



Los extractos como fármacos

J. Carnés

Introducción

Los primeros casos de administración de dosis progresivamente crecientes de un alérgeno con el objetivo de modificar la respuesta inmunológica y clínica al mencionado alérgeno, y, por consiguiente, mejorar la enfermedad alérgica, datan de principios del siglo xx. Noon y Freeman, en 1911, en el St. Mary's Hospital de Londres (figura 1), trataron por primera vez a pacientes que padecían fiebre del heno (lo que actualmente se conoce como rinitis alérgica estacional y/o perenne), con inyecciones progresivas de polen. Para ello, prepararon un extracto basado en una unidad de peso del polen, según la cual una «unidad Noon» equivalía a la cantidad de sustancia activa que se podía extraer a partir de un microgramo de polen fresco.

Desde entonces, aunque el principio básico se ha mantenido durante todos estos años, la fabricación de extractos alérgicos ha sufrido sensibles cambios, especialmente en lo que se refiere a los métodos de purificación, las formas de presentación y los excipientes con los que aquéllos van mezclados. Sin embargo, si algo hay que destacar, es la evolución de los mecanismos de estandarización, encaminados a conseguir extractos reproducibles y consistentes en el tiempo. En este sentido, la estandarización ha pasado por diferentes fases, y ha dejado de ser un valor calculado en función de la cantidad de polen utilizada para pasar a ser un valor que incorpora resultados de ensayos *in vivo* e *in vitro*, los cuales tratan de reproducir o simular los mecanismos que los extractos alérgicos son capaces de producir en el organismo (véase el apartado «Estandarización de extractos alérgicos»).



Figura 1. El St. Mary's Hospital está localizado en el barrio londinense de Paddington. Fue fundado en 1845, y tuvo su propia escuela de Medicina hasta que, en 1988, se transformó en el actual Imperial College de Londres. Investigadores de la talla del premio Nóbel Alexander Fleming, descubridor de la penicilina, Augustus Waller, inventor del electrocardiograma, o Rodney Porter, galardonado con el premio Nóbel por sus estudios sobre la estructura de los anticuerpos, desarrollaron sus estudios en sus instalaciones. En la actualidad, el St. Mary's Hospital continúa siendo el centro de innovaciones médicas, pues forma parte de la Academia de Ciencias de la Salud del Reino Unido, y está considerado como uno de los centros más prestigiosos de investigación e innovación científica del mundo

Extractos alérgicos. El principio activo

Los extractos alérgicos son mezclas heterogéneas de compuestos biológicos (entre los que se incluyen proteínas y glicoproteínas, lípidos, ácidos nucleicos, etc.) obtenidos a partir de fuentes naturales de alérgenos (figuras 2 y 3) (véase el apartado «Fuentes de alérgenos. La materia prima»).

Según la normativa europea, se consideran productos alérgicos todos aquellos derivados de extractos alérgicos nativos, alergoides, productos conjugados de alérgenos con otras sustancias, o productos alérgicos fabricados mediante la tecnología del ADN recombinante (esto es, por clonado de alérgenos y obtención de formas recombinantes). Sin embargo, quedan excluidos de la clasificación de productos alérgicos aquellos que no cumplen la definición de extracto alérgico, como serían los péptidos sintéticos de alérgenos, las construcciones de ADN, o los agentes alérgicos de bajo peso molecular.

Por tanto, la unidad básica del extracto alérgico es el alérgeno, que actúa como principio activo de los productos alérgicos.



Según la normativa de productos alergénicos, actualmente en revisión (<http://www.emea.europa.eu/hums/human/humanguidelines/biologicals.htm>), éstos pueden dividirse en dos categorías diferentes:

- Los producidos industrialmente para el tratamiento de una población, que contienen un único alérgeno o una mezcla de éstos, y que van a emplearse para el diagnóstico o el tratamiento (vacuna alergénica).
- Los preparados individualmente para un solo individuo, que van a llevar el nombre del paciente al que van dirigidos.

Estabilidad de los extractos alergénicos

La semivida de los extractos alergénicos puede variar de forma significativa dependiendo de la formulación, la composición, la dilución o las condiciones de almacenamiento de éstos¹. Otro factor importante es la forma en que son almacenados, esto es, como extractos alergénicos individuales, o como mezclas de varios extractos de alérgenos². Las mezclas de varios extractos alergénicos, ya sea para su extracción, su procesamiento o su almacenamiento como producto de origen, suelen presentar mayor degradación debido a las propiedades enzimáticas de muchos extractos. Y se ha comprobado que este fenómeno es tanto mayor cuanto más alejados se encuentran los extractos en la escala taxonómica.

Estudios realizados con diferentes extractos alergénicos han puesto de manifiesto que, en general, los productos en estado acuoso (véase el apartado «Vacunas acuosas») presentan una reducción de la potencia (véase el apartado «Estandarización en función de la actividad biológica») significativa después de varias semanas de almacenamiento a temperaturas de entre 20 y 25 °C. Esta pérdida es muy considerable cuando el almacenamiento tiene lugar entre 30 y 35 °C. Para minimizar este efecto, lo más recomendable es mantenerlos a temperaturas de 5 ± 3 °C, pero nunca congelados, puesto que los procesos de congelación y descongelación de extractos proteicos de cualquier naturaleza producen la desnaturalización y rotura de las proteínas presentes, lo que puede afectar a la calidad final del producto.

Por último, el empleo de sustancias estabilizantes o protectoras mejora considerablemente las condiciones de los extractos. El uso de productos glicerinados prolonga de manera importante la semivida de los extractos, protegiendo los alérgenos de los efectos de degradación. Los extractos diluidos pierden potencia de forma más rápida que los concentrados, en muchos casos debido a que existe una adsorción de los componentes en la superficie de los viales. Esto puede evitarse con el empleo de determinados agentes, como la albúmina humana o el Tween, que actúan reduciendo la adsorción de las proteínas.

El principio activo. El alérgeno

Los alérgenos se definen como proteínas capaces de inducir una reacción alérgica mediada por IgE (figura 4). Entre sus características más significativas, destacan:

- No son sustancias intrínsecamente tóxicas, y generalmente son inocuas en ausencia de una reacción alérgica.
- La mayoría son proteínas o glicoproteínas extracelulares de tamaño variable, cuyos límites se establecen por encima de los 3 kD (el tamaño necesario para que una proteína sea inmunogénica), hasta los 80 o 90 kD de las moléculas de alto peso molecular; dicho tamaño debe permitirles atravesar la membrana de la mucosa³.
- La mayoría son altamente solubles en agua.
- En general, poseen un punto isoeléctrico ácido.
- Son capaces de producir una respuesta inmunológica mediada por IgE.



