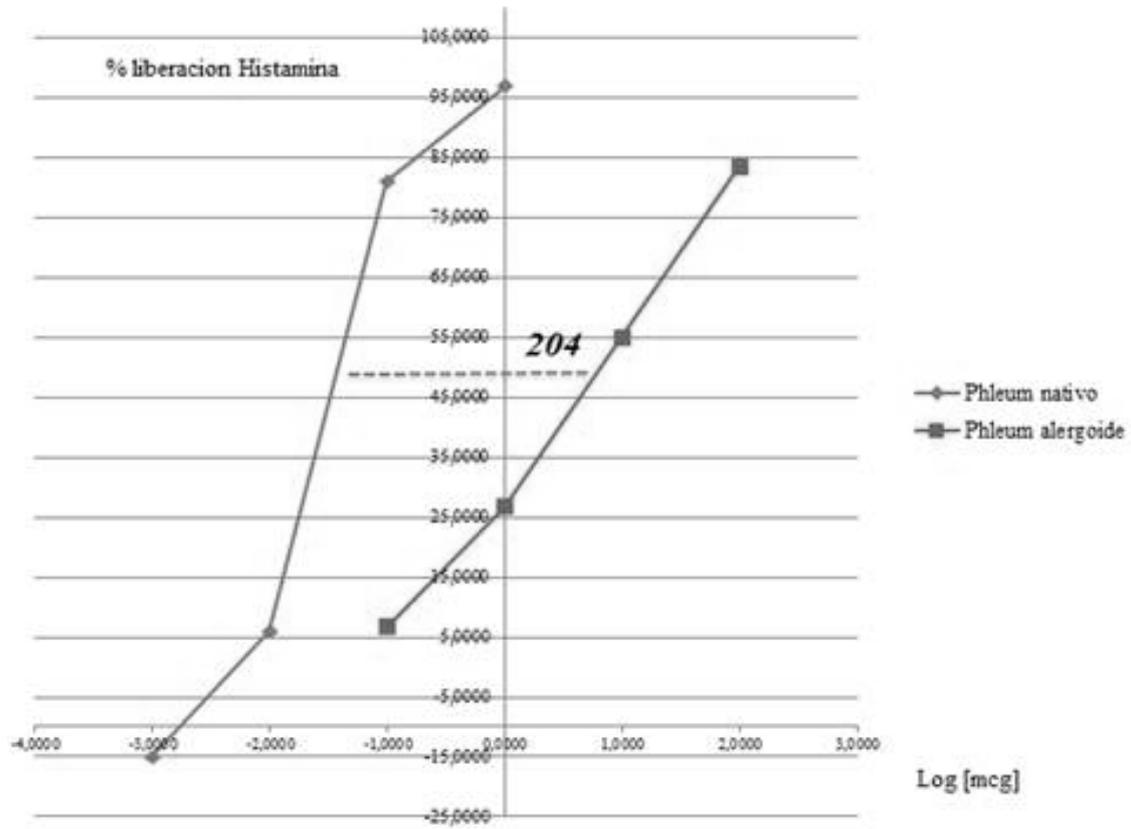


Fig. 5



- ②① N.º solicitud: 201231168
②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.07.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K39/00** (2006.01)
A61P37/08 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2011/177128 A1 (COIFMAN) 21.07.2011, (todo el documento)	1-11
X	US 4234569 A (MARSH) 18.11.1980, (todo el documento)	1-11
A	HEYDENREICH B. et al. Reduced <i>in vitro</i> T-cell responses induced by glutaraldehyde-modified allergen extracts are caused mainly by retarded internalization of dendritic cells. Immunology. 06.2012, Vol. 136, páginas 208–217 (todo el documento)	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.11.2013

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.11.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-11	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-11	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2011/177128 A1 (COIFMAN)	21.07.2011
D02	US 4234569 A (MARSH)	18.11.1980
D03	HEYDENREICH B. et al. Immunology. Vol. 136, páginas 208-217	06.2012

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención tiene por objeto una composición farmacéutica que comprende un alergoide obtenido por polimerización de un alérgeno con glutaraldehído, un kit farmacéutico que comprende tal composición y el uso de la composición en el tratamiento de la alergia (reivindicaciones 1 a 11).

D01 divulga una composición útil en el tratamiento de la alergia o enfermedades autoinmunes que comprende un alergoide, alérgeno modificado con glutaraldehído o con formaldehído, pudiendo administrarse, entre otras, por vía intradérmica. La composición puede estar contenida en un kit.

D02 anticipa composiciones que comprenden un alérgeno tratado con un aldehído, glutaraldehído o formaldehído, que presentan baja reactividad alérgica y pueden ser administradas por vía intradérmica, subcutánea o intramuscular.

D03 analiza las diferencias entre alérgenos intactos y alérgenos modificados con formaldehído o glutaraldehído (alergoides). En este caso, el alérgeno empleado procede de *Phleum pratense* o *Betula verrucosa*.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

Los documentos mencionados (D01, D02) anticipan composiciones que comprenden alergoides obtenido por polimerización de un alérgeno con glutaraldehído y su uso en el tratamiento de la alergia siendo administrados por vía intradérmica. Por consiguiente, las reivindicaciones 1 a 11 no se pueden considerar nuevas a la vista del estado de la técnica ni presentan actividad inventiva.