

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 058**

51 Int. Cl.:

A61K 39/35 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
C07K 14/37 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2011** **E 14176216 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018** **EP 2853271**

54 Título: **Extractos de alérgenos**

30 Prioridad:

12.02.2010 ES 201030199

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
16.07.2018

73 Titular/es:

LABORATORIOS LETI, S.L. (100.0%)
Calle del Sol, 5
28760 Tres Cantos, Madrid, ES

72 Inventor/es:

CARNES SANCHEZ, JERONIMO

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 676 058 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Extractos de alérgenos

Campo técnico

5 La invención se relaciona con un extracto de alérgenos purificado y composiciones farmacéuticas y vacunas para uso en el tratamiento de la alergia.

Antecedentes de la invención

10 La alergia es un trastorno de hipersensibilidad adquirido del sistema inmune y es disparado por exposición a sustancias inocuas ambientales conocidas como alérgenos. Un tipo de reacción de hipersensibilidad I es característico de las reacciones alérgicas y da como resultado la producción de cantidades excesivas de anticuerpos IgE los cuales a su vez activan los basófilos y mastocitos causando una reacción inflamatoria. Los efectos pueden ser sistémicos tales como vasodilatación, secreción mucosa, estimulación nerviosa y contracción de músculos lisos produciendo una reacción de anafilaxis, o confinados a un área particular del cuerpo, por ejemplo, el sistema respiratorio.

15 La alergia por alimentos es un problema de salud pública principal emergente que afecta alrededor del 6% de los niños en edad escolar y aproximadamente 4% de los adultos y puede tener severas consecuencias, incluyendo reacciones anafilácticas fatales ⁽¹⁾. La alergia puede por lo tanto tener impacto significativo en los aspectos psicosociales de calidad de vida extendiéndose más allá de los efectos clínicos inmediatos de la condición alérgica del paciente y de las actividades diarias de las familias ⁽²⁾. Actualmente el cuidado estándar para este tipo de alergia incluye evitar de manera estricta los alérgenos amenazantes y el tratamiento con epinefrina.

20 La alergia al cacahuete es una respuesta inmune de hipersensibilidad Tipo I (mediada por IgE) a sustancias de la dieta a partir de cacahuetes que causa una sobrerreacción del sistema inmune. The Asthma and Allergy Foundation of America estima que la alergia al cacahuete es la causa más común de muerte relacionada con alimentos en los Estados Unidos y ha estimado que afecta al 0.4-0.6% de la población. Las nueces de árbol tales como las pacanas, pistachos, piñones y nueces son también alérgenos de nuez comunes.

25 Hasta la fecha se han identificado once alérgenos (de Ara h 1 a Ara h 11) del cacahuete (*Arachis hypogaea*) y muchos de ellos han sido secuenciados y clonados. Con base en la International Union of Immunological Societies (IUIS) la nomenclatura de estos alérgenos incluye: Ara h 1, una Cupina (tipo Vicilina, globulina 7S) de 64 kDa; Ara h 2, una Conglutina (albúmina 2S) de 17 kDa; Ara h 3, una Cupina (tipo leguminosa, globulina 11S, glicinina) de 60 kDa; Ara h 4, una Cupina (tipo leguminosa, 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.

35 La alergia a los gatos es extremadamente común, presentándose en hasta el 25% de las personas con alergias. La alergia a los gatos es más común que la alergia a la caspa de perro, o cual puede estar relacionada con la potencia del pelo y la caspa de gato como alérgeno así como el hecho de que los gatos no son lavados en general. Los alérgenos de gatos se producen en grandes cantidades, particularmente por gatos machos no castrados puesto que el alérgeno está parcialmente bajo control hormonal. La caspa está constantemente en el aire, es pegajosa y se encuentra en lugares públicos, incluso donde no hay gatos. Esto es debido a que la caspa es transportada en las ropas de personas que tienen gatos, y luego desprendida en sitios públicos. Por lo tanto, el alérgeno de gato es un componente del polvo casero, incluso en hogares donde nunca ha vivido un gato. El tamaño de las partículas de la caspa de gatos es extremadamente pequeño, y es inhalado profundamente en los pulmones. La caspa de gato es por lo tanto una causa común de asma alérgica, y los propietarios de los gatos que son alérgicos a los gatos son más susceptibles al desarrollo de síntomas del asma ^(8,9).

40 Los alérgenos principales de gatos y perros pueden encontrarse en extractos de pelo/caspa y saliva y por lo tanto se consideran como alérgenos epiteliales. Se han identificado ocho alérgenos diferentes en gatos y muchos de ellos han sido secuenciados y clonados. Con base en el sitio de la red¹ de la IUIS 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 similar a la Laterina de 24 kDa. El principal alérgeno de gato, el Fel d 1, ha sido caracterizado extensamente por técnicas proteínicas e inmunoquímicas y ha sido expresado recientemente como un alérgeno recombinante. El Fel d 1 representa un dímero de aproximadamente 36 kDa, el cual está compuesto de dos subunidades⁽¹⁰⁾ de 17 kd.

- La alergia a la grama es una de las formas más comunes y prevalentes de alergia que afecta a las personas con historias de la misma durante ciertas estaciones. Está presente en el aire en los meses de la primavera tardía y verano temprano, la cual puede causar rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica y asma. El contacto directo con la grama, desde sentarse en la grama o podar el césped, puede producir picor en la piel, urticaria y dermatitis atópica. Una de las especies más representativas es la *Phleum pratense*, seleccionado como líder del grupo de las gramas. Se han identificado nueve alérgenos diferentes de las especies *Phleum pratense*. Con base en el sitio en la redⁱ de Allergen estos alérgenos incluyen: Phl p 1, una beta-expansina de 27 kDa; Phl p 2, un grupo II/III de grama 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 enlazante de 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 gramas. Se han descrito varias especies incluyendo *P. australis* o *P. communis*. El polen de la *Phragmites communis* ha sido reportado como alergénico en diferentes áreas. La polinización ocurre entre verano y otoño dependiendo de la latitud y la elevación.
- Se han identificado cinco proteínas diferentes con capacidad de enlazamiento a IgE identificadas en el gen de los *Phragmites*. Con base en el sitio de la redⁱ Allergome estos alérgenos incluyen: una expansina de 30 kDa; una proteína que pertenece al grupo 4 de las gramas de 60 kDa; una ribonucleasa de 35 kDa, un profilina de 14 kDa y finalmente una poligalacturonasa.
- La Ambrosía (*Ambrosia*) son semillas que crecen principalmente en Europa central. Una planta vive solamente una estación pero la planta produce hasta miles de granos de polen. La calidez con humedad y brisa después del ocaso ayudan a liberar los granos de polen. Hasta ahora se han relacionado tres diferentes especies con síntomas de alergia *Ambrosia artemisiifolia* (ambrosía corta), *A. psilostachya* (ambrosía occidental) y *A. trifida* (ambrosía gigante)). Se han identificado diez alérgenos diferentes en la ambrosía corta y muchos de ellos han sido secuenciados y clonados. En el caso de la *Ambrosia artemisiifolia*, se denominan Amb a 1 a Amb a 10 de acuerdo con la nomenclatura internacional para los alérgenos. Con base en el sitio en la redⁱ IUIS estos alérgenos incluyen: Amb a 1 una Pectato liasa de 38 kDa; Amb a 2 una Pectato liasa de 38 kDa; Amb 3 una Plastocianina de 11 kDa; Amb a 4 una proteína similar a la Defensina de 30 kDa; Amb a 5, de 5 kDa; Amb a 6, una proteína de transferencia de lípidos de 10 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 similar a la Polcalcina de 18 kDa. Para la *A. psilostachya* solamente el alérgeno Amb p 5 ha sido descrito con función biológica desconocida. Solamente un alérgeno de 5 kDa ha sido descrito también en la *A. trifida*.
- Las hierbas pueden ser divididas en grupos homólogos de acuerdo con sus extractos alergénicos clasificados. La ambrosía fue seleccionada como uno de los líderes de este grupo de plantas. Por esa razón, los resultados obtenidos con este extracto de polen pueden ser extrapolados a otras malezas¹.
- La alergia puede ser tratada mediante un número de métodos conocidos incluyendo inmunoterapia con alérgenos, inmunoterapia específica (SIT) o vacuna específica contra la alergia (SAV) en la forma de inmunoterapia para trastornos alérgicos en la cual el paciente es vacunado con dosis crecientemente más grandes de un extracto de alérgeno con el objetivo de inducir tolerancia inmunológica. La inmunoterapia con alérgenos modula la respuesta inmune al alérgeno más que mejorar los síntomas inducidos por una reacción alérgica, y puede bien sea reducir la necesidad de medicación, reducir la severidad de los síntomas o eliminar la hipersensibilidad todos juntos.
- Aunque hay una amplia evidencia de que la inmunoterapia con alérgenos es el único medio, aparte de evitar los alérgenos, para tratar causalmente los trastornos alérgicos mediados por IgE causados por alérgenos inhalados y por insectos picadores del grupo *Hymenoptera*, la inmunoterapia con extractos de alérgenos no se usa típicamente para el tratamiento de alergia por alimentos. Solamente dos estudios recientes han demostrado una eficacia clínica moderada utilizando inmunoterapia sublingual en individuos sensibilizados a la avellana y el melocotón respectivamente ^(3,4).
- En estudios previos se han hecho intentos de inducir una tolerancia a dosis bajas alimentando niños con trazas minúsculas de cacahuete que gradualmente se hacen más y más grandes con el fin de construir el sistema inmune ^(4,6). Aunque los ensayos clínicos tempranos indican que la alergia al cacahuete puede ser mejorada utilizando inmunoterapia ⁽⁷⁾, no hay un tratamiento actualmente confirmado para evitar o curar las reacciones alérgicas a los cacahuets, con la única opción efectiva para individuos atópicos de evitar alimentos que contengan o estén contaminados con cacahuets enteros, partículas de cacahuete y aceites de cacahuete y proveer un acceso rápido a epinefrina autoinyectable.
- Uno de los riesgos de la inmunoterapia es que la inyección de un alérgeno a un paciente sensibilizado puede producir una reacción alérgica severa o anafilaxis. Desde su primer uso al comienzo del siglo XX, se han hecho muchos esfuerzos para mejorar adicionalmente la seguridad y eficacia de la inmunoterapia con alérgenos. Una metodología es emplear vacunas de alérgenos con alergenicidad reducida pero con conservación de la inmunogenicidad.

Las US 5, 770,698 y EP 0662080 divulgan un proceso para remover sustancias y otro material de bajo peso molecular con el fin de purificar el extracto de alérgeno e incrementar el contenido de alérgeno/proteína final. El proceso consiste en interrumpir las fuerzas electrostáticas hidrófobas u otras físicas bajo condiciones tales que se deshadierán los compuestos no alergénicos de las proteínas alergénicamente activas. El proceso puede consistir de un tratamiento moderado con ácido disminuyendo el pH por debajo del pI de las proteínas alérgeno respectivas.

Una de las maneras diversas de reducir la alergenicidad consiste en modificar químicamente extractos de alérgeno naturales con aldehídos, principalmente formaldehído y glutaraldehído, para producir alergoides. Este tratamiento con aldehídos lleva a productos de reacción (principalmente polímeros) que han perdido parte de su alergenicidad (esto es, exhiben una reducción de sus epítomos de células B reactivas a IgE), reduciendo los efectos laterales alérgicos. Al mismo tiempo, la inmunogenicidad natural del alérgeno se retiene obedeciendo a epítomos de células T no cambiados. Esta ruta de modificación del alérgeno ha sido escogida por algunos fabricantes de vacunas contra alérgenos para desarrollar productos comercialmente disponibles con base en este principio. En general, hay una tendencia a purificar adicionalmente los extractos de alérgenos, seleccionando cuidadosamente los alérgenos más importantes y clínicamente relevantes.

Las EP 1834649 y EP 1834648 divulgan métodos para producir extractos de alérgenos. Sin embargo tales métodos no remueven suficientemente las proteínas de bajo peso molecular contaminantes.

Hay necesidad de mejorar adicionalmente la seguridad y eficacia de los medicamentos para uso en la inmunoterapia de trastornos alérgicos optimizando el proceso de purificación de los alérgenos para asegurar que los componentes de proteínas de bajo peso molecular contaminante, irritante y tóxico son eliminados.

Resumen de la invención

Los inventores han desarrollado una etapa intermedia previa a la polimerización para mejorar adicionalmente el proceso de polimerización y reducir la alergenicidad de ciertos extractos, tales como ácaros, polen, incluyendo gramas, hierbas y árboles, alérgenos epiteliales y alérgenos de alimentos, antes del tratamiento con glutaraldehído.

Es un objetivo de la presente invención proveer un proceso para la preparación de extractos que comprenden alérgenos, y composiciones farmacéuticas y vacunas para el tratamiento de la alergia. Es un objetivo adicional proveer un extracto de alérgeno óptimamente eficaz con capacidad de enlazamiento a IgE reducida pero que retiene su capacidad inmunogénica. LA invención es como se define en las reivindicaciones.

Se provee un proceso para producir un extracto de alérgeno que comprende:

a) poner en contacto un material fuente que comprende un alérgeno con un agente de extracción líquido para producir una mezcla que contiene lípidos disueltos en fase líquida y una fase sólida que consiste del residuo del material fuente que comprende alérgenos y proteínas.

b) someter la mezcla a una primera etapa de separación para aislar el residuo del material fuente,

c) poner en contacto el residuo de material fuente con un agente de extracción del alérgeno para producir una mezcla de alérgenos disuelta en fase líquida, y una fase sólida consistente de un residuo no alergénico.