Figura 2. Según la Farmacopea Española (3.ª edición), los productos alergénicos son preparaciones farmacéuticas obtenidas de extractos de materias primas de origen natural que contienen alérgenos



Figura 3. Según la Farmacopea Europea, los extractos alergénicos son una mezcla compleja de componentes, que contiene todos los alérgenos (link a Principio activo. Alérgeno) potenciales presentes en la materia prima alergénica

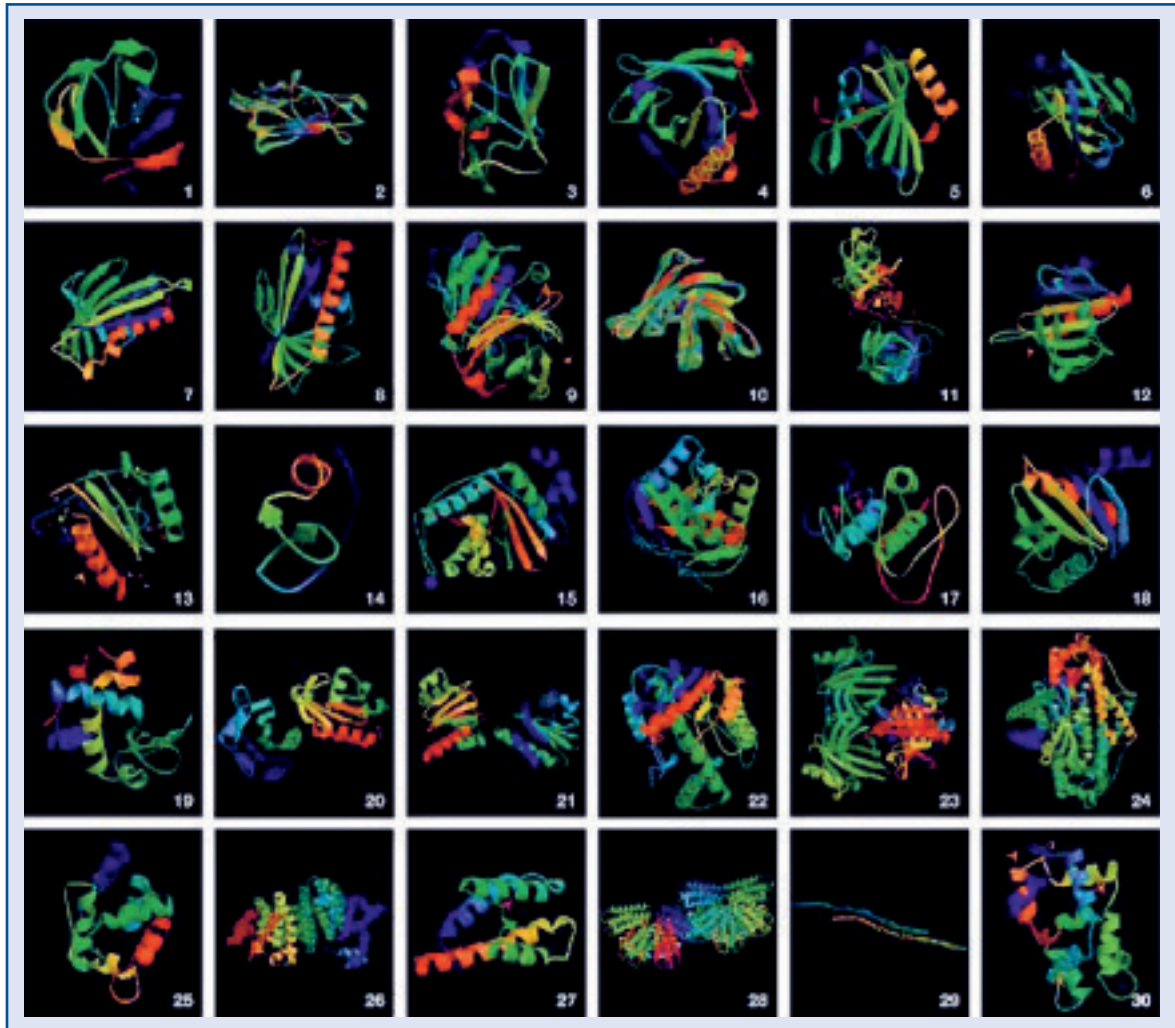


Figura 4. Estructura de los diferentes alérgenos. (Obtenido de: <http://www.nature.com/embor/journal/v5/n8/images/7400204-f1.jpg>)

En la estructura de los alérgenos, existen pequeñas secuencias de polipéptidos, de entre 8 y 15 aminoácidos, conocidas como determinantes antigénicos o epítomos, que son responsables de la unión de la IgE específica. El número de epítomos, así como su longitud y conformación (esto es, su estructura lineal o conformacional en el espacio), son muy variables dentro de cada alérgeno. Los epítomos son igualmente responsables de la reactividad cruzada entre alérgenos de diferente naturaleza, puesto que la IgE reconocerá una secuencia determinada de aminoácidos, independientemente del alérgeno donde esta última se encuentre (figura 5).

No todos los alérgenos son reconocidos con la misma frecuencia ni con igual intensidad por los individuos sensibilizados. Para distinguir estas variaciones se introdujeron los términos «alérgeno principal (o mayor)» y «alérgeno minoritario». Esta clasificación está basada en la presencia de IgE o en la positividad de pruebas cutáneas en pacientes sensibilizados frente a un extracto⁴. Se estima que el número de alérgenos mayores presentes en un extracto alérgénico puede oscilar entre uno y cinco.

A pesar de que el conocimiento sobre las características de los alérgenos ha avanzado en los últimos años, no se ha esclarecido todavía por qué determinadas moléculas o proteínas son capaces de unir IgE. Se han formulado diferentes hipótesis para explicar aquello que hace que una proteína sea alergénica, pero, hasta el momento, todas ellas solamente engloban a un grupo de alérgenos, ya sea según su estructura⁵, su función biológica o sus características intrínsecas, sin ningún nexo común entre ellos⁶. Furmonaviciene y Shakib⁷ sugirieron que la homología de determinadas secuencias de aminoácidos en los alérgenos, como resultado de



una evolución convergente y una estructura tridimensional similar, podría ser una característica común de estas sustancias. Hasta el momento, se han establecido ciertas características comunes entre estas moléculas. La resistencia a la proteólisis, especialmente en alérgenos alimentarios, parece ser una característica común a casi todos ellos. La presencia de glúcidos unidos a la proteína parece que contribuye también, de manera importante, a la alergenicidad. Incluso, se ha demostrado una respuesta alérgica frente a residuos glucídicos de las proteínas⁸. Por último, la función biológica de las proteínas, especialmente su actividad enzimática proteolítica⁹, está considerada como una de las responsables de la respuesta inmunológica tipo 2, especialmente a ácaros y hongos. En la actualidad, se conocen muchas de las funciones biológicas de los alérgenos, por lo que se tiende a encuadrarlos en grupos según la actividad biológica que presentan (www.allergen.org y www.allergome.com). En las tablas 1, 2 y 3 se recoge la actividad biológica de los alérgenos más representativos, así como su clasificación en función del grupo al que pertenecen.

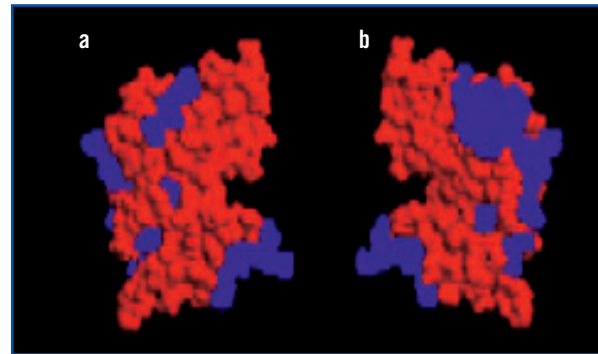


Figura 5. Estructura e identificación de los epítomos del alérgeno Asp f 1 (*Aspergillus fumigatus*), representados en color rojo. Bowyer et al. BMC Genomics. 2006; 7: 251 [DOI: 10.1186/1471-2164-7-251]. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/7/251>

Fuentes de alérgenos. La materia prima

El polen, los hongos, los ácaros o los epitelios no son alérgenos propiamente dichos, sino fuentes emisoras de éstos. Tan sólo algunos componentes de estas fuentes, principalmente proteínas y glicoproteínas, son alérgenos, y son los que intervienen en la respuesta alérgica.

Tabla 1. Descripción de los alérgenos más comunes de pólenes

Desconocido	Amb a 5, Amb a 7, Ole e 4, grupo Bet v 1
Profilina	Amb a 8, Art v 4, Par j 3, grupo 12 de gramíneas, Bet v 2, Cor a 2, Ole a 2
Polcalcina	Amb a 9, Art v 5, Par j 4, Jun a 4, Bet v 3, Bet v 4
Proteína de transferencia de lípidos	Par j 1, Par j 2, Amb a 6, Art v 3, Ole e 7
Pectatoliasa	Amb a 1, Amb a 2, Art v 2, Art v 6, Cup a 1, Cup s 1, Jun a 1
Poligalacturonasa	Jun a 2, Pla a 1
Taumatina	Jun a 3, Cup s 3
Glucanasa	Ole e 9
Superóxido dismutasa	Ole e 5
Expansina	Grupos 1 y 2 de gramíneas
Ciclofilina	Bet v 7

Tabla 2. Descripción de los alérgenos más comunes de ácaros

Desconocido	Grupo 2, grupo 7, grupo 22
Cisteinproteasa	Grupo 1
Serinproteasa: tripsina	Grupo 3
Serinproteasa: quimiotripsina	Grupo 6
Tropomiosina	Grupo 10
Paramiosina	Grupo 11
Quitinasa	Grupo 15
Amilasa	Grupo 4



Tabla 3. Descripción de los alérgenos más comunes de hongos

Desconocido	Alt a 1, Cla h 2, Asp f 2, Asp f 4, Asp f 9, Asp f 15, Asp f 16, Asp f 19
Proteínas de choque térmico	Alt a 3, Asp f 12, Pen c 19
Disulfuro isomerasa	Alt a 4
Proteína ribosomal P2	Alt a 5, Cla h 5, Asp f 8, Fus c 1
Enolasas	Alt a 6, Cla h 6, Cur l 2, Asp f 12, Pen c 22
Proteína YCP4	Alt a 7, Cla h 7
Manitol deshidrogenasa	Alt a 8, Cla h 8
Aldehído deshidrogenasa	Alt a 10, Cla h 10
Proteína ribosomal ácida P1	Alt a 12, Cla h 12
Glutación transferasa	Alt a 13
Serínproteasa vacuolar	Cla c 9, Cla h 9, Asp f 18, Pen ch 18
Serínproteasa	Cur l 1, Pen ch 13, Pen b 13, Pen c 13, Tri r 4, Epi p 1
Ciclofilina	Asp f 17
Tiorredoxina	Asp f 28, Asp f 29, Fus c 2
Mn-superóxido dismutasa	Asp f 6
Alcohol deshidrogenasa	Cand a 1
Proteína peroxisomal	Cand a 3
Citocromo c	Cur l 3



Pólenes (figura 6)

Casi todos los alérgenos de pólenes son proteínas o glicoproteínas solubles en agua con un rango de peso molecular muy variable, que por lo común oscila desde unos 3-5 kD hasta 70 u 80 kD. Diversos estudios han desvelado que los alérgenos son liberados del grano de polen rápidamente al entrar en contacto con la mucosa¹⁰. El tiempo climático es determinante cuando se habla de niveles de polen en el ambiente, y el viento favorece enormemente su dispersión y su distribución (tabla 1).



Los pólenes de árboles (figura 7) son responsables de un elevado número de sensibilizaciones, pues existen numerosas especies relacionadas con la aparición de rinitis, conjuntivitis alérgica y asma, en función de las latitudes donde se desarrollan. La importancia de una u otra especie dependerá del área geográfica, que va a limitar la presencia o ausencia de un determinado tipo de vegetación.



Las plantas de la familia *Poaceae* (gramíneas) (figura 8) son la mayor fuente de polinosis. Se trata de especies prácticamente cosmopolitas y con pocos requerimientos de crecimiento, lo que favorece el gran número de sensibilizaciones de las que son responsables. La máxima eclosión de estas plantas ocurre durante los meses de mayo y junio, y sus efectos se prolongan hasta julio e incluso

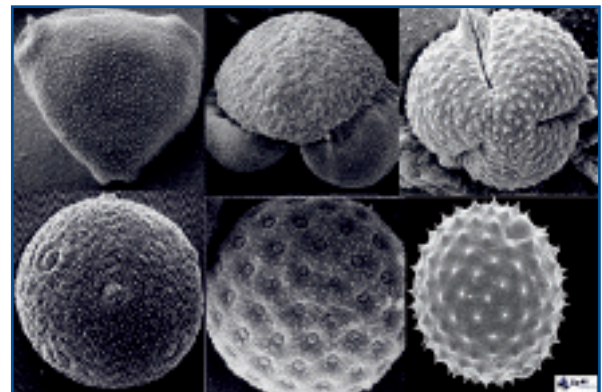


Figura 6. Los pólenes presentan características muy variables en cuanto a tamaño, forma, composición, etc. En la imagen se muestran fotografías al microscopio electrónico de diferentes tipos de pólenes alérgicos

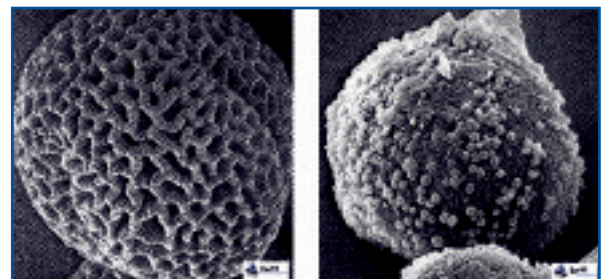


Figura 7. Fotografía de granos de polen de *Olea europaea* (A) y *Cupressus arizonica* (B), vistos al microscopio electrónico



agosto, dependiendo de las condiciones climáticas.



El grupo de las hierbas o malezas engloba a un conjunto de plantas muy heterogéneo, con numerosas familias y especies. Generalmente, se trata de plantas anuales que liberan el polen en una determinada estación del año. En España, los pólenes más prevalentes de este grupo pertenecen a los géneros *Parietaria*, *Salsola*, *Chenopodium*, *Artemisia* y *Plantago*.



El grupo de los árboles engloba una gran variedad de familias y géneros. Al igual que las gramíneas y las hierbas o malezas, se trata de vegetales de polinización estacional, que liberan altas concentraciones de polen durante la floración. Las familias más destacadas en nuestro país son las cupresáceas, las oleáceas y las platanáceas.

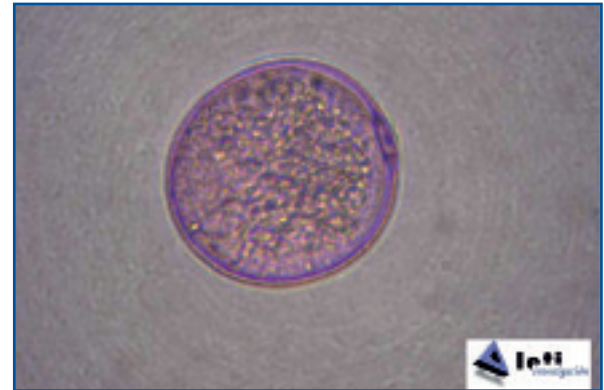


Figura 8. Fotografía de un grano de polen de gramínea visto al microscopio óptico



Ácaros

Los ácaros domésticos, especialmente *Dermatophagoides pteronyssinus* y *D. farinae*, constituyen la fuente principal de alérgenos en el polvo de las casas. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado el papel alergénico de otras especies de ácaros, como *Euroglyphus maynei*, *Blomia tropicalis*, *Lepidoglyphus destructor*, *Aleuroglyphus ovatus*, *Acarus siro* (figura 9), *Glycyphagus domesticus* (figura 10), *Chortoglyphus arcuatus* (figura 11) o *Tyrophagus putrescentiae*. La reactividad cruzada que existe entre las especies es considerablemente elevada¹¹. En un principio, se demostró que la fuente alergénica era el propio cuerpo del ácaro, aunque también se ha podido comprobar que las partículas fecales transportan una elevada concentración de alérgenos (tabla 2).