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 crudo,

e) someter el extracto de alérgenos crudo a una etapa de remoción de la fracción de bajo peso molecular para remover moléculas que tienen un tamaño molecular de menos de 3.5 kDa, y

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

Una etapa de tratamiento adicional puede comprender

g) acidificar el extracto de alérgeno natural, removiendo moléculas que tienen un tamaño molecular de menos de 3.5 kDa, y neutralizar el pH para producir un extracto de alérgeno despigmentado.

El proceso puede comprender adicionalmente una etapa de polimerización, que comprende

h) poner en contacto un extracto de alérgeno natural o un extracto de alérgeno despigmentado con un aldehído, y

i) remover moléculas que tengan un tamaño molecular de menos de 100 kDa.

También se provee un extracto de alérgeno obtenible de acuerdo con el proceso antes mencionado.

De acuerdo con la invención, se provee un extracto de alérgeno purificado para uso como sustancia terapéutica activa en el tratamiento de la alergia.

5 Definiciones

“Alérgeno” puede ser definido como una molécula capaz de inducir una respuesta a IgE y/o una reacción alérgica tipo I.

El término “despigmentada” citado aquí puede ser definido como un extracto de alérgeno semipurificado obtenido a partir de un extracto natural por remoción de sustancias irrelevantes incluyendo los pigmentos adsorbidos que puede contener.

Descripción detallada de la invención

10 Los extractos alérgenos pueden ser derivados a partir de cualquier material fuente que comprenda alérgenos naturales conocidos por disparar una reacción inmune mediada por IgE en un individuo. Tales alérgenos pueden incluir alérgenos de alimentos (por ejemplo cacahuetes), alérgenos originados en el aire (por ejemplo polen de grama, árboles, hierbas y malezas, ácaros del polvo, hongos y mohos), alérgenos de insectos (por ejemplo cucarachas, moscas, veneno de abejas y avispas) y alérgenos epiteliales (pelo de animales, caspa de animales, por ejemplo caspa de gatos y perros).

15 Los alérgenos de polen de árboles, gramas y malezas se derivan del grupo de orden taxonómico de Fagales (por ejemplo, *Alnus* y *Betula*), lamiales (por ejemplo *Olea* y *Plantago*), poales (por ejemplo *Phleum pratense*), Asterales (por ejemplo *Ambrosia* y *Artemisia*), *Caryophyllales* (por ejemplo *Chenopodium* y *Salsola*), Rosales (por ejemplo *Parietaria*), Proteales (por ejemplo *Platanus*), etc. Los ácaros del polvo pertenecen al grupo de orden de Astigmata (por ejemplo, *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*). Los alérgenos originados en el aire derivados de mohos y hongos pertenecen al orden Pleosporales (por ejemplo *Alternaria*), Capnodiales (por ejemplo *Cladosporium*) etc.

20 El material fuente puede ser cualquier alérgeno, incluyendo alérgenos de alimentos, cacahuetes, cacahuetes enteros, alérgenos presentes en el aire (por ejemplo polen (polen de árboles, polen de malezas, polen de grama, polen de cereales), ácaros del polvo, hongos, mohos), ácaros, alérgenos de ácaros, gramas, árboles y malezas, 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, moscas, venenos de abeja y avispa).

Un alérgeno alimenticio preferido es los cacahuetes. Más preferiblemente el alérgeno de cacahuetes es *Arachis hypogaeal*.

30 Los alérgenos presentes en el aire pueden ser seleccionados de / o seleccionados de los grupos de: polen de árboles (*Alnus glutinosa*, *Betula alba*, *Corylus avellana*, *Cupressus arizonica*, *Olea europea*, *Platanus* sp), polen de grama (*Cynodon dactylon*, *Dactylis glomerata*, *Festuca elatior*, *Holcus lanatus*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense*, *Phragmites communis*, *Poa pratensis*), polen de malezas (*Ambrosia elatior*, *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium album*, *Parietaria judaica*, *Plantago lanceolata*, *Salsola kali*) y polen de cereales (*Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Secale cereal*, *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*).

35 Los alérgenos epiteliales pueden ser seleccionados de cualquier animal incluyendo pelo y caspa de gato, pelo y caspa de perro, pelo y caspa de caballo, pelo y caspa de humanos, pelo y caspa de conejo, y plumas.

Los alérgenos de insectos pueden ser seleccionados de hormigas, moscas, ácaros (*Acarus siro*, *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides microceras*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Euroglyphus maynei*, *lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*), cucarachas, veneno de avispa y de veneno de abeja.

40 Preferiblemente el material fuente es seleccionado de alérgenos de alimentos (*Arachis hypogaeal*), 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 cereal*, *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*), alérgenos epiteliales (pelo y caspa de gato, pelo y caspa de perro, pelo y caspa de caballo, pelo y caspa humanos, pelo y

caspa de conejo, y plumas), alérgenos de insectos (hormigas, moscas, ácaros, cucarachas, veneno de avispa y veneno de abeja).

Más preferiblemente el material fuente es seleccionado de cacahuete (*Arachis hypogaea*), polen (*Olea europaea*, *Parietaria judaica*, *Phragmites communis* and *Phleum pratense*), ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*), y epitelial (caspa de gato).

- 5 Más preferiblemente, el material fuente es seleccionado de *Arachis hypogaea*, *Olea europaea*, *Parietaria judaica*, *Phleum pratense*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Phragmites communis*, *Parietaria judaica* y caspa de gato.

Incluso más preferible, el material fuente es seleccionado de *Arachis hypogaea*, *Phleum pratense*, *Phragmites communis*, *Parietaria judaica* y caspa de gato.

Lo más preferible, el alérgeno es *Arachis hypogaea*.

- 10 Cuando el material fuente es cacahuete, preferiblemente las pieles son removidas, o el material puede ser triturado o pulverizado. Los cacahuets pueden ser tostados, asados, fritos o crudos.

El material fuente puede ser tratado para crear un área de superficie máxima para contacto con el agente de extracción líquido. El material fuente puede ser homogeneizado, mezclado, triturado o pulverizado para producir una pasta homogénea para extracción líquida. La etapa de extracción líquida es una etapa de "desengrasado" para remover compuestos lipofílicos tales como lípidos y ácidos grasos del material fuente.

- 15 El agente de extracción líquida puede ser acetona, la cual puede estar fría. La etapa de extracción líquida puede ser llevada a cabo en una relación de 1:1 (peso de material fuente/peso de agente de extracción líquido), o cualquier relación en donde el peso del agente de extracción líquido exceda el peso del material fuente, por ejemplo 1:2, 1:3, 1:5, 1:10. La etapa de extracción líquida se lleva a cabo preferiblemente en una relación de 1 kg de material fuente a 2L de agente de extracción líquido. La etapa de extracción líquida se lleva a cabo preferiblemente durante tiempo suficiente para que los lípidos en el material fuente se disuelvan en el agente de extracción líquido, el cual puede ser durante 1 minuto, preferiblemente durante 5 minutos, más preferiblemente durante 30 minutos, y los más preferiblemente durante 1 hora o más. La etapa de extracción líquida puede ser llevada a cabo a entre 20-25°C, pero se lleva a cabo preferiblemente en frío entre 2-6°C, y los más preferiblemente entre 3-5°C. Durante la etapa de extracción líquida, el material fuente es mezclado o agitado preferiblemente con el agente de extracción líquido.

La primera etapa de la separación puede ser filtración.

Después de la primera etapa de separación, el residuo del material fuente puede ser lavado con el agente de extracción líquido. Opcionalmente, el residuo de material fuente puede ser extraído adicionalmente con el agente de extracción líquido, luego separado. Preferiblemente, se llevan a cabo una, dos o más etapas de extracción líquida adicionales. La extracción líquida del residuo del material fuente preferiblemente se continúa hasta que el agente de extracción líquido permanezca transparente después de estar en contacto con el residuo del material fuente.

- 30 Después de la extracción líquida, el residuo del material fuente puede ser secado. El residuo del material fuente puede ser secado a entre 2-25°C, y preferiblemente es secado a temperatura ambiente. La etapa de secado se continúa preferiblemente durante tiempo suficiente para permitir la remoción del agente de extracción líquido del residuo del material fuente, lo cual puede estar entre 1-24 horas, 6-18 horas, 10-14 horas y preferiblemente alrededor de 12 horas.

Los alérgenos pueden ser obtenidos del residuo del material fuente "desengrasado" por extracción con un agente de extracción de alérgenos para producir un extracto de alérgenos crudo que comprende alérgenos disueltos en fase líquida y una fase sólida que consiste de residuo no alérgénico "no deseado". El agente de extracción de alérgenos puede ser una solución acuosa, y preferiblemente comprender un agente regulador. El agente de extracción de alérgenos puede comprender PBS y/o NaCl, por ejemplo una solución de PBS 0.01 M/NaCl 0.15 M. El residuo del material fuente puede ser extraído en el agente de extracción de alérgenos en una relación en donde el peso del agente de extracción de alérgenos excede el peso del residuo del material fuente, por ejemplo 1:2, 1:3, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50. Preferiblemente, el residuo del material fuente es extraído en el agente de extracción de alérgenos en una relación de 1:10 del residuo del material fuente: agente de extracción de alérgenos (p/p). La relación del residuo del material fuente al agente de extracción de alérgenos en la etapa de extracción puede variar pero debería de ser tal que los alérgenos en el residuo del material fuente puedan disolverse en el agente de extracción de alérgenos. La extracción del residuo del material fuente con el agente de extracción de alérgenos se lleva a cabo preferiblemente durante tiempo suficiente para que los alérgenos en el residuo del material fuente se disuelvan en el agente de extracción de alérgenos, lo cual puede ser entre 30 minutos a 12 horas, preferiblemente entre 1-6 horas, más preferiblemente entre 2-5 horas, y lo más preferiblemente alrededor de 4 horas. La etapa de extracción del alérgeno puede ser ejecutada a entre 20-25°C, pero se lleva a cabo preferiblemente en frío a entre 2-6°C, y lo

- 40
- 45
- 50

más preferiblemente entre 3-5°C. Durante la etapa de extracción del alérgeno, el residuo del material fuente se mezcla o agita preferiblemente con el agente de extracción del alérgeno.

Después de la etapa de extracción del alérgeno, los alérgenos disueltos en fase líquida pueden ser separados del residuo no alérgénico, para producir un extracto de alérgenos crudo. La etapa de separación es preferiblemente centrifugación, aunque son aplicables muchas técnicas para separar el sólido del líquido, siendo estas bien conocidas para una persona experimentada en la técnica. Preferiblemente, los alérgenos disueltos en fase líquida son centrifugados a entre 2-6°C, y preferiblemente entre 3-5°C para dar tiempo suficiente para sedimentar el residuo no alérgénico en forma de una pella, por ejemplo entre 1 minuto a 1 hora, o más de 1 hora. El extracto de alérgeno crudo (esto es el sobrenadante que contiene los alérgenos disueltos) puede ser almacenado a entre 2-6°C. La pella de residuo no alérgénico puede ser extraída adicionalmente con el agente de extracción de alérgenos utilizando las mismas condiciones que en la primera etapa de extracción de alérgenos, y preferiblemente durante un periodo de extracción más largo tal como entre 4-8 horas, 8-12 horas o más de 12 horas. Después de la segunda etapa de extracción del alérgeno, los alérgenos disueltos en la fase líquida pueden ser separados del residuo no alérgénico, para producir un extracto de alérgeno crudo. Los extractos de alérgeno crudo de la primera y segunda etapas de extracción de alérgeno son preferiblemente reunidos para tratamiento posterior.

El extracto de alérgeno crudo puede ser filtrado, por ejemplo usando tamaño de poro de 0.45 µm. El extracto de alérgeno crudo puede ser sometido a una etapa de remoción de la fracción de bajo peso molecular para remover moléculas que tengan un tamaño molecular bajo tal como sales y otros compuestos no alérgénicos. El solicitante ha determinado experimentar que la composición en proteína y alérgenos de los extractos de cacahuete está entre 8 y 150 kDa, y estos alérgenos necesitan ser retenidos durante las etapas de remoción de la fracción molecular. Por ejemplo, la Proteína de Transferencia de Lípidos del cacahuete (LTP)-un alérgeno importante-es de 8 kDa y necesita ser retenida durante la etapa de remoción de la fracción de peso molecular bajo. En la etapa e) las moléculas que tienen un tamaño molecular de menos de 8 kDa, o 7 kDa, o 6 kDa, o 5 kDa, 4 kDa o 3.5 kDa pueden ser removidas. La etapa de remoción de la fracción de bajo peso molecular se continúa preferiblemente hasta que la conductividad del extracto de alérgeno a 3-5°C es menor de 900 µS/cm, o menos de 800 µS/cm, o menos de 700 µS/cm, o menos de 600 µS/cm, o más preferiblemente menos de 500 µS/cm. La etapa de remoción de la fracción de bajo peso molecular se continua preferiblemente hasta que la conductividad del extracto de alérgeno a 3-5°C está entre 200 y 1000 µS/cm, o entre 300 y 900 µS/cm, y lo más preferiblemente entre 400 y 800 µS/cm.

El extracto de alérgenos natural purificado resultante puede ser filtrado, por ejemplo utilizando tamaño de poro de 0.45 y/o 0.22 µm.

El extracto de alérgeno natural puede ser utilizado en la preparación de una composición farmacéutica o vacuna para propósitos de estandarización, diagnóstico, síntesis y vacunación.

El proceso puede comprender además una etapa de tratamiento adicional, en donde los compuestos no alérgénicos que se adhieren a las proteínas alérgénicas son removidos utilizando medios que interrumpen las fuerzas electrostáticas, hidrófobas u otras físicas que son responsables de la adherencia de los compuesto no alérgénicos a las proteínas. Los medios para interrumpir las fuerzas electrostáticas, hidrófobas u otras físicas pueden ser seleccionados del grupo de medios químicos que consisten de materiales ácidos y alcalinos incluyendo materiales de intercambio de aniones y cationes, sales y corrientes eléctricas. Los medios químicos ácidos y alcalinos pueden ser utilizados en una cantidad que haga que se exceda del punto isoeléctrico de las proteínas. El extracto de alérgeno resultante de la etapa de tratamiento adicional se denominará de aquí en adelante como extracto de alérgeno despigmentado.

La etapa de tratamiento adicional puede comprender g) acidificar el extracto de alérgeno natural, removiendo moléculas que tengan un tamaño molecular de menos de 3.5 kDa, y neutralizar el pH para producir un extracto de alérgeno despigmentado.

La etapa de tratamiento adicional preferiblemente comprende un tratamiento con ácido moderado. En el tratamiento con ácido moderado el pH de las proteínas alérgénicas puede ser reducido a menos de pH 3, por ejemplo un valor de pH de entre 2.0 y 2.5. El pH de las proteínas alérgénicas puede estar entre 2.0 y 6.0. El solicitante ha identificado experimentalmente que el pH óptimo para deshacer los compuestos no alérgénicos que se adhieren a las proteínas alérgénicas está entre pH 2.0 y 2.1. Un valor de pH inferior a 2.0 lleva a que el perfil proteínico del extracto alérgénico despigmentado sea incompleto, y un pH insuficientemente bajo, por ejemplo por encima de 3.0, lleva a una eliminación incompleta de los compuestos no alérgénicos en el extracto alérgénico despigmentado resultante.

El pH del extracto alérgénico natural puede ser reducido utilizando un ácido adecuado, por ejemplo HCl. El extracto acidificado puede ser mantenido a pH bajo durante 1-60 minutos, preferiblemente 5-30 minutos, más preferiblemente 10-20 minutos, y lo más preferiblemente alrededor de 15 minutos. Las moléculas que tienen un tamaño molecular de menos de 3.5 kDa pueden ser removidas en una etapa de remoción de fracción molecular baja.

Después de la etapa de tratamiento adicional, el extracto despigmentado resultante puede ser recolectado, y el pH del extracto alergénico puede ser neutralizado usando un álcali adecuado, por ejemplo NaOH. El pH puede ser ajustado a un valor en donde se evita la precipitación de las proteínas, por ejemplo por encima de 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

5 La etapa de tratamiento adicional puede comprender:

g) acidificar el extracto de alérgeno natural a pH 2-2.1 y mantener el extracto acidificado durante 5-30 minutos, seguido por el sometimiento del extracto a una etapa de remoción de la fracción molecular baja para remover moléculas que tengan un tamaño molecular de menos de 3.5 kDa, y ajustar el pH a 7.3-7.4 para producir un extracto alergénico despigmentado.

La etapa de tratamiento adicional puede comprender acidificar el extracto de alérgeno natural a pH 2.0 a 4.0.

10 Los medios para interrumpir las fuerzas electrostáticas pueden comprender corrientes eléctricas en la forma de electroforesis. Los compuestos no alergénicos pueden tener un peso molecular de menos de 8,000 Da, 5,000 Da y preferiblemente menos de 3,500, y pueden comprender flavonoides y/o sus glicósidos. La etapa de remoción de la fracción de peso molecular bajo puede ser una etapa de diálisis, en donde el extracto es dializado contra un dializado tal como agua purificada o un regulador. La etapa de remoción de la fracción de bajo peso molecular puede llevarse a cabo a entre 20-
15 25°C, pero se lleva a cabo preferiblemente en frío a entre 2-6°C, y los más preferiblemente entre 3-5°C. La etapa de remoción de la fracción de bajo peso molecular puede llevarse a cabo durante 12-24 horas, en donde el solvente, o en el caso de diálisis, el dializado, se cambia regularmente para mantener la reacción.

El extracto alergénico despigmentado resultante puede ser filtrado, por ejemplo usando un tamaño de poro de 0.45 µm y/o 0.22 µm, y puede ser congelado o liofilizado para almacenamiento.

20 Cualquiera de los extractos producidos utilizando el proceso de la presente invención puede ser tratado posteriormente.

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

h) poner en contacto un extracto alergénico natural o despigmentado con un aldehído, y

i) remover las moléculas que tengan un tamaño molecular de menos de 100 kDa.

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

25 La etapa de polimerización puede comprender:

h) poner en contacto el extracto alergénico natural o un extracto alergénico despigmentado con un glutaraldehído o formaldehído,

i) someter el extracto a una etapa de remoción de la fracción molecular para remover moléculas que tienen un tamaño molecular de menos de 100 kDa, y

30 j) llevar a cabo la etapa i) hasta que el extracto alergénico tenga una conductividad de menos de 210 µS/cm a 3-5°C y/o este ausente de glutaraldehído para obtener un extracto alergénico polimerizado o un extracto alergénico polimerizado despigmentado.

35 Cuando el extracto para polimerización es liofilizado, puede ser reconstituido en un regulador, 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 lleva a cabo preferiblemente hasta la terminación, de tal manera que las bandas de proteína < 100 kDa (por ejemplo 14-25 kDa) no sean detectables por SDS-PAGE no reductora en el extracto polimerizado. El solicitante ha determinado experimentalmente (véase Tabla 2) que dos parámetros influyen en las condiciones óptimas para la polimerización.

40 En primer lugar, la concentración final de glutaraldehído es importante, por lo cual las concentraciones crecientes de glutaraldehído disminuyen el rendimiento de polímero e incrementan el rendimiento de residuo obtenido por centrifugación antes de la diálisis. En contraste a las condiciones de polimerización previamente conocidas que emplean una concentración de glutaraldehído de alrededor de 5 mg/ml (esto es 0.009 ml de glutaraldehído por ml de extracto alergénico), la concentración óptima del glutaraldehído fue determinada experimentalmente como aproximadamente el doble de la
45 cantidad conocida, esto es, 10 mg/ml (0.02 ml de glutaraldehído por ml de extracto alergénico). El aldehído puede ser

agregado en un rango de 1-20 mg/ml. Mientras que el empleo de cantidades previamente conocidas de una concentración final de glutaraldehído puede llevar a cierta polimerización de los alérgenos, se prefiere que el aldehído se agregue a una concentración final de 10 mg/ml o en una relación de 0.02 ml de glutaraldehído por ml de extracto para alcanzar una polimerización óptima.

- 5 En segundo lugar, el solicitante ha determinado que la disminución de la rata de adición del glutaraldehído hace disminuir el rendimiento del polímero e incrementa el rendimiento de residuo. El aldehído puede ser agregado al extracto a una velocidad constante, por ejemplo entre 0.001-0.5 ml por minuto (1-500 μ l/minuto, 60-3000 μ l/hora).

- 10 La reacción de polimerización puede ser mantenida por entre 1-12 horas, preferiblemente 7 horas a temperatura ambiente. La reacción de polimerización puede ser detenida utilizando glicina en una proporción de 40 mg por ml de solución de extracto polimerizado. La reacción detenida puede ser mantenida durante la noche a 3-5°C, preferiblemente bajo agitación. Los alérgenos polimerizados en la fase líquida pueden ser separados del residuo insoluble para producir un extracto alérgénico polimerizado o un extracto alérgénico polimerizado despigmentado. La etapa de separación es preferiblemente centrifugación, aunque son aplicables muchas técnicas de separación, siendo estas bien conocidas para una persona experimentada en la técnica. Preferiblemente, el extracto es centrifugado a entre 2-6°C, y preferiblemente entre 3-5°C, para dar tiempo suficiente para sedimentar el residuo insoluble en forma de una pella, por ejemplo entre 1 minuto a 1 hora, o más de 1 hora. El sobrenadante (que contienen los alérgenos solubles) puede ser recolectado y sometido a la etapa de remoción de la fracción molecular (i).

- 20 En la etapa i) las moléculas que tienen un peso molecular de menos de 150 kDa pueden ser removidas. Se ha encontrado que las moléculas con un peso molecular por encima de 3 MDa precipitan y también pueden ser removidas durante la etapa de polimerización.

- 25 Preferiblemente la etapa de remoción de la fracción molecular es una etapa de diálisis, en donde el extracto es dializado contra un dializado tal como agua purificada o un regulador, a 3-5°C. La etapa de remoción de la fracción molecular puede ser continuada hasta que la conductividad medida a 3-5°C sea menor de 200 μ S/cm, más preferiblemente menor de 175 μ S/cm, más preferiblemente menor de 150 μ S/cm, más preferiblemente menor de 125 μ S/cm, más preferiblemente menor de 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 alérgénico resultante puede ser filtrado, por ejemplo usando tamaño de poro de 0.45 μ m y/o 0.22 μ m, y puede ser congelado o liofilizado para almacenamiento.

Cualquiera de las etapas de remoción de la fracción de peso molecular bajo c), e) o g) pueden comprender una etapa de ultrafiltración, una etapa de diafiltración, una etapa de diálisis, o filtración.

- 30 En su forma más simple el proceso puede comprender preparar un extracto alérgénico soluble natural, tratando adicionalmente de manera opcional el extracto, por ejemplo a través de tratamiento ácido moderado, para remover compuestos no alérgénicos que tienen un peso molecular bajo, y polimerizar el extracto usando un aldehído. El extracto alérgénico soluble natural puede ser alérgenos de cacahuete, polen, grama, epiteliales, de mohos, hongos, insectos o ácaros. Los procesos de la presente invención producen un extracto alérgénico que exhibe una capacidad de enlazamiento a IgE reducida pero que retiene su capacidad inmunogénica.

La presente invención comprende adicionalmente un tratamiento para alergia y divulga un fármaco de diagnóstico para la alergia, comprendiendo ambos extractos alérgénicos producidos por los procesos antes mencionados, como el ingrediente activo. La alergia puede estar asociada con la exposición a diversos alérgenos que disparan una respuesta alérgica mediada por IgE como se discute aquí.

- 40 De acuerdo con la presente invención se provee un extracto alérgénico obtenible de acuerdo con el proceso antes mencionado. Se provee un extracto alérgénico purificado para uso como una sustancia terapéutica activa. Se provee un extracto alérgénico natural, un extracto alérgénico natural polimerizado, un extracto alérgénico despigmentado, un extracto alérgénico polimerizado despigmentado obtenible de acuerdo con el proceso antes mencionado. Preferiblemente, el extracto es un extracto alérgénico natural polimerizado, y más preferiblemente un extracto alérgénico polimerizado despigmentado.

- 45 El extracto alérgénico puede ser seleccionado de cacahuete (*Arachis hypogaea*), polen (*Olea europaea*, *Parietaria jerdaiica*, *Phragmites communis*, *Parietaria judaica* y *Phleum pratense*), ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*) y epitelial (caspas de gato).

El extracto alérgénico puede ser para el uso en el tratamiento de alergia. En una realización preferida el extracto alérgénico de *Arachis hypogaea* puede ser para uso en el tratamiento de alergia al cacahuete.

El extracto alergénico polimerizado despigmentado puede estar caracterizado por las siguientes propiedades fisicoquímicas y biológicas:

i. Soluble en agua,

5 ii. Ausencia de alérgenos/proteínas no polimerizadas con un peso molecular inferior a 100 kDa (identificados como bandas por SDS-PAGE en condiciones no reductoras)

iii. Ausencia de bandas de reconocimiento de IgE con un peso molecular inferior a 100 kDa (identificadas por inmunotransferencia en condiciones no reductoras).

iv. Ausencia de moléculas polimerizadas con un peso molecular inferior a 100 kDa (determinado por cromatografía de exclusión por tamaño con HPLC).

10 v. Reducción del 75% de los grupos amino libres con respecto al extracto natural (determinado por el método fluram)

vi. Reducción de la potencia biológica (95%) con respecto al extracto alergénico natural (determinado por experimentos de inhibición por ELISA de IgE utilizando una acumulación específica de sueros de individuos sensibilizados).

vii. Ausencia de toxicidad anormal en ratones.

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

Se provee el uso de un extracto alergénico de acuerdo con la presente invención en diagnóstico para trastornos inmunológicos, preferiblemente para detectar enfermedades alérgicas. Se provee el uso de un extracto alergénico de acuerdo con la presente invención para el tratamiento de alergia o en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de alergia. El uso puede ser para inmunoterapia. El uso puede ser para propósitos de estandarización, diagnóstico, síntesis y vacunación. El uso puede ser en tratamiento terapéutico de pacientes, preferiblemente en inmunoterapia. El uso puede ser en el monitoreo de pacientes durante la inmunoterapia.

20 De acuerdo con la presente invención se provee una composición farmacéutica que comprende un extracto alergénico de acuerdo con la presente invención. Se provee una composición farmacéutica para el tratamiento de alergia que comprende como ingrediente activo una cantidad farmacéuticamente efectiva de un extracto alergénico de acuerdo con la presente invención y al menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente estable. Se provee una composición diagnóstica para alergia que comprende como ingrediente activo una cantidad efectiva en diagnóstico de un extracto alergénico de acuerdo con la presente invención.

30 De acuerdo con la presente invención se provee una vacuna que comprende un extracto alergénico de acuerdo con la presente invención. La composición farmacéutica y vacuna puede comprender adicionalmente uno o más adyuvantes, diluyentes, preservativos o mezclas de los mismos. La composición farmacéutica o vacuna puede comprender un vehículo fisiológicamente aceptable. Tal como se utiliza aquí, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa preferiblemente aprobado por una agencia reguladora de un gobierno, o listada en la Farmacopea Europea o de los Estados Unidos u otra farmacopea reconocida en general para uso en humanos.

35 Tales vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceite, incluyendo los de origen en petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Las soluciones salinas y dextrosa acuosa y soluciones de glicerol también pueden ser empleadas como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen manitol, albúmina de suero humano (HSA), almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, sílica gel, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares.

40 Se provee un proceso para producir una vacuna alergénica que comprende la formulación de un extracto alergénico de acuerdo con la presente invención con uno o más adyuvantes, diluyentes, conservantes o mezclas de los mismos.

Se provee una vacuna obtenible de acuerdo con el proceso. La vacuna puede ser para uso subcutáneo o sublingual.

45 Se provee el uso de una vacuna de acuerdo con la presente invención en el tratamiento de alergia o en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de alergia.

Se provee un método para prevenir una sensibilización a alérgenos que comprende la etapa de: exponer un individuo a una cantidad efectiva de un extracto alérgico, la composición farmacéutica o la vacuna de la presente invención.

Se provee un método para tratar una alergia en un individuo sensibilizado, que comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de un extracto alérgico, la composición farmacéutica o la vacuna de la presente invención. El extracto alérgico, la composición farmacéutica o la vacuna puede ser administrada por vía subcutánea, o sublingual, y pueden ser administrados como una dosificación creciente o constante.

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

Breve descripción de los dibujos

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

Figura 2: Análisis por HPLC del extracto alérgico natural de cacahuete: Estándar de rango bajo BioRad (línea 1), extracto natural (línea 2), precipitado (línea 3), fracción 20 (línea 4), fracción 21 (línea 5), fracción 40 (línea 6), fracción 78 (línea 7), fracción 96 (línea 8), fracción 111 (línea 9);

Figura 3: Análisis por HPLC de extracto alérgico de cacahuete polimerizado despigmentado;

Figura 4: Análisis por HPLC de residuo del extracto alérgico de cacahuete polimerizado despigmentado: estándar de rango bajo BioRad (línea 1), residuo de extracto polimerizado despigmentado (línea 2), precipitado (línea 3), fracción 21 (línea 4), fracción 51 (línea 5), fracción 74 (línea 6), fracción 75 (línea 7), fracción 120 (línea 8);

Figura 5: Análisis por SDS-PAGE de 40 µg de extractos de alérgeno de cacahuete: STD (Estándar Bio-Rad de rango bajo), líneas 1-4 bajo condiciones reductoras, líneas 5-8 bajo condiciones no reductoras, cacahuete 230209/LN natural (línea 1), cacahuete 230209/LD despigmentado (línea 2), cacahuete 030309/LP despigmentado/polimerizado (línea 3), cacahuete 030309/LP despigmentado/residuo polimerizado (línea 4), cacahuete 230209/LN natural (línea 5), cacahuete 230209/LD despigmentado (línea 6), cacahuete 030309/LP despigmentado/polimerizado (línea 7), y cacahuete 030309/LP despigmentado/polimerizado residuo (línea 8);

Figura 6: Análisis por IEF de 40 µg de extractos alérgicos de cacahuete; estándar Bio-Rad con marcadores IEF, pI 4.45-9.6 (líneas 1 y 2), Cacahuete 230209/LN Native (línea 3), Cacahuete 230209/LD Despigmentado (línea 4), Cacahuete 030309/LP Despigmentado/polimerizado (línea 5), Cacahuete 030309/LP Residuo despigmentado/polimerizado (línea 6);

Figura 7: Análisis por inmunotransferencia de 40 µg de extractos alérgicos de cacahuete bajo condiciones reductoras (Figura 7a) y condiciones no reductoras (Figura 7b) utilizando un conjunto de sueros de donantes alérgicos a cacahuete (dil. 1/20) y α-IgE-PO (120705, dil. 1/500), en donde en cada Figura: Cacahuete 230209/LN natural (línea 1), Cacahuete 230209/LD Despigmentado (línea 2), Cacahuete 030309/LP Despigmentado/polimerizado (línea 3), Cacahuete 030309/LP Residuo despigmentado/polimerizado (línea 4);

Figure 8: Análisis de inhibición por inmunotransferencia de extractos alérgicos de cacahuete bajo condiciones reductoras utilizando un conjunto de sueros de donantes alérgicos a cacahuete (dil. 1/20) y α-IgE-PO (120705, dil. 1/500), en donde la línea 1 es un control (solamente sueros) y las líneas 2-4 usan los sueros reunidos junto con 800 µg de extracto alérgico de cacahuete despigmentado/polimerizado, 400 µg de extracto (línea 3), y 200 µg de extracto (línea 4);

Figura 9: Análisis de inhibición de IgE con base en ELISA de extractos alérgicos de cacahuete;

La presente invención es ilustrada mediante los siguientes ejemplos los cuales detallan procesos para la preparación, purificación, tratamiento posterior y polimerización de extractos que comprenden alérgenos. Los métodos A-D detallan los procesos usados para hacer los extractos alérgicos y los ejemplos 1-8 describen la caracterización experimental de extractos alérgicos despigmentados polimerizados o despigmentados.

Métodos

A. Proceso de desengrasado de material alérgico crudo

El extracto desengrasado fue obtenido por diversos métodos dependiendo de la naturaleza de la materia prima. Los métodos para cada alérgeno están definidos en cada ejemplo.

En general, el material homogeneizado es desgrasado en acetona a 3-5°C y filtrado. Esta etapa se repite hasta que la acetona es transparente. El material desengrasado es recuperado y secado a temperatura ambiente hasta que se haya removido toda la acetona.

B. Preparación del extracto alergénico natural

- 5 El material desengrasado seco fue pesado y extraído en PBS 0.01 M/NaCl 0.15 M en una proporción 1:10 durante 4 horas a 3-5°C bajo agitación magnética. Después de esto, la solución fue centrifugada durante 30 minutos a 4°C a 10.000 rpm. El sobrenadante resultante fue recolectado y almacenado a 3-5°C y la pella fue reconstituida en PBS 0.01 M/NaCl 0.15 M (1:10) y extraída durante la noche a 3-5°C bajo agitación magnética. La solución fue centrifugada durante 30 minutos a 3-5°C a 10.000 rpm y el sobrenadante fue recolectado y mezclado con la fracción obtenida previamente. El extracto combinado fue filtrado utilizando tamaño de poro de 0.45 µm y se dializó de manera extensiva en membranas de diálisis de corte de 3 kDa hasta que la conductividad fue inferior a 1000 µS/cm. El extracto fue entonces filtrado para esterilización utilizando tamaño de poro de 0.22 µm.

C. Preparación de extracto alergénico despigmentado

- 15 El extracto natural en solución acuosa y mantenido a 3-5°C fue tratado posteriormente utilizando el siguiente procedimiento. Bajo agitación magnética, el pH de la solución fue ajustado a 2-2.1 mediante la adición de HCl 0.1 M y mantenido bajo estas condiciones durante 15 minutos. Después de esto el extracto fue dializado en membranas de diálisis de corte de 3.5 kDa con agua purificada durante 17 horas contra 10 volúmenes de agua purificada a 3-5°C. El agua purificada fue sustituida 4 veces durante este periodo. Después del tratamiento con ácido moderado, el extracto fue recolectado y el pH ajustado 7.3-7.4 utilizando NaOH 0.1 M. Finalmente el extracto fue filtrado para esterilización hasta 0.22 µm, congelado y liofilizado.

20 D. Preparación de extracto alergénico despigmentado polimerizado

- El extracto despigmentado liofilizado fue reconstituido en PBS 0.01 M/NaCl 0.15 M hasta una concentración final de 15 mg/ml bajo agitación magnética hasta que se diluyó completamente. El proceso de polimerización consistió de la adición de glutaraldehído usando 0.02 ml de glutaraldehído por ml de extracto despigmentado. El glutaraldehído fue agregado al extracto despigmentado a una velocidad constante (36 ml/hora) utilizando un inyector automático. La reacción de polimerización fue mantenida durante 7 horas a temperatura ambiente. La reacción fue detenida con la adición de glicina en una proporción de 40 mg de glicina por ml de solución. La reacción fue mantenida durante la noche a 3-5°C bajo agitación magnética continua. Después de esto, la solución fue centrifugada a 10.000 rpm durante 30 minutos a 3-5°C. La pella fue removida y el sobrenadante fue recolectado y dializado de manera extensiva en membranas de diálisis de corte de 100 kDa con agua purificada (16.67 ml de agua por ml de extracto) en condiciones de refrigeración. El proceso fue considerado terminado cuando la conductividad fue inferior a 210 µS/cm y la ausencia de glutaraldehído fue confirmada por barrido UV/visible. Finalmente el extracto fue filtrado hasta esterilización utilizando tamaño de poro de 0.22 µm, congelado y liofilizado.

El producto final consiste de un extracto despigmentado y polimerizado liofilizado el cual fue almacenado a 4°C en condiciones de liofilización.

35 Caracterización inmunológica

Contenido de proteína

El contenido de proteína de los extractos naturales, despigmentados, despigmentados/polimerizados y el residuo despigmentado/polimerizado fue medido por el método de Lowry Biuret siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los resultados para un lote experimental para el Ejemplo 1 se muestran en la Tabla 1

40 Cromatografía de exclusión por tamaño (HPLC)

- Una muestra liofilizada del extracto fue resuspendida en agua altamente purificada hasta una concentración final de 1 mg/ml y agitada durante 10-15 minutos. La muestra fue centrifugada a 13000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue transferido a un vial para inyección automática. La columna usada para el análisis por HPLC fue una PL-aquagel-OH 60 8 µm (PolymerLabs), equilibrada previamente con agua, en donde el fraccionamiento se basa en diferencias de tamaño. Las muestras fueron ejecutadas con una rata de flujo de 1 ml/minuto (siguiendo las recomendaciones del fabricante). Se detectaron las señales de UV a 254 nm y 280 nm con el fin de obtener un cromatograma. Las figuras 2-4 muestran los resultados del análisis por HPLC.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

El análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) fue utilizado para determinar el perfil de proteína/antigénico de los extractos. Las muestras fueron corridas en geles de SDS-PAGE con 2.67% C, 15% de T acrilamida en condiciones naturales o desnaturalizadas (la solución reguladora contiene β -mercaptoetanol y fue calentada durante 10 minutos a 95°C). Cuarenta microgramos del material liofilizado de cada extracto fueron cargados sobre los geles. Los marcadores de referencia con pesos moleculares conocidos (BioRad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos) fueron corridos en el mismo gel. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie R-250 (BioRad Laboratories). El perfil antigénico fue estudiado utilizando un escáner (Sharp JX-300; Sharp Electronics Corp, Mahwah, NJ) y analizado utilizando el Image Master 1-D Elite v 4.00 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). La figura 5 muestra un gel teñido con azul de Coomassie, en donde el extracto alérgico despigmentado/polimerizado, bajo condiciones no reductoras (línea 7) muestra la ausencia de alérgenos/proteínas no polimerizados con un peso molecular inferior a 100 kDa.

Enfoque isoelectrico

El análisis por enfoque isoelectrico (IEF) fue utilizado para determinar el perfil de proteína/antigénico de los extractos de acuerdo con el punto isoelectrico de las proteínas. Las muestras fueron corridas en geles de electroforesis de poliacrilamida en condiciones naturales. Cuarenta miligramos de material liofilizado de cada extracto fueron cargados sobre los geles. Los marcadores de referencia con puntos isoelectricos conocidos (BioRad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos) fueron corridos en el mismo gel. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie R-250 (BioRad Laboratories) y el perfil antigénico fue estudiado utilizando un escáner (Sharp JX-300; Sharp Electronics Corp, Mahwah, NJ) y analizado utilizando el Image Master 1-D Elite v 4.00 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Las líneas 3-6 de la figura 6 muestran los resultados para el natural (línea 3), despigmentado (línea 4), despigmentado/polimerizado (línea 5) y residuo despigmentado/polimerizado (línea 6).

Inmunotransferencia

Las proteínas separadas electroforéticamente fueron transferidas a membranas P-Immobilon (Millipore, Bedford, MA). Después de la transferencia, las membranas fueron secadas a temperatura ambiente durante 4 horas. Las membranas fueron incubadas durante la noche con un conjunto de suero diluido en solución salina regulada con fosfato 0.01 M Tween 2%. Se detectó el enlazamiento específico a IgE utilizando IgE antihumana monoclonal conjugada con peroxidasa (Ingenasa, Madrid) durante 2 horas. El perfil alérgico fue estudiado utilizando el Sharp JX-300 y analizado utilizando el Image Master 1-D Elite v 4.00. Las líneas 1-4 de la figura 7b muestran el resultado para el nativo (línea 1), despigmentado (línea 2), despigmentado/polimerizado (línea 3) y residuo despigmentado/polimerizado (línea 4) bajo condiciones no reductoras. El extracto alérgico despigmentado/polimerizado no exhibe bandas de reconocimiento de IgE por debajo de 100 kDa. En la figura 8, se observa la inhibición de IgE utilizando diluciones de extractos alérgicos de cacahuete polimerizado en comparación con sueros reunidos de donantes alérgicos al cacahuete.

Inhibición de IgE

La actividad alérgica *in vitro* de los extractos (natural, despigmentado y polimerizado) fue probada por medio de inhibición con ELISA, estableciendo el punto de inhibición del 50%, utilizando un extracto natural como referencia. Las placas de microtitulación plásticas (Immulon IV; Dynex Technologies, Chantilly, VA) fueron recubiertas con el extracto natural (10 μ g de proteína/ml) durante la noche. Se hicieron varias diluciones a partir de los extractos natural, despigmentado y polimerizado. Cada dilución fue incubada con un conjunto de sueros durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de esto, la dilución de los extractos fue transferida a las placas recubiertas con el extracto natural e incubadas durante 2 horas. Después de lavar, se agregaron 100 μ l de IgE peroxidasa antihumana y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después del lavado, las placas fueron desarrolladas durante 30 minutos y detenidas con ácido sulfúrico (1N). La inhibición mayor del enlazamiento de IgE se observa usando el extracto alérgico despigmentado/polimerizado (figura 9).

Inhibición de IgG

La actividad alérgica *in vitro* de los extractos (natural, despigmentado y polimerizado) fue probada por medio de inhibición con ELISA, estableciendo el punto de inhibición al 50%, usando un extracto natural como referencia. Las placas de microtitulación plásticas (Immulon II; Dynex Technologies, Chantilly, VA) fueron recubiertas con el extracto natural (10 μ g de proteína/ml) durante la noche. Se hicieron varias diluciones para los extractos natural, despigmentado y polimerizado. Cada dilución fue incubada con un conjunto de sueros durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de esto, las diluciones de los extractos fueron transferidas a las placas recubiertas naturales e incubadas durante 2 horas. Después del lavado, se agregaron 100 μ l de IgG peroxidasa antihumana y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después del lavado, las placas fueron desarrolladas durante 30 minutos y detenidas con ácido sulfúrico (1N).

Fluram

La determinación de los grupos amino libres fue detectada en extractos naturales, despigmentados y despigmentados-polimerizados. La polimerización reduce el número de grupos amino libres porque el entrecruzamiento entre los alérgenos es mediado por este grupo reactivo. Los extractos natural y despigmentado fueron preparados a 25 µg/ml y los extractos despigmentados- polimerizados a 1000 µg/ml. Se utilizó ácido 6-aminocaproico a 2-10 mg/ml como estándar. Se agregó solución de Evans a todas las muestras. Los grupos amino son diluidos en este regulador. Después de esto, se agregó regulador de borato de sodio (0.2 M) a todas las muestras y se homogeneizaron. Finalmente se agregó a la mezcla fluorescamina previamente diluida en acetona y la solución se midió en un fluorímetro con excitación a 390 nm y emisión a 480 nm.

Espectrofotometría de barrido UV/visible

Los extractos alérgicos natural, despigmentado y despigmentado-polimerizado se diluyen a 1 mg/ml en PBS 0.01 M. Después de la dilución las muestras se analizan a λ , entre 200 y 600 nm.

Potencia biológica por HEP

La actividad biológica de los extractos (natural y despigmentado) fue medida por competición REINA. Se cubren placas de microtitulación plásticas con anti IgE. Se agrega un conjunto de sueros de individuos alérgicos en las microplacas y se incuban durante 30 minutos. Las muestras y la referencia In house (IHR) son diluidas previamente e incubadas con IHR marcado con peroxidasa. Después de esto las microplacas son lavadas y las muestras incubadas se agregan a las microplacas y se incuban durante 30 minutos. Finalmente, las microplacas son lavadas extensamente e incubadas con cromógeno. Las placas son leídas a 450 nm.

Toxicidad anormal en ratones

Siguiendo las recomendaciones de la Farmacopea Europea se inyectaron ratones hembra (cepa NMRI) con 1 ml de extractos de cacahuete despigmentados y polimerizados a concentraciones de 0.1 mg/ml y 1 mg/ml. Se usaron inyecciones intraperitoneales para la administración. El periodo de observación fue de 7 días después de los cuales, no se observaron en los animales variaciones significativas en peso o comportamiento.

Ejemplos

Ejemplo 1- Extracto alérgico de cacahuete

Etapas A. Proceso de desengrasado de material de cacahuete crudo

Se homogeneizaron cacahuete pelados en un mezclador para obtener una pasta homogeneizada. El material homogeneizado fue desengrasado con acetona fría en una proporción de 1 kg de pasta: 2L de acetona durante 1 hora a 3-5°C bajo agitación magnética continua para extraer lípidos, ácidos grasos y flavonoides libres. La solución resultante fue filtrada en un embudo Buchner. La acetona fue removida y el extracto fue recolectado en un filtro, y lavado 2 veces con acetona fresca. El proceso completo fue repetido dos veces más hasta que la acetona recolectada era transparente. Después de finalizar el proceso, el extracto de cacahuete desengrasado fue recolectado y secado a temperatura ambiente bajo una cabina de flujo laminar durante 12 horas, hasta que el material estuvo totalmente seco y toda la acetona había sido removida.

El extracto alérgico de cacahuete despigmentado polimerizado fue obtenido de acuerdo con las etapas de método B-D.

Caracterización de los extractos alérgicos de cacahuete

El extracto alérgico de cacahuete despigmentado polimerizado producido tuvo que satisfacer las siguientes especificaciones:

- a. Producto soluble en agua.
- b. Ausencia de alérgenos/proteínas no polimerizados con un peso molecular inferior a 100 kDa (identificados como bandas por SDS-PAGE en condiciones no reductoras).
- c. Ausencia de bandas de reconocimiento de IgE con un peso molecular inferior a 100 kDa (identificadas por inmunotransferencia en condiciones no reductoras).

d. Ausencia de moléculas polimerizadas en un peso molecular inferior a 100 kDa (determinado por cromatografía por exclusión por tamaño con HPLC).

e. Reducción de los grupos amino libres (75%) con respecto al extracto natural (determinado por el método fluram)

5 f. Reducción de la potencia biológica (95%) con respecto al extracto natural (determinado por los experimentos de inhibición de IgE por ELISA utilizando un conjunto específico de sueros de individuos sensibilizados).

g. Ausencia de toxicidad anormal en ratones.

La pella que comprende el residuo despigmentado/polimerizado fue utilizada como control en la caracterización de los extractos natural, despigmentado y despigmentado/polimerizado (refiérase a Tabla 1 y 2).

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

Cacahuete	Lote	Rendimiento	Inhibición por ELISA (IgE) μ g 50% inhibición (% potencia perdida)	Inhibición por ELISA (IgG) μ g 50% inhibición (% potencia perdida)	Lowry-Biuret μ g proteína/mg liofilizado	Fluram μ g ACA/mg liofilizado (% perdida grupos amino)	UV-Visible 1 mg/ml
Natural	230209/LN	5.95%	0.041	0.021	419.6	65.1	1.326 (264 nm)
Despigmentado	230209/LD	85.3%	0.153	0.144	372.7	66.9	1.356 (260 nm)
Despigmentado y polimerizado	030309/LP	9.08%	1.336 (96.9%)	0.699	348.3	6.45 (90%)	2.591 (260 nm)
Despigmentado y polimerizado (residuo)	030309/LP	46.3%	1.405 (97.1%)	0.627	234.6	2.82 (95.7%)	0.192 (260 nm)

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

Etapas A. Proceso de desengrasado de material alergénico crudo

15 El polen de ambrosía recolectado de la planta después de la polinización es desengrasado con acetona fría en una proporción de 1:4 (p/v) bajo agitación continua durante 3 horas a 3-5°C. La solución resultante fue filtrada en un embudo Buchner y lavada al menos 3 veces con acetona fresca. Después de terminar el proceso, el extracto desengrasado fue recolectado y secado a temperatura ambiente bajo una cabina de flujo laminar durante 12 horas, hasta que el material estuvo totalmente seco y toda la acetona había sido removida.

La ambrosía despigmentada polimerizada (*Ambrosia artemisiifolia*) fue obtenida de acuerdo con las etapas de método B-D. El pH de la solución se ajusta a 4-4.1 mediante la adición de HCl 0.1 M en la etapa C.

20 El producto final consiste de un extracto de ambrosía despigmentado y polimerizado liofilizado, que es almacenado a 4°C en condiciones de liofilización. El producto resultante tuvo que satisfacer las siguientes especificaciones:

a. Producto soluble en agua.

- b. Ausencia de alérgenos/proteínas no polimerizados con un peso molecular inferior a 100 kDa (identificados como bandas por SDS-PAGE en condiciones no reductoras).
 - c. Ausencia de bandas de reconocimiento de IgE con un peso molecular inferior a 100 kDa (identificadas por inmunotransferencia en condiciones no reductoras).
 - 5 d. Ausencia de moléculas polimerizadas con un peso molecular inferior a 100 kDa (determinado por cromatografía por exclusión por tamaño con HPLC).
 - e. Reducción de los grupos amino libres (75%) con respecto al extracto natural (determinado por el método fluram)
 - f. Reducción significativa de la potencia biológica con respecto al extracto natural (determinada por experimentos de inhibición de IgE por ELISA utilizando un conjunto específico de sueros de individuos sensibilizados).
 - 10 g. Detección del alérgeno principal Amb a 1. Anticuerpos monoclonales
 - h. Ausencia de toxicidad anormal en ratones.
- Contenido de alérgeno principal
- El contenido del alérgeno principal Amb a 1 se mide utilizando el kit Indoor Biotech (INDOOR Biotechnologies Inc. Charlottesville, Virginia, Estados Unidos). El anticuerpo IgG policlonal anti Amb a 1 es recubierto (1:1000 desde el vial preparado a 1 mg/ml). Se prepara una curva estándar utilizando un extracto de ambrosía cuantificado y estandarizado contra el US FDA (referencia de inmunodifusión radial para Amb a 1, C14-RAS que contiene 30 U de Amb a 1/ml) que contiene una actividad de 2.5 U/ml de Amb a 1. El anticuerpo secundario consiste de un anticuerpo biotinilado IgG policlonal de conejo levantado contra alérgeno de ambrosía corto. Muestras naturales y despigmentadas son diluidas a 500 ng/ml. El contenido de alérgeno principal es calculado en los extractos polimerizados utilizando estos valores.
- 15
- 20 La pella que comprende residuo despigmentado/polimerizado fue utilizada como control en la caracterización de los extractos natural, despigmentado y despigmentado/polimerizado (refiérase a Tabla 3a y 3b).

Tabla 3a-Resumen de los resultados obtenidos para el Ejemplo 2 (Ambrosía, *Ambrosia artemisiifolia*)

Ambrosía	Rendimiento (%)	ELISA inhibición (IgE) 50% de inhibición (µg) (% pérdida potencia)	Contenido de proteína µg prot./mg	Fluram µg ACA/mg (% reducción grupos amino)	UV/visible 1 mg/ml Absorbancia (nm)	Amb a 1 U/mg Liof.
Natural	12.36	0.022	201	62.3	1.102 (272 nm)	61.3
Despigmentada	77.4	0.011	288	82.4	0.766 (274 nm)	69.2
Despigmentada-polimerizada (0.009)	81.7	0.104	332	4.04 (93.5%)	1.665 (268 nm)	N/A
Despigmentada-polimerizada (0.013)	72.5	0.120	359	4.06 (93.5%)	1.687 (268 nm)	N/A
Despigmentada-polimerizada (0.02)	70.13	0.182	210	6.3 (89.9%)	1.610 (268 nm)	N/A
Despigmentada-polimerizada (0.018)	68.3	0.141	274	3.8 (93.8%)	1.502 (268 nm)	N/A

Tabla 3b-Resumen de resultados obtenidos para el Ejemplo 2 (Ambrosía, *Ambrosia artemisiifolia*)

Ambrosía	SDS-PAGE (kDa)	Inmunotransferencia (kDa)	Tamaño molecular (kDa)
Natural	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

El polen de *Olea europaea* recolectado del árbol después de la polinización es desengrasado con acetona fría en una proporción 1:4 (p/v) bajo condiciones de agitación durante 3 horas a 3-5°C. La solución resultante fue filtrada en un embudo Buchner y lavada al menos 3 veces con acetona fresca. Después de terminar el proceso, el extracto desengrasado fue recolectado y secado a temperatura ambiente bajo una cabina de flujo laminar durante 12 horas, hasta que el material estuvo totalmente seco y toda la acetona había sido removida.

El extracto alergénico de polen despigmentado fue obtenido de acuerdo con la etapa de método B-C

El producto final consiste de un extracto despigmentado liofilizado, que es almacenado a 4°C en condiciones de liofilización. El producto resultante tiene que satisfacer las siguientes especificaciones:

a. Producto soluble en agua.

b. Perfil de proteína similar al extracto natural, determinado por SDS-PAGE y 2-D.

c. Perfil alergénico similar al del extracto natural, determinado por inmunotransferencia

d. Contenido de proteína similar al extracto natural

e. Contenido de alérgeno principal similar al extracto natural

f. Actividad biológica similar a la del extracto natural

Tabla 4-Resumen de los resultados obtenidos para el Ejemplo 3 (*Olea europea*)

<i>Olea europaea</i>	Rendimiento (%)	ELISA inh. μ (IgE) μ 50% inh.	Contenido de proteína μ g prot/mg	UV-visible mg/ml 1	Potencia HEP-L/mg
Natural	3.64	0.009	321.6	1.577 (270 nm)	257.2
Despigmentado pH2	74.0	0.009	307.4	1.302 (274 nm)	196.8
Despigmentado pH3	62.0	0.007	324.2	1.365 (274 nm)	204.8
Despigmentado pH4	70.7	0.008	368.7	1.291 (274 nm)	221.3
Despigmentado pH5	78.2	0.009	348.8	1.374 (274 nm)	257.7
Despigmentado pH6	80.2	0.010	402.1	1.348 (274 nm)	247.0

Ejemplo 4-Extracto alergénico de polen (*Parietaria judaica*)

El polen de *Parietaria judaica* recolectado de la planta después de la polinización es desengrasado con acetona fría en una proporción de 1:4 (p/v) bajo agitación continua durante 3 horas a 3-5°C. La solución resultante fue filtrada en un embudo Buchner y lavada al menos 3 veces con acetona fresca. Después de terminar el proceso, el extracto desengrasado fue

recolectado y secado a temperatura ambiente bajo una cabina de flujo laminar durante 12 horas, hasta que el material estuvo completamente seco y la acetona había sido removida.

El extracto alergénico de polen despigmentado fue obtenido de acuerdo con las etapas de método B y C.

5 El producto final consiste de un extracto despigmentado liofilizado, para ser almacenado a 4°C en condiciones de liofilización. El producto resultante tiene que satisfacer las siguientes especificaciones:

- a. Producto soluble en agua.
- b. Perfil de proteína similar al extracto natural, determinado por SDS-PAGE y 2-D.
- c. Perfil alergénico similar al extracto natural, determinado por inmunotransferencia
- d. Contenido de proteína similar al extracto natural
- 10 e. Contenido del alérgeno principal similar al extracto natural
- f. Actividad biológica similar al extracto natural

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

<i>Parietaria judaica</i>	Rendimiento (%)	ELISA inhibición (IgE) μ g 50% inh.	Lowry-Biuret μ g prot./mg	UV-visible 1 mg/ml	Potencia HEPL/mg
Natural	4.07	0.031	219.7	3.073 (266 nm) 1.492 (342 nm)	281
Despigmentado pH2	82.7	0.018	197.9	2.680 (270 nm) 1,393 (342 nm)	397
Despigmentado pH3	79.5	0.015	228.6	2.943 (270 nm) 1,519 (346 nm)	430
Despigmentado pH4	83.5	0.017	213.5	2.769 (270 nm) 1,463 (348 nm)	534
Despigmentado pH5	79.9	0.012	245.4	2.658 (272 nm) 1,504 (344 nm)	1007
Despigmentado pH6	87.3	0.001	216.2	2.763 (272 nm) 1,539 (344 nm)	954

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

15 El extracto alergénico de ácaros fue obtenido siguiendo las etapas de método B y C a partir de un cultivo de crecimiento completo de *Dermatophagoides pteronyssinus*.

El producto final consiste de un extracto despigmentado liofilizado para ser almacenado a 4°C en condiciones de liofilización. El producto resultante tiene que satisfacer las siguientes especificaciones:

- a. Producto soluble en agua.

- b. Perfil de proteína similar al extracto natural, determinado por SDS-PAGE y 2-D.
- c. Perfil alergénico similar al extracto natural, determinado por inmunotransferencia
- d. Contenido de proteína similar al extracto natural
- e. Contenido de alérgeno principal similar al extracto natural
- 5 f. Actividad biológica similar al extracto natural

Contenido de alérgeno principal

El contenido de alérgeno principal (Der p 1 y Der p 2) se mide utilizando los kits Indoor Biotech en *D. pteronyssinus*. Los anticuerpos IgG monoclonales anti Der p 1 y/o anti Der p 2 fueron recubiertos (1:1000 desde el vial preparado a 1 mg/ml para Der p 1 y 2 mg/ml para Der p 2 en pozos de microtitulación de poliestireno (NUNC Maxisorp). La curva estándar se prepara usando un estándar universal cuantificado y estandarizado (subestandarizado contra el WHO/IUIS *D. pteronyssinus* referencia que contiene 2500 ng/ml de Der p 1 y 1000 ng/ml de Der p 2). Las diluciones para la curva de 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 son diluidas rutinariamente dos veces. Después de lavar la placa, se agregan 100 µl de estándar de alérgeno diluido y las muestras se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar la placa, se agregan 100 µl de anticuerpo secundario (anticuerpo IgG monoclonal biotinilado) diluido 1/1000 y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar la placa, se agregan 100 µl de estreptavidina-peroxidasa diluida 1/1000 y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente la placa es lavada, desarrollada agregando 100 µl de ABTS 1 mM en regulador de citrato fosfato 70 mM, pH 4.2 que contiene una dilución 1/1000 de H₂O₂ al 30% (esto es, 10 µl/10 ml de ABTS) y se lee cuando la densidad óptica a 405 nm alcance 2.0-2.4

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

<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Rendimiento (%)	ELISA inh. (IgE) µg inh. 50%	Lowry-Biuret µg prot./mg	UV/visible 1 mg/ml	Potencia HEPL/mg	µgDerp 1/mg liofilizado	µgDerp 2/mg liofilizado
Natural	4.59	0.161	251.7	1,909 (276 nm)	327	8.49	7.98
Despigmentado pH2	34.7	0.268	238.1	1,851 (276 nm)	339	0.37	14.62
Despigmentado pH2	63.7	0.136	257.8	2,057 (276 nm)	555	8.96	12.18
Despigmentado pH2	67.6	0.110	271.4	2,188 (276 nm)	873	13.32	10.92
Despigmentado pH2	79.1	0.127	265.5	2,122 (276nm)	1221	14.10	8.40
Despigmentado pH2	81.1	0.116	307.9	2,133 (276 nm)	1705	13.20	8.55

Ejemplo 6-Extracto de alérgeno de ambrosía (*Phragmites communis*)

El polen de *Phragmites communis* recolectado de la planta después de la polinización es desengrasado con acetona fría en una proporción de 1:4 (p/v) bajo condiciones de agitación durante 3 horas a 3-5°C. La solución resultante fue filtrada en un embudo Buchner y lavada al menos 3 veces con acetona fresca. Después de terminar el proceso, el extracto desengrasado fue recolectado y secado a temperatura ambiente bajo una cabina de flujo laminar durante 12 horas, hasta que el material estuvo totalmente seco y toda la acetona había sido removida.

El extracto de alérgeno de *Phragmites* despigmentado polimerizado fue obtenido de acuerdo con las etapas de método B-D. 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.

El producto final consiste de un extracto despigmentado y polimerizado de *Phragmites* liofilizado, para ser almacenado a 4°C en condiciones de liofilización. El producto resultante tuvo que satisfacer las siguientes especificaciones:

a. Producto soluble en agua.

b. Ausencia de alérgenos/proteínas no polimerizados con un peso molecular inferior a 100 kDa (identificados como bandas por SDS-PAGE en condiciones no reductoras).

c. Ausencia de bandas de reconocimiento de IgE con un peso molecular inferior a 100 kDa (identificadas por inmunotransferencia en condiciones no reductoras)

d. Ausencia de moléculas polimerizadas en un peso molecular inferior a 100 kDa (determinadas por cromatografía por exclusión por tamaño con HPLC)

e. Reducción de grupos amino libres (75%) con respecto al extracto natural (determinada por el método fluram)

f. Reducción significativa de la potencia biológica con respecto al extracto natural (determinada por experimentos de inhibición de IgE por ELISA utilizando un conjunto específico de sueros de individuos sensibilizados)

g. Ausencia de toxicidad anormal en ratones

La pella que comprende el residuo despigmentado/polimerizado fue utilizada como control en la caracterización de los extractos natural, despigmentado y despigmentado/polimerizado (refiérase a Tablas 7a y 7b).

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

<i>Phragmites communis</i>	Rendimiento (pella)	ELISA inh.(IgE) 50% Inhibición (µg) (% pérdida de potencia)	Contenido de proteína µg prot./mg	Fluram ACA/mg µg (% de reducción grupos amino)	UV/visible 1 mg/ml Absorbancia (nm)
Natural		0.486	240.7	145	1.074 (272 nm)
Despigmentado		0.847	321.5	103	0.844 (274 nm)
Despigmentado-polimerizado (0.009)	80.7 (2.74)	2.051	329.8	3.6 (95.7)	1.891 (266 nm)
Despigmentado-polimerizado (0.045)	80.7 (3.1)	1.217	381.4	6.3 (95.7)	1.897 (268 nm)
Despigmentado-polimerizado (0.015)	64.8 (4.75)	5.080	306.2	1.6 (98.9)	2.206 (268 nm)
Despigmentado-polimerizado (0.02)	25.2 (2.5)	5.035	306.1	24.3 (83.2)	1.749 (266 nm)

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

<i>Phragmites communis</i>	SDS-PAGE (kDa)	Inmunotransferencia (kDa)	Tamaño molecular (kDa)
Natural	10-100	10-100	10-100
Despigmentado	10-100	10-100	10-100
Despigmentado-polimerizado (0.009)	> 100	Ausente	> 100
Despigmentado-polimerizado (0.0045)	> 100	Ausente	> 100
Despigmentado-polimerizado (0.015)	> 100	Ausente	> 100
Despigmentado-polimerizado (0.02)	> 100	Ausente	> 100

Ejemplo 7-Extracto de alérgeno epitelial de gato

El pelo de gato es desengrasado con acetona fría en una proporción de 1:40 (p/v) después de 5 minutos de agitación cada hora durante 7 horas a 3-5°C. El desengrasado continúa durante al menos 16 horas sin agitación. La solución resultante fue filtrada en un embudo Buchner y se conservaron las hojuelas. El pelo de gato se desengrasa de nuevo con la misma acetona durante 1 hora a temperatura ambiente y se repitió dos veces. Las hojuelas obtenidas fueron recolectadas y secadas a temperatura ambiente bajo una cabina de flujo laminar durante 15 horas, hasta que el material estuvo completamente seco y toda la acetona había sido removida.

En la etapa B el material en hojuelas de piel desengrasada seco obtenido del pelo de gato se pesa y extrae el PBS 0.01 M/NaCl 0.15 M en una proporción de 1:40 durante 4 horas a 3-5°C y bajo agitación magnética.

El extracto alérgico de gato despigmentado polimerizado fue obtenido de acuerdo con las etapas de método B-D.

El producto final consiste de un extracto epitelial de gato despigmentado y polimerizado liofilizado, para ser almacenado a 4°C en condiciones de liofilización. El producto resultante tiene que satisfacer las siguientes especificaciones:

a. Producto soluble en agua.

b. Reducción de los grupos amino libres (75%) con respecto al extracto natural (determinada por el método fluram)

c. Reducción significativa de la potencia biológica con respecto al extracto natural (determinada por experimentos de competición de IgE REINA utilizando un conjunto específico de sueros de individuos sensibilizados).

d. Detección del alérgeno principal Fel d 1. Anticuerpos monoclonales

e. Ausencia de toxicidad anormal en ratones.

Contenido de alérgeno principal

El contenido del alérgeno principal Fel d 1 se mide utilizando el kit Indoor Biotech. El anticuerpo IgG1 monoclonal anti Amb a 1 es recubierto (1:1000 desde el vial preparado a 1 mg/ml). La curva estándar se prepara utilizando un Universal Allergen Standar que contiene 1000 ng Fel d 1/ml. El anticuerpo secundario consiste de un anticuerpo biotinilado del anticuerpo IgG1 monoclonal levantado contra alérgenos de gato epiteliales. Las muestras naturales y despigmentadas son diluidas a 250 ng/ml. El contenido de alérgeno principal se calcula en extractos polimerizados utilizando estos valores.

La pella que comprende el residuo despigmentado/polimerizado fue utilizada como control en la caracterización de los extractos natural, despigmentado y despigmentado/polimerizado (refiérase a Tabla 8).

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

Epitelio de gato	Rendimiento (%)	ELISA inh. (IgE) 50% inhibición (µg) (% baja potencia)	Contenido de proteína µg prot./mg	Fluram µg ACA/mg (% reducción grupos amino)	UV/visible 1 mg/ml Absorbancia (nm)	Potencia (HEPL/mg)	Fel d 1 µg/ml
Natural	10.3	0.029	154	14	0.396 (280 nm)	1488	42
Despigmentado	85.9	0.044	195	10.4	0.428 (280 nm)	1478	42
Despigmentado-polimerizado (0.009)	96.2	0.192	171	1.5 (89%)	0.701 (268 nm)	28	8
Despigmentado-polimerizado (0.013)	92.9	0.373	183	1.3 (90.6%)	0.698 (268 nm)	23	7
Despigmentado-polimerizado (0.02)	90.6	0.494	169	1.2 (91.5%)	0.769 (268 nm)	17	2

Ejemplo 8-Extracto alergénico de *Phleum pratense*

5 El polen de *Phleum pratense* recolectado de la planta después de la polinización fue desengrasado con acetona fría en una proporción de 1:4 (p/v) bajo agitación continua durante 3 horas a 3-5°C. La solución resultante fue filtrada en un embudo Buchner y lavada al menos 3 veces con acetona fresca. Después de terminar el proceso, el extracto de cacahuete desengrasado fue recolectado y secado a temperatura ambiente bajo una cabina de flujo laminar durante 12 horas, hasta que el material estuvo totalmente seco y toda la acetona había sido removida.

El extracto alergénico de *Phleum pratense* despigmentado polimerizado fue obtenido de acuerdo con las etapas de método B-D.

10 En la etapa D el proceso de polimerización consiste de la adición de glutaraldehído utilizando un factor de 0.009 ml de glutaraldehído/ml de extracto.

El producto final consiste de un extracto de *Phleum pratense* despigmentado y polimerizado liofilizado, para ser almacenado a 4°C en condiciones de liofilización. El producto resultante tiene que satisfacer las siguientes especificaciones:

- a. Producto soluble en agua.
- 15 b. Ausencia de alérgenos/proteína no polimerizados con un peso molecular inferior a 100 kDa (identificados como bandas por SDS-PAGE en condiciones no reductoras).
- c. Ausencia de bandas de reconocimiento de IgE con peso molecular inferior a 100 kDa (identificadas por inmunotransferencia en condiciones no reductoras)
- 20 d. Ausencia de moléculas polimerizadas en un peso molecular inferior a 100 kDa (determinadas por cromatografía por exclusión por tamaño con HPLC)
- e. Reducción de los grupos amino libres (75%) con respecto al extracto natural (determinado por el método fluram)
- f. Reducción significativa de la potencia biológica con respecto al extracto natural (determinada por experimentos de inhibición de IgE por ELISA utilizando un conjunto específico de sueros de individuos sensibilizados)

g. Ausencia de toxicidad anormal en ratones

Contenido de alérgeno principal

5 El contenido del alérgeno principal Phl p 5 se mide utilizando el kit Indoor Biotech. El anticuerpo IgG1 monoclonal anti Phl p 5 es recubierto (1:1000 desde el vial preparado a 2 mg/ml). La curva estándar se prepara utilizando un Phl p 5a recombinante. El anticuerpo secundario consiste de un anticuerpo biotinilado del anticuerpo IgG1 monoclonal contra el alérgeno *Phleum pratense*. Las muestras naturales y despigmentadas son diluidas a 250 ng/ml. El contenido de alérgeno principal se calcula en extractos polimerizados utilizando estos valores.

La pella que comprende el residuo despigmentado/polimerizado fue utilizado como control en la caracterización de los extractos natural, despigmentado y despigmentado/polimerizado (refiérase a Tabla 9).

10 Tabla 9-Resumen de resultados obtenidos para el Ejemplo 8 (*Phleum pratense*)

<i>Phleum pratense</i>	Rendimiento (%)	ELISA inh.(IgE) 50% inhibición (µg) (%) potencia perdida)	Contenido de proteína µg Prot./mg	Potencia (HEPL/mg)	SDS-PAGE kDa	Inmunotransferencia	Tamaño molecular. kDa
Natural	8.42	0.089	409.9	904.5	10-100	1478	10-100
Despigmentado-polimerizado (0.009)	45.0	0.341	446.0	35.3	10-100	28	10-100
Despigmentado-polimerizado (0.009)	98.0	0.305	464.3	13.2	>100	Ausente	>100
Despigmentado-polimerizado (0.013)	19.85	0.429	420.5	19.3	>100	Ausente	>100
Despigmentado-polimerizado (0.02)	57.5	1.274	1234.8	14.4	>100	Ausente	>100

Referencias de la literatura

1. Vickery, B., Burks, W. *Immunotherapy in the treatment of food allergy: focus oral tolerance*. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2009; 9:364-370.
- 15 2. King, R.M., Knibb, R.C., and 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-Moncin 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):1073-9.
- 20 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):876-83.

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.* 2009 May 26.
 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.* 2009 Aug; 124(2):292-300, 300.
 7. Clark, A.T., Islam, S., King, Y. Successful oral tolerance induction in severe peanut allergy. *Allergy* 2009 Aug; 64(8):1218-20.
 8. Wallace DV. Pet dander and perennial allergic rhinitis: therapeutic options. *Allergy Asthma Proc.* 2009 Nov-Dec; 30(6):573-83.
 - 10 9. Ling M, Long AA Pet dander and difficult-to-control asthma: Therapeutic options. *Allergy Asthma Proc.* 2010 Sep; 31(5):385-91.
 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):265-74. Epub 2009 Oct 22. Review.
- Referencias en sitios de la red
- 15 1. Allergen nomenclature. International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-Committee. Última actualización de lista 21 de Julio de 2009.

Cacahuete	Lote	Glutaraldehído factor de concentración	Rendimiento en polímero % de residuo total %	Rendimiento % de residuo 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
Depigoid	250808/LP	4,5 mg/ml 0,009 (manual)	45	12.96	57.96	Sí	Sí	Sí				
Depigoid	260808/LP	15 mg/ml 0,03 (manual)	7	5.85	12.85	Sí	Sí	Sí				
Depigoid	270808/LP	50 mg/ml 0,1 (100 µl/min)	8.6	49.85	58.45	Sí	Sí	Sí				
Depigoid	020908/LP	4,5 mg/ml 0,009 (100)	41.8	11.4	53.2	Sí	Sí	Sí				
Depigoid	030908/LP	4,5 mg/ml 0,009 (10)	41.3	24.3	65.6	Sí	Sí	Sí				
Depigoid	030908/LP	4,5 mg/ml 0,009 (3 µl/min)	33.8	28.6	62.4	Sí	Sí	Sí				
Depigoid	230908/LP	10 mg/ml 0,02 (133)	14.3	41.13	55.43	Sí	No	Sí				
Depigoid	240908/LP	10 mg/ml 0,02 (20 µl/min)	12.83	42.15	54.98	Sí	No	Sí				
Depigoid	250908/LP	10 mg/ml 0,02 (6,6 µl/min)	*	44	*	Sí	*	Sí				
Depigoid	300908/LP	2,25 mg/ml 0,0045 (100)	52.65	12	64.65	Sí	Sí	Sí				
Depigoid	030309/LP	10 mg/ml 0,02 (100 µl/min)	9.1	46.3	55.4	Sí	No	Sí	Sí	No	No	No
Depigoid	030309/LP	10 mg/ml 0,02 (100 µl/min)	9.1	46.3	55.4	Sí	No	Sí	Sí	No	No	No

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

- Se perdió el polímero

REIVINDICACIONES

1. Un extracto de alérgeno polimerizado despigmentado seleccionado de cacahuete, polen de *Phleum pratense* y epitelio de gato capaz de reducir significativamente la potencia biológica de IgE reduciendo la capacidad de enlazamiento a IgE con respecto al extracto natural determinado por inhibición por ELISA de IgE o competición de inmunoensayo de enzima reversa (REINA), y retener la capacidad inmunogénica, en donde la inhibición por ELISA de IgE o la competición REINA se realiza usando un conjunto de sueros a partir de individuos sensibilizados.
2. Un extracto alérgico polimerizado despigmentado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el extracto alérgico es cacahuete.
3. Un extracto alérgico polimerizado despigmentado de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el extracto alérgico es capaz de reducir la potencia biológica en al menos un 95% con respecto al extracto natural determinado por inhibición de IgE ELISA.
4. Un extracto alérgico polimerizado despigmentado de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado además por las siguientes propiedades fisicoquímicas y biológicas:
 - a) soluble en agua,
 - b) ausencia de alérgenos/proteínas no polimerizados con un peso molecular inferior a 100 kDa,
 - c) ausencia de bandas de reconocimiento de IgE con un peso molecular inferior a 100 kDa,
 - d) ausencia de moléculas polimerizadas con un peso molecular inferior a 100 kDa,
 - e) 75% de reducción de los grupos amino libres con respecto al extracto natural,
 - g) ausencia de toxicidad anormal en ratones.
5. Un extracto alérgico polimerizado despigmentado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el extracto alérgico es *Phleum pratense*.
6. Un extracto alérgico polimerizado despigmentado de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado además por las siguientes propiedades fisicoquímicas y biológicas:
 - a) soluble en agua,
 - b) ausencia de alérgenos/proteínas no polimerizados con un peso molecular inferior a 100 kDa,
 - c) ausencia de bandas de reconocimiento de IgE con un peso molecular inferior a 100 kDa,
 - d) ausencia de moléculas polimerizadas con un peso molecular inferior a 100 kDa,
 - e) 75% de reducción de los grupos amino libres con respecto al extracto natural,
 - f) ausencia de toxicidad anormal en ratones.
7. Un extracto alérgico polimerizado despigmentado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el extracto alérgico es epitelio de gato.
8. Un extracto alérgico polimerizado despigmentado de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado además por las siguientes propiedades fisicoquímicas y biológicas:
 - a) soluble en agua
 - b) 75% de reducción de los grupos amino libres con respecto al extracto natural,
 - c) detección del alérgeno principal Fel d 1,
 - d) ausencia de toxicidad anormal en ratones.

9. Un extracto alérgico polimerizado despigmentado de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para uso en el tratamiento de alergia.
10. Una composición farmacéutica que comprende un extracto alérgico polimerizado despigmentado de acuerdo con las reivindicaciones 1-8.
- 5 11. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 que comprende además uno o más adyuvantes, diluyentes, conservantes o mezclas de los mismos.
12. Una vacuna que comprende un extracto alérgico polimerizado despigmentado de acuerdo con las reivindicaciones 1-8.
- 10 13. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 12 que comprende adicionalmente uno o más adyuvantes, diluyentes, conservantes o mezclas de los mismos.

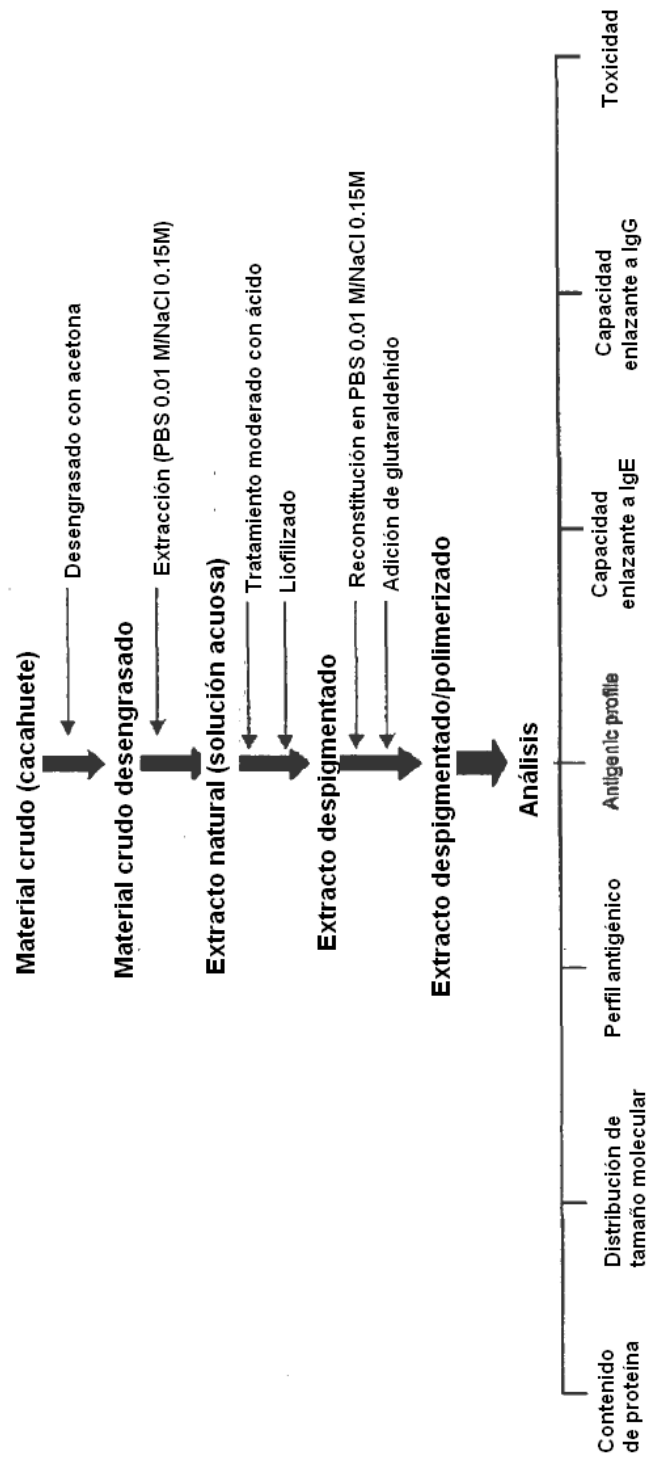


Figura 1

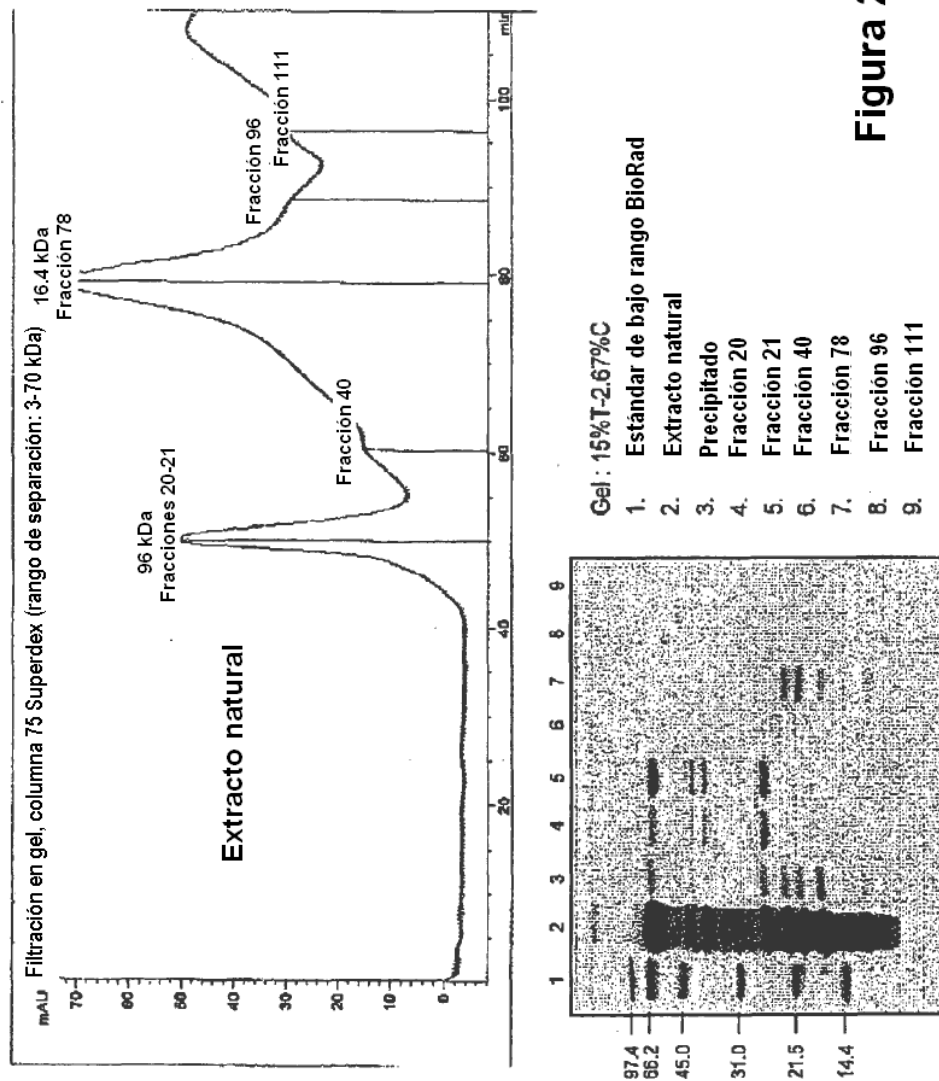


Figura 2

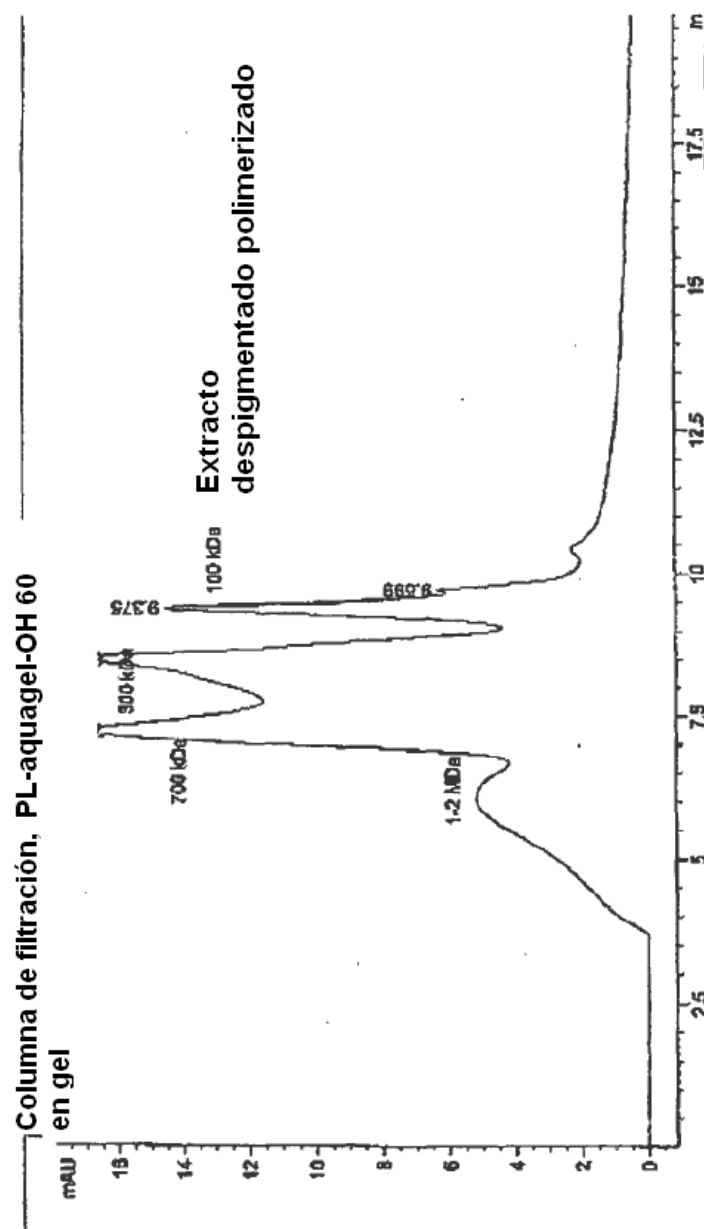
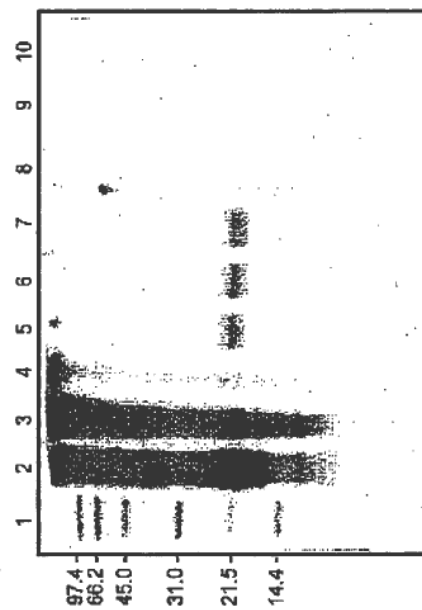
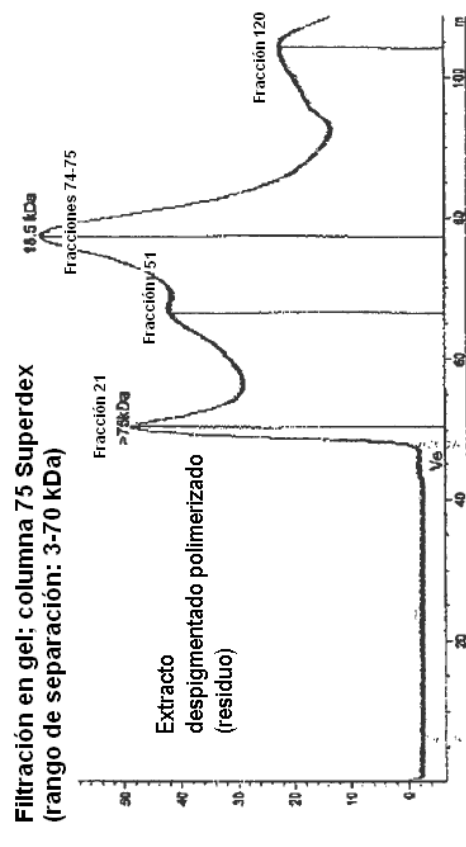


Figura 3



Gel: 15%T-2.67%C

1. Estándar de bajo rango BioRad
2. Extracto despigmentado polimerizado (residuo)
3. Precipitado
4. Fracción 21
5. Fracción 51
6. Fracción 74
7. Fracción 75
8. Fracción 120

Figura 4

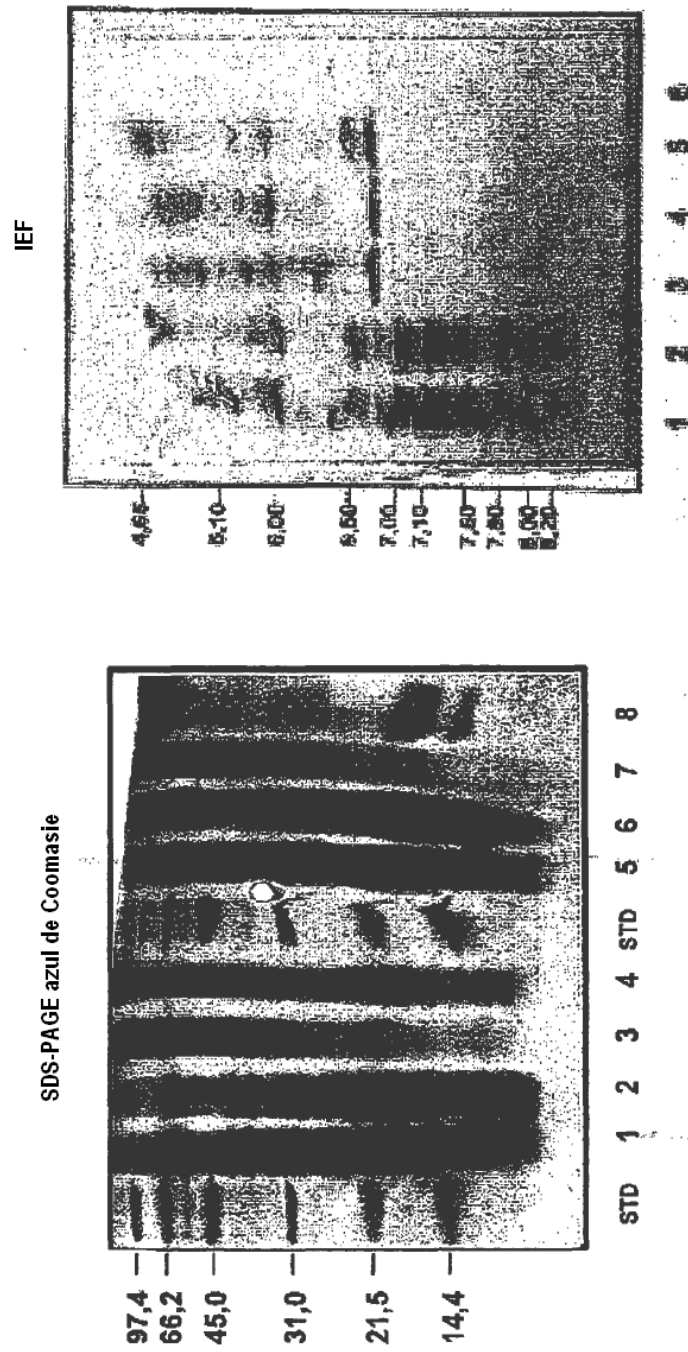


FIGURA 6

FIGURA 5

Inhibición de IgE WB

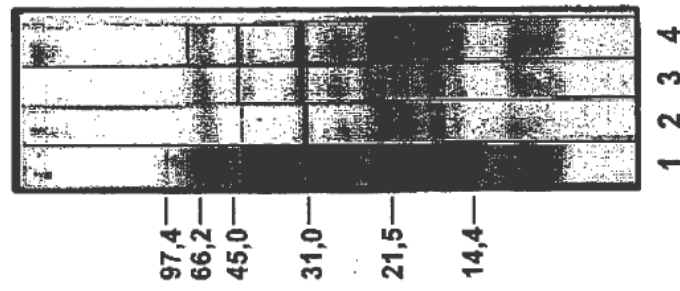


Figura 8

Condiciones reductoras Condiciones no reductoras

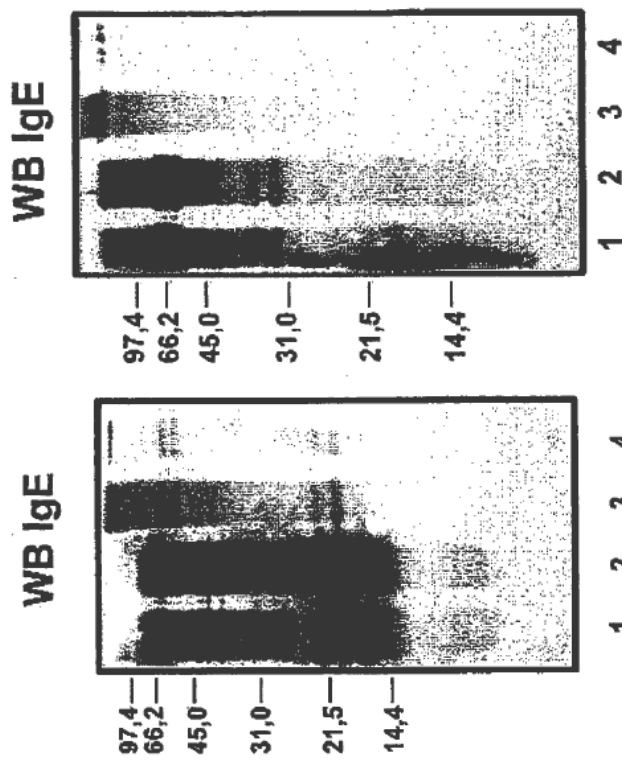


Figura 7a

Figura 7b

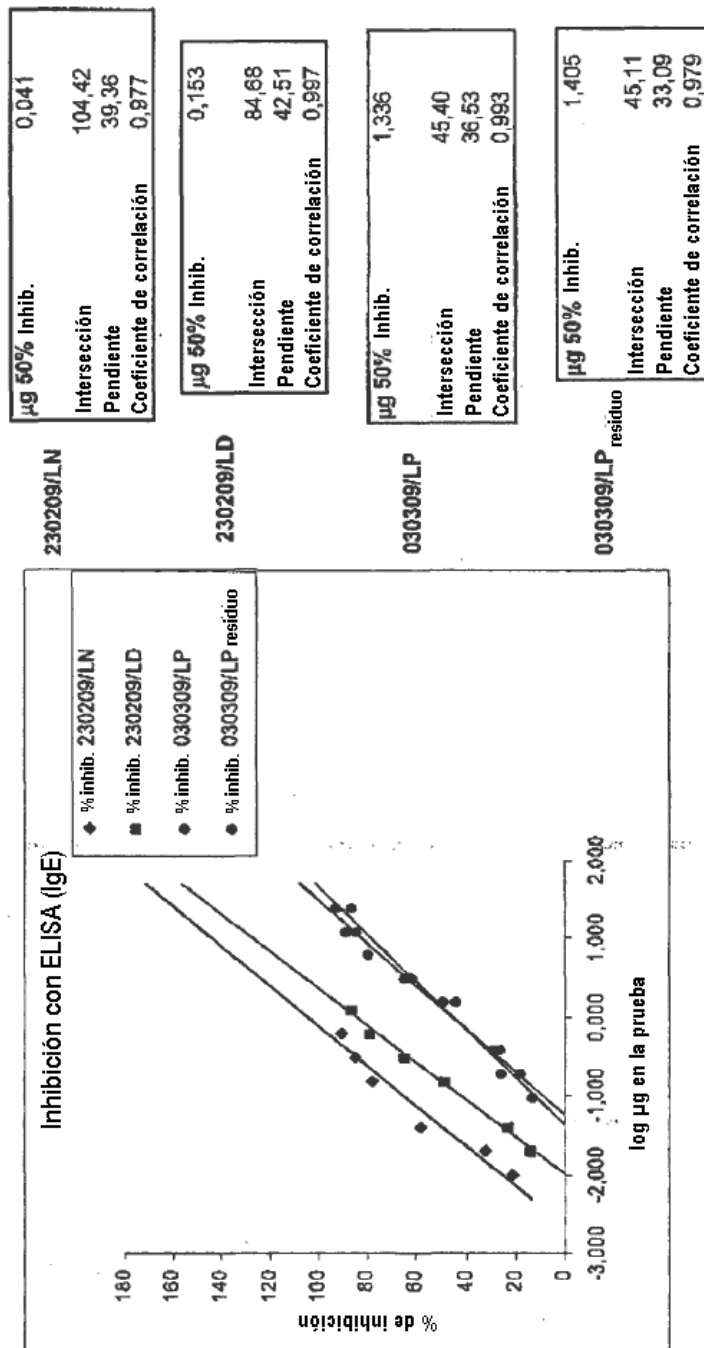


Figura 9