Hongos

Los hongos son organismos vivos de los que se conocen dos tipos de estructura básica: una celular, como sería el caso de las levaduras, y otra, la más común, integrada por células unidas formando hebras ramificadas, que se conocen con el nombre de hifas. A diferencia de las levaduras, que se reproducen por bipartición o gemación, los hongos que forman hifas, además de multiplicarse por fragmentación de éstas y regeneración de nuevos organismos, se reproducen a través de esporas (sexuadas o asexuadas) de pequeño tamaño (2-6 µm), lo que favorece su dispersión por el aire. Esta facilidad de transporte, unida al alto número de esporas producidas, las convierte en agentes sensibilizantes de excepción (tabla 3). En hongos, se han descrito tres tipos diferentes de antígenos responsables de sensibilización:

- **Antígenos somáticos.** Son intracelulares, y corresponden al contenido citoplasmático del microorganismo, que queda expuesto después de producirse la rotura celular.



Figura 10. *Glycyphagus domesticus*



Figura 11. *Chortoglyphus arcuatus*



Figura 9. *Acarus siro*



- **Antígenos metabólicos.** Proceden de los productos extracelulares obtenidos a partir del filtrado del cultivo en el que se ha desarrollado el hongo.
- **Antígenos hidrosolubles.** Tienen su origen en la superficie de la pared celular fúngica.



Epitelios de mamíferos

Todos los vertebrados pueden ser causantes de procesos de sensibilización, al excretar proteínas o acumularlas en la superficie corporal¹². La tenencia de mascotas es una de las principales fuentes de alérgenos que inducen alergia perenne en los humanos. Las cantidades de alérgenos liberadas son importantes, y su efecto se ve potenciado debido a los reservorios de alérgenos existentes dentro de las casas, como mantas, alfombras, sofás, etc., donde se acumulan en grandes cantidades. Esto hace que los niveles se mantengan elevados incluso mucho tiempo después de retirar al animal¹³.



Otros procesos alérgicos causados por animales están estrechamente relacionados con un tipo de asma ocupacional que padecen los trabajadores que están en contacto con animales, especialmente roedores. Las fuentes de estos alérgenos se encuentran en la saliva, la piel, el pelo y, especialmente, la orina. El hábitat típico de estos animales, en jaulas con material inerte (como viruta de madera, serrín o sepiolita), favorece la acumulación de los alérgenos en altas concentraciones. Asimismo, la elevada actividad metabólica de estos animales hace que se liberen grandes cantidades de las sustancias referidas. La mayoría de alérgenos de este grupo se encuadran dentro de las lipocalinas y las albúminas, si bien el Fel d 1, el alérgeno más relevante del epitelio del gato, posee actividad uteroglobina.



Venenos

La alergia a veneno de himenópteros supone un gran riesgo para los pacientes. La característica común que presentan estas sustancias es que la mayoría se encuadran dentro de las familias de proteínas con actividad hialuronidasa y fosfolipasa, de ahí que entre todos ellos exista un alto grado de reactividad cruzada¹⁴.

Fabricación de productos alérgénicos

La materia prima

En la fabricación de los extractos alérgénicos, la selección de la materia prima resulta crucial para la calidad y las características de los extractos. Por ello, es muy importante tener en cuenta una serie de consideraciones a fin de evitar la obtención de extractos que no cumplan con los parámetros de calidad (figura 12) (<http://www.emea.europa.eu/htmls/human/humanguidelines/biologicals.htm>).



Pólenes.

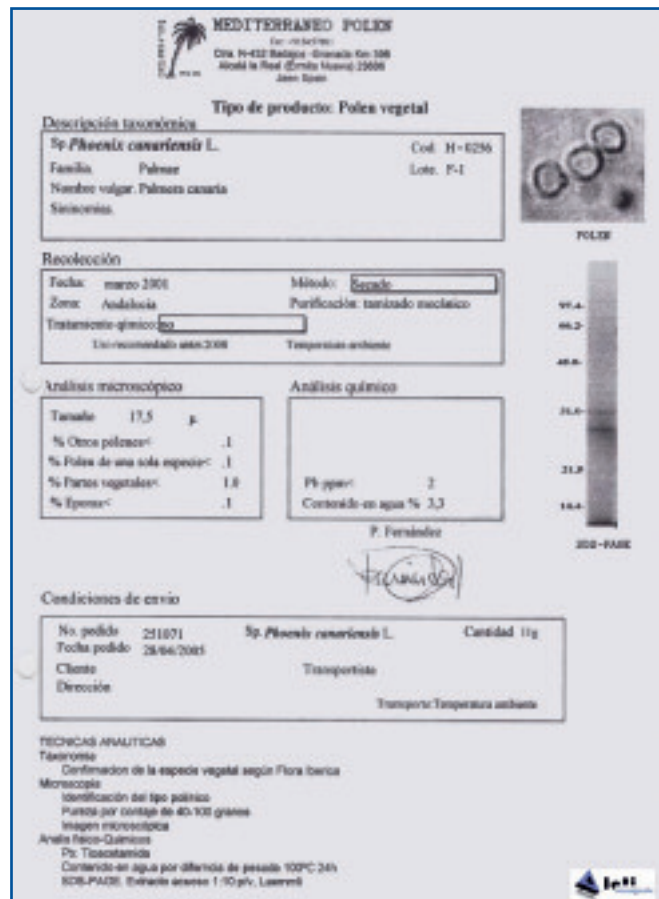


Figura 12. La naturaleza y las características de la materia prima deben reflejarse de la forma más clara posible en los certificados de análisis de los productos. El nombre científico de la materia prima (género y especie, cuando sea posible), el tipo de fuente de la que se obtiene (polen, ácaro, epitelio...) y otros factores, como la recolección (método de recogida), el tratamiento (si ha sido previamente tratada, por ejemplo para su desengrasado) o el almacenamiento (humedad, temperatura), deben quedar documentados en cualquier materia prima que se recoja. Además, el nombre del proveedor, el origen, la fecha de la recolección, la uniformidad de la misma, la riqueza y el grado de pureza son parámetros que resulta imprescindible conocer y que deberían aparecer detallados en las etiquetas

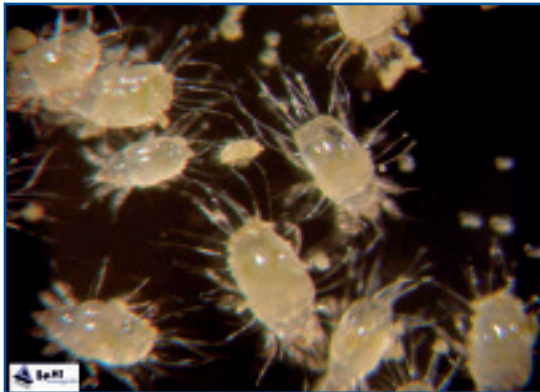


Figura 13. Cultivo de *Tyrophagus putrescentiae*. Una vez que el cultivo está lo suficientemente maduro como para poder emplearse en la fabricación de extractos, se lleva a cabo un minucioso estudio morfológico y de riqueza para garantizar la calidad del extracto







Figura 15. Cultivos de hongos



Figura 14. Materia prima de *Dermatophagoides pteronyssinus*



Figura 16. Materia prima de polen de *Olea europaea*. Destaca el etiquetado del producto, donde figuran todos los datos de identificación

-  | **Ácaros.** (figuras 13 y 14).
-  | **Hongos** (figura 15).
-  | **Alérgenos animales.**
-  | **Venenos.**

Fabricación de los extractos

La fabricación de los extractos conlleva una serie de pasos que tienen por objeto la transformación final de la materia prima en un producto elaborado, rico en alérgenos y proteínas, y con un alto grado de purificación (figura 16). El producto final puede presentarse en forma de compuesto liofilizado, al que se le ha extraído su contenido en agua, o como una suspensión acuosa enriquecida (figura 17).

El proceso de fabricación encaminado a la obtención de extractos alérgicos se describirá siempre en detalle, y todos los pasos cruciales de la elaboración quedarán registrados para garantizar la trazabilidad del producto y asegurar que no ha existido ningún tipo de error en su fabricación. Igualmente, cualquier incidente deberá quedar reflejado en las guías de fabricación, con lo que se garantizará la calidad final del producto.

Aunque el proceso de fabricación de extractos alérgicos no se lleva a cabo en condiciones estériles, el trabajo en condiciones higiénicas y con material estéril supone un paso crítico en su elaboración que va a garantizar una correcta calidad final del producto. La concentración del producto, ya sea en forma acuosa o liofilizada, ha de ser preparada en condiciones estériles y en zonas destinadas para ello (figuras 18-22).

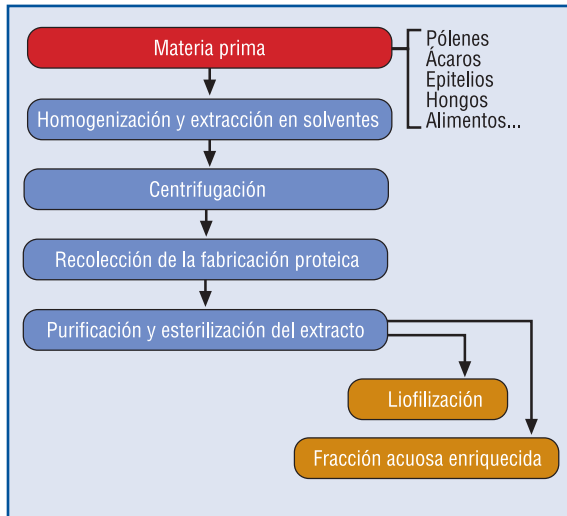


Figura 17. Esquema de fabricación de los extractos



Figura 18. Proceso de liofilización de un extracto de *Olea europaea*. El producto permanece a temperaturas inferiores a -60°C , y en condiciones absolutas de vacío



Figura 19. Detalle de la etiqueta de uno de los frascos. Cabe destacar el hielo que se forma alrededor de los frascos al existir un contraste de temperatura muy elevado entre el interior y el exterior de éstos



Figura 20. Proceso terminado, en el que se ha retirado toda el agua del extracto



Figura 21. El material liofilizado presenta un estado sólido de aspecto pulverulento (figuras). En este estado, el material es altamente estable si se conserva en condiciones de vacío y refrigeradas con el fin de evitar su hidratación



Figura 22. Detalle del material liofilizado que permite observar su aspecto pulverulento

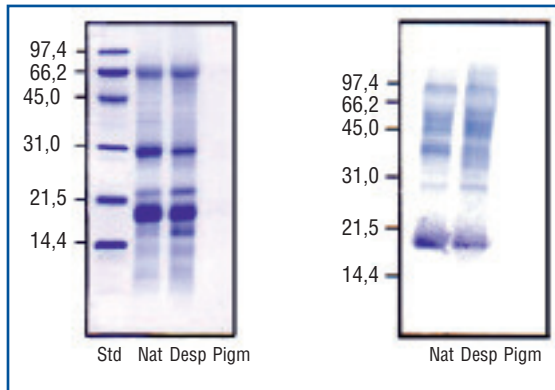


Figura 23. Perfiles proteico y alergénico de extractos de *Betula alba*

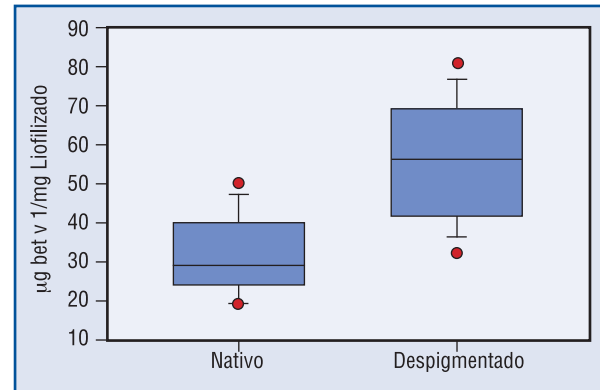


Figura 24. La proporción de alérgeno mayoritario total se incrementa debido a que el material irrelevante es eliminado de los extractos

Purificación de los extractos

Como ya se ha mencionado, los extractos alergénicos están constituidos por diversas sustancias de origen biológico. La eliminación de muchas de ellas mediante procesos de diálisis, concentración y filtración realizados durante la fabricación hace que los extractos se enriquezcan en proteínas y alérgenos, sucesivamente. Sin embargo, determinadas sustancias que se encuentran adheridas a la superficie de las proteínas todavía permanecen tras la aplicación de los sistemas tradicionales de purificación de los extractos.



Gracias a un método patentado, conocido como «despigmentación», los laboratorios LETI han introducido un paso intermedio de semipurificación, entre la fabricación del extracto y la obtención del producto final, encaminado a obtener extractos más puros, con menos sustancias no alergénicas y con mayor concentración de proteínas/alérgenos. El objetivo es la semipurificación de los extractos alergénicos mediante un sistema de tratamiento ácido suave, de manera que se desprendan las impurezas y las sustancias «contaminantes» adheridas a los alérgenos. En muchos de los extractos, y especialmente en los pólenes, estas sustancias pueden ser visualizadas mediante separación electroforética. Debido a su color amarillo-parduzco han sido llamadas pigmentos. Además, tras este proceso, se retiran compuestos lipídicos, glúcidos y pequeños nucleótidos que quedan en los extractos nativos. Estas impurezas suponen entre un 30 y un 60% del peso total del extracto alergénico.

Recientes experimentos han demostrado que la presencia de estos pigmentos en los extractos alergénicos tiene un efecto adyuvante Th2, de modo que, en presencia de cultivos celulares, estimulan la producción de interleucina 4¹⁷.

El resultado es un compuesto purificado que conserva las mismas características y propiedades inmunoquímicas de los extractos nativos de procedencia¹⁸ (figura 23). Por el contrario, la proporción de alérgeno mayoritario y el contenido proteico total se incrementan considerablemente debido a que el material irrelevante es eliminado de los extractos (figura 24).

Fabricación del producto final

En términos generales, se entiende por producto alergénico final aquel que va a ser preparado a partir de otro producto intermedio (figura 25). Éste suele estar concentrado, y presenta una elevada potencia biológica y concentración de alérgeno. A partir de él, y siguiendo los criterios de estandarización, el producto final se diluirá a fin de adecuarlo a la dosis humana de tratamiento. El proceso debe llevarse a cabo según los estándares de fabricación de productos farmacéuticos, y cumpliendo de forma estricta las buenas prácticas de laboratorio. En el caso de preparaciones que deban servirse estériles, las condiciones de esterilidad deberán ser mantenidas durante los procesos de fabricación del producto final.



Figura 25. Producto granel, altamente concentrado, de extracto de *Olea europaea* para preparación sublingual



El proceso para obtener material aséptico incluye el llenado del material estéril en viales estériles y el almacenamiento en condiciones asépticas. Debe ponerse especial atención en el ambiente donde se trabaja, en el personal, en las superficies de trabajo, etc. Esta fase de llenado debe realizarse en las llamadas salas blancas (áreas con un estricto nivel de esterilidad, y donde deben cumplirse los límites en el número de partículas).

La adición, al producto final, de alguna sustancia conservante ayudará a prevenir la contaminación microbiana o la proliferación de este tipo de agentes que pueden ocurrir durante el almacenaje de la solución concentrada o en la fabricación de la vacuna (especialmente en vacunas multidosis).

Tanto los productos intermedios como los finales son sometidos a una serie de controles que garantizan la estabilidad del proceso, así como la calidad del producto. Estos ensayos intermedios pueden ser los siguientes:

- Composición alérgica:
 - Perfil proteico (SDS-PAGE).
 - Isoelectroenfoque (IEF).
 - Inmunoblot.
- Potencia alérgica (véase el apartado «Fabricación de extractos estandarizados en potencia biológica»).
- Control microbiológico. Esterilidad o recuento microbiano.
- Contenido en conservantes/adyuvantes.
- Contenido de agua en liofilizados: <10%.
- Toxicidad anormal (hongos por vía inyectable).
- En el caso de alérgenos adsorbidos en gel de hidróxido o fosfato de aluminio, debe comprobarse que la cantidad de aluminio que contienen es inferior al máximo permitido (1,25 mg Al³⁺/dosis humana).
- Cuando se utiliza fosfato de calcio como adsorbente, el contenido de calcio no debe ser inferior al 80% ni superior al 120% del valor declarado.

Estandarización de extractos alérgicos

Los primeros extractos estandarizados datan de los años 70, cuando los extractos alérgicos comenzaron a fabricarse según los criterios de potencia biológica y composición alérgica. El objetivo de la estandarización de extractos alérgicos consiste en corregir las variaciones de cada uno de los extractos de nueva fabricación y ajustarlos a una potencia final adecuada en función de un extracto de referencia. El objetivo es minimizar las variaciones cualitativas y cuantitativas en la composición de los productos finales, con el fin de obtener altos niveles de seguridad y eficacia (véase el módulo «Evidencia» de este curso) y lograr la consistencia de los lotes de nueva fabricación. En la actualidad, no son muchos los extractos disponibles que se presentan sin una estandarización adecuada; éstos suelen reducirse, generalmente, a extractos diagnósticos, entre los que destacan los alimentos.

La estandarización de alérgenos comprende dos fases críticas que van a determinar el éxito de la obtención de extractos de calidad: la selección de un patrón de referencia interno (PRI), o estándar de compañía, y la selección de los procesos de estandarización mediante los cuales se van a comparar los lotes sucesivos con el PRI. Teóricamente, la estandarización siempre debe hacerse con extractos purificados que contengan el mínimo de sustancias de carácter no alérgico o proteico, a fin de que no interfieran en los procesos. Sin embargo, y como se ha comentado ya, los extractos alérgicos están formados por mezclas complejas de biomoléculas donde la presencia de otras sustancias es inevitable en mayor o menor grado. La obtención de extractos más o menos purificados va a depender de los fabricantes, de los procesos de purificación a los que sometan a sus extractos, y de los parámetros de control de calidad para la aceptación de éstos.

Estándar de compañía (PRI)

Como se ha comentado en los puntos anteriores, los extractos alérgicos están constituidos por una mezcla heterogénea de componentes alérgicos y no alérgicos, lo que hace que no sean fáciles de estandarizar y que difícilmente pueda cuantificarse cada componente. Por tanto, está comúnmente aceptado que los extractos alérgicos no pueden ser tratados con los mismos procedimientos que otros productos biológicos.



La consistencia de los extractos supone un reto a la hora de obtener extractos alergénicos de calidad. En función de las exigencias en este paso, la calidad final puede variar considerablemente. Las diferencias en la homogeneidad de los extractos van a depender de dos puntos principales:

- *El fabricante.* En este caso, las diferencias se deberán a los procesos de fabricación, y van a depender del tiempo, del solvente, del pH de la solución extractante, de la temperatura, etc.
- *La naturaleza de la materia prima* (véase el apartado «Fuentes de alérgenos. La materia prima»). Está ampliamente demostrado que las materias primas varían anualmente en función de las condiciones climáticas (como la temperatura o la pluviosidad), de las subespecies, razas o variedades genéticas dentro de una misma especie, y, en los epitelios, del ciclo estral en que se encuentre el animal, el estado metabólico o de maduración en que esté la fuente productora, etc.^{19,20}.

Todas estas variables representan un problema real a la hora de establecer homologías entre las compañías y entre los lotes sucesivos dentro de una misma compañía. Con el objetivo de minimizar esta variabilidad, se estableció un sistema de estandarización que absorbiera todas las diferencias y garantizara una homogeneidad de los lotes obtenidos a partir de distintas materias primas de la misma especie y en distintos años. Para ello, se establecieron los PRI o estándares de compañía, cuyo objetivo principal es servir como referencia a cada uno de los lotes sucesivos, de la misma materia prima, que se fabriquen. El PRI siempre se fabrica siguiendo un protocolo preestablecido. El resto de lotes que se preparen deberán seguir exactamente la misma metodología que la empleada para el PRI, y los resultados se referenciarán en comparación con él. Por consiguiente, el extracto seleccionado como PRI será caracterizado biológica e inmuoquímicamente empleando los siguientes parámetros:

- **Parámetros *in vitro*:**
 - Determinación del perfil proteico/antigénico.
 - Perfil en función del tamaño molecular de las proteínas (SDS-PAGE).
 - Perfil en función del punto isoeléctrico de las proteínas (IEF).
 - Perfil en función de ambos parámetros (estudios de 2-D).
 - Contenido proteico total del extracto (Lowry-Biuret, Bradford y unidades de nitrógeno proteico [PNU]).
 - Caracterización mediante cromatografía.
 - Perfil alergénico (immunoblot con *pool* de sueros).
 - Capacidad de unión a IgE: ELISA inhibición (50% de inhibición).
 - Capacidad de unión a IgG: ELISA inhibición (50% de inhibición).
 - Cuantificación de alérgenos mayoritarios y minoritarios.
- **Parámetros *in vivo*:**
 - Prueba cutánea. Para la estandarización *in vivo*, la técnica más empleada es la prueba cutánea, bien mediante el sistema del *prick test*, bien mediante la prueba de intradermorreacción. El objetivo final es correlacionar la respuesta de un grupo de pacientes sensibilizados al alérgeno en estudio con el extracto que se está empleando. Las particularidades de los diferentes métodos serán tratadas más adelante.

Una vez establecidas las características del PRI, el resto de los extractos que se fabriquen deberán ajustarse a un perfil similar al que presenta el patrón. Las especificaciones que debe cumplir cualquier extracto nuevo fabricado son las de apariencia y descripción similares, y las de pureza y potencia similares y ajustables al método de estandarización y concentración de alérgenos. De no cumplir alguna de las especificaciones exigidas, el producto es rechazado.

Unidades de estandarización

En la actualidad, no son muchos los extractos disponibles que se presentan sin una estandarización adecuada. La presentación de estos extractos se lleva a cabo basándose en diferentes unidades que no dan una idea de la actividad real del extracto y no garantizan la seguridad del producto. Estas unidades se basan en una estandarización en unidades de masa:

- Unidades Noon (1 Noon= cantidad de alérgeno extraído de 1 mg de MP).
- Unidades peso/volumen (1/100: 1 g de MP/100 mL de dilución).
- Unidades de nitrógeno proteico (1 mg de N₂ contiene 100.000 PNU).
- Cantidad de liofilizado/mL.
- Unidades de alérgeno/mg.



En estos casos, la concentración de proteínas de cada extracto debe hacerse de forma obligatoria, con el fin de conocer una composición aproximada del extracto.

En cuanto a las unidades biológicas de productos estandarizados biológicamente, existe una gran variabilidad entre compañías. Las más destacadas son: HEP, BU, AU, BAU, IRC y UB.

Tipos de estandarización

Actualmente, los métodos de estandarización se basan en dos líneas distintas: la estandarización en función de la actividad biológica de los extractos alergénicos, y la estandarización biológica en función de las unidades masa, donde el sistema más destacado es la cuantificación de algunos de los alérgenos principales de los extractos. En este último caso el valor del alérgeno se toma como valor de referencia orientativo, ya que, por el momento, las unidades de potencia biológica siguen manteniéndose, debido a que la misma concentración de alérgeno mayoritario en dos extractos de especies diferentes no significa lo mismo ni tiene el mismo efecto terapéutico.

Estandarización en función de la actividad biológica

Estandarización *in vivo*

En general, la actividad biológica *in vivo* es la capacidad de un extracto alergénico de inducir una reacción cutánea en una población de pacientes sensibilizados al extracto en cuestión. Sin embargo, no todas las compañías fabricantes, ni todos los países, utilizan el mismo sistema de estandarización, lo que, en cierta medida, complica la comparación de los extractos.

El sistema de estandarización más habitual en los países europeos se basa en las Nordic Guidelines (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Consiste en realizar una prueba cutánea a un grupo de pacientes sensibilizados a una fuente alergénica, empleando para ello diluciones seriadas de orden 10 del extracto alergénico procedente de la fuente alergénica a la que el paciente está sensibilizado, y partiendo de una concentración alta, hasta una significativamente baja. El tamaño de la pápula se compara con el de un *prick* de histamina a 10 mg/mL, para establecer la potencia relativa del extracto. Se estima que un mismo tamaño de pápula inducido por una concentración de extracto alergénico y por el *prick* de histamina equivale a 10.000 BU/mL. Algunas variantes de este sistema han establecido una unidad similar; en ellos se describe que un extracto tiene 10 unidades HEP cuando provoca una reacción cutánea similar a la provocada por un *prick* de histamina (10 mg/mL). Con los datos de concentración y tamaño de pápula obtenidos se fabrica una recta de regresión, de modo que queden representadas, en una curva, la concentración final de cada una de las diluciones y, en otra, el tamaño de la pápula (figura 26). De este modo se garantiza que el tamaño de la pápula del *prick* de histamina quede entre los tamaños inducidos por la menor y la mayor concentración del extracto en todos los casos.

La selección de los pacientes para los estudios de estandarización se lleva a cabo siguiendo criterios geográficos, esto es, sujetos residentes en zonas donde la prevalencia del alérgeno en cuestión es significativa. Los pacientes seleccionados deben haber recibido el diagnóstico de sufrir sensibilización al alérgeno del estudio. El número se determina según criterios estadísticos y estudios muestrales, en los que se tiene en cuenta la población total, la población sensibilizada, el error máximo aceptado y la confianza requerida en el estudio, entre otras. Por último, se efectúa la toma de una muestra de suero para su posterior análisis, en el que se cuantifican los niveles de IgE específica al extracto alergénico y se analiza el perfil alergénico del paciente. Los sueros con niveles adecuados de IgE específica se emplearán para la fabricación de un

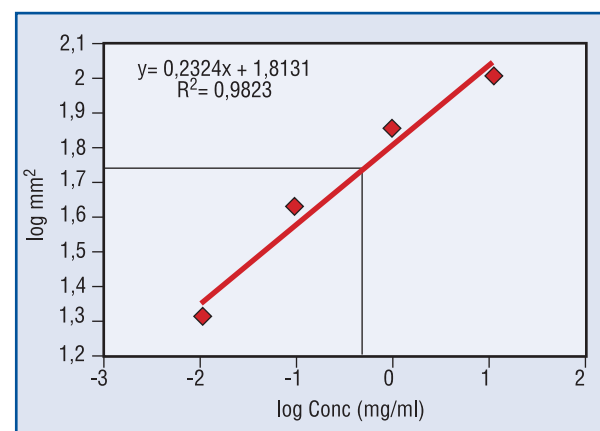


Figura 26. Con los datos de concentración y de tamaño de pápula obtenidos se elabora una recta de regresión, de modo que queden representadas, en una curva, la concentración final de cada una de las diluciones y, en otra curva, el tamaño de la pápula



Tabla 4. Sistema comparativo entre estandarización europea y americana

Americano	Europeo
15 pacientes altamente sensibilizados	20 pacientes sensibilizados
Test intradérmico	Test cutáneo
Titulación a punto final	Comparación con la pápula de histamina
50 mm de la suma de los diámetros del eritema	10 mg/mL de histamina
BAU (<i>bioequivalent allergy unit</i>)	HEP (<i>histamine equivalent prick</i>)

pool de sueros con los que se llevarán a cabo los ensayos de caracterización del extracto, y la valoración de los lotes siguientes.

El sistema americano emplea test intracutáneos en pacientes altamente sensibilizados, y evalúa la capacidad de producir un eritema de 50 mm, sin ninguna comparación con la prueba de la histamina. El objetivo es determinar la concentración de alérgeno que resultará segura y, a partir de ésta, definir la concentración a la que se puede iniciar el tratamiento de inmunoterapia. La unidad de estandarización son 100.000 AU/mL. Los resultados de uno y otro método son difíciles de comparar, puesto que, además, las características de fabricación de los extractos son también diferentes (tabla 4).

El sistema Brighton se estableció a finales de los 70 como un nuevo método de estandarización basado en resultados *in vivo* e *in vitro*²¹. El autor establecía que un extracto contenía 10 unidades biológicas cuando el *prick*, probado en 30 pacientes sensibilizados al extracto en cuestión, inducía un tamaño de pápula cuya media geométrica era de 75 mm². El material alérgico debía ser extraído en solución de Coca y contener un 50% de glicerol y un 0,4% de fenol. De este modo se realizaban cuatro diluciones por duplicado, a razón de diez veces, y se ensayaba en el brazo de los pacientes alérgicos seleccionados. Con esto se establecía la actividad biológica final de un extracto no diluido. A continuación se realizaba un ensayo de isoelectroenfoque (perfil proteico) a fin de determinar los componentes del extracto, y, si éstos eran los correctos, se analizaba la potencia *in vitro* del extracto mediante inhibición de RAST, de modo que se calculaba el 50% de inhibición. Con esto se obtenía un valor expresado en unidades por mililitro. Por último, a partir de los datos de la media del tamaño de la pápula y la potencia biológica del extracto, se calculaba un coeficiente de correlación que permitía establecer unos límites de potencia para los extractos utilizados en el *prick*.

Estandarización *in vitro*

Para la estandarización *in vitro* del extracto, se calcula el 50% de inhibición del producto empleando un *pool* de sueros de los pacientes con los que se ha llevado a cabo la valoración *in vivo*. Este valor corresponde a los miligramos de extracto que se necesitan para inhibir el 50% de extracto. De este modo se establece una correlación entre los miligramos necesarios *in vivo* e *in vitro*, y éstos son los valores que se utilizan para determinar el diagnóstico y el tratamiento del extracto.

Una vez que el extracto que va a ser utilizado como PRI se ha caracterizado inmunoquímicamente y se conocen todas sus propiedades fisicoquímicas, su valoración *in vivo* y su potencia biológica, ya se puede decir que el producto servirá como referencia para la fabricación de los lotes sucesivos (figura 27). Cualquier extracto del mismo alérgeno que se fabrique se comparará con el estándar de referencia, y para ello deberá cumplir una serie de requisitos, antes de ser aprobado, entre los que destaca un perfil antigénico similar sin ausencia de los alérgenos principales, y un contenido de alérgenos mayores adecuado. Además, la capacidad de unión de IgE e IgG deberá ser parecida y entrar dentro de unos valores límite.

Después de que el nuevo producto haya sido aceptado como lote del que se fabricarán nuevos tratamientos, la potencia biológica se ajusta con la potencia biológica del lote PRI (figura 28). Esto garantiza una homogeneidad final de los lotes, pues asegura que todos tendrán las mismas características de seguridad y eficacia, y permite que los tratamientos se continúen en el tiempo sin verse afectados por materias primas recogidas en distintas épocas o de diferentes fuentes. Los estrictos controles de calidad a los que se somete a los extractos determinan la aceptabilidad o no de los productos para su uso humano. Lotes con potencia muy por debajo de

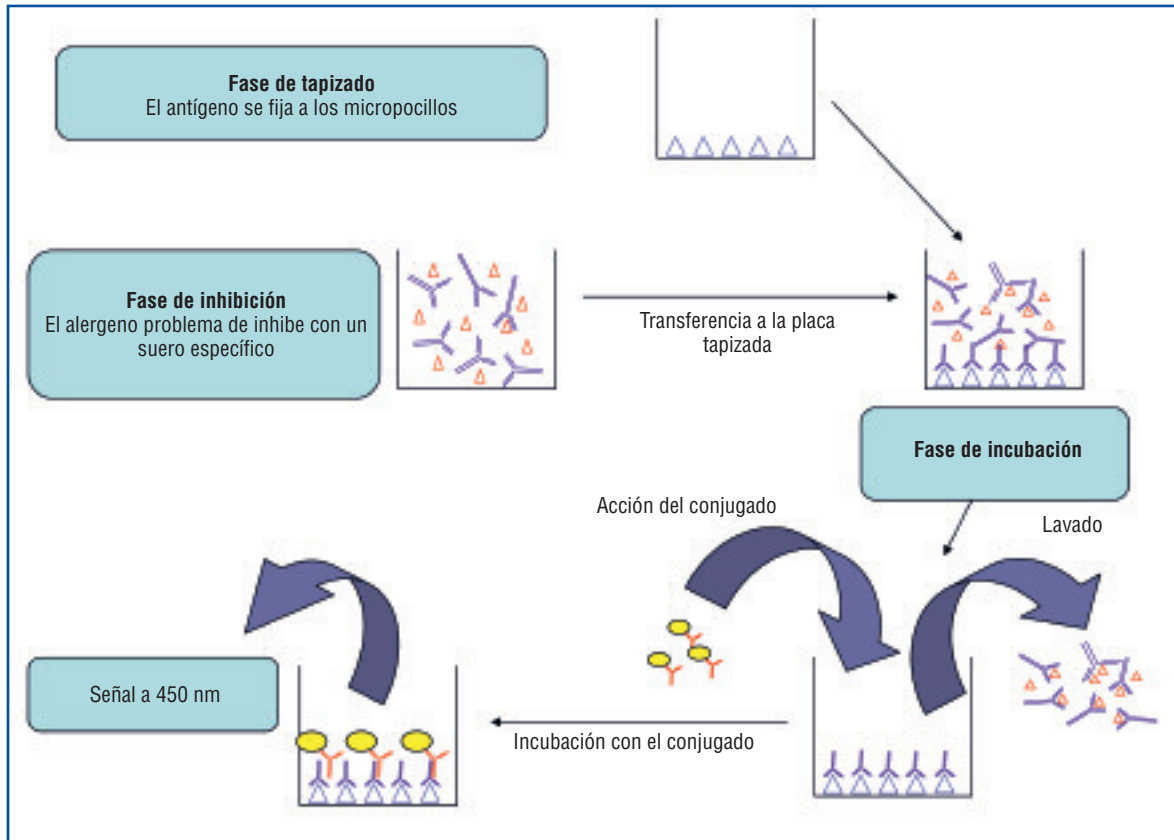


Figura 27. Metodología de análisis de la potencia biológica mediante inhibición de ELISA

lo requerido para los tratamientos, o que no cumplen con los parámetros de calidad especificados en puntos anteriores, son rechazados y eliminados.

Según describe la Farmacopea Europea en su sección de estandarización y control de vacunas alérgicas modificadas, éstas deben estandarizarse inmediatamente antes de su polimerización; asimismo, debe analizarse la reproducibilidad del proceso de modificación, y, finalmente, este producto modificado debe conservar las propiedades de los productos de partida.

Fabricación de extractos estandarizados en potencia biológica

Una vez que la potencia biológica de un extracto liofilizado ha sido definida con respecto al PRI, el siguiente paso es diluir dicho extracto hasta la concentración establecida para tratamientos o diagnósticos.

Tras la estandarización de un extracto alérgico, se establece una equivalencia entre el resultado *in vivo* y la capacidad de inhibición que posee el extracto *in vitro*, y se define una correlación entre ambos parámetros. Un vial para tratamiento, según los fabricantes, llevará la concentración de miligramos equivalente a la obtenida en el ensayo *in vivo*, mientras que para el tratamiento esta concentración se ajustará con la valoración obtenida en el ensayo *in vitro*. En el caso de los polímeros, la concentración del extracto puede ser 100 veces

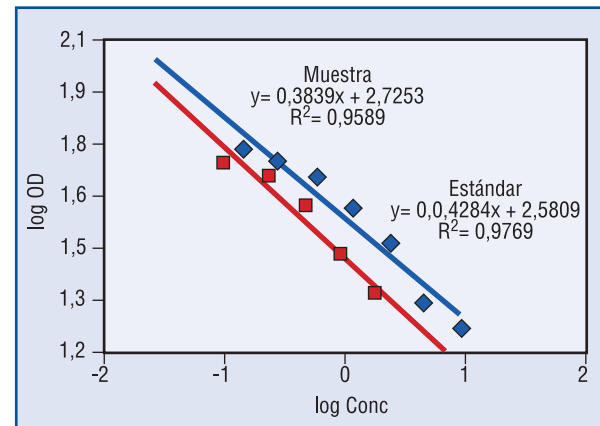


Figura 28. El resto de lotes que se preparen deberán seguir exactamente la misma metodología que la empleada para el patrón de referencia interno (PRI), y los resultados serán referenciados en comparación con dicho patrón



mayor, e incluso más, puesto que la capacidad de unión a IgE se ha reducido en más de un 95%, aumentando significativamente la eficacia de los productos. La concentración de los extractos diagnósticos se basa en el tamaño real de la valoración *in vivo*.

Estandarización en unidades masa de alérgeno

Diferentes estudios clínicos realizados con gramíneas, ácaros, ambrosía o veneno de himenópteros han sugerido que una cantidad entre 5 y 20 microgramos de alérgeno principal en dosis de mantenimiento es eficaz para el tratamiento de la alergia; por lo tanto, está aceptado por la comunidad científica que la presencia de alérgenos mayores en los extractos es imprescindible para una adecuada eficacia de la inmunoterapia, puesto que los alérgenos son el principio activo de las vacunas alérgicas²².

La estandarización en unidades masa de alérgenos se basa en la cuantificación de ciertos alérgenos presentes en los extractos alérgicos, con el fin de garantizar una concentración adecuada de aquéllos en todos los lotes de un mismo extracto. Los alérgenos pueden cuantificarse empleando tres métodos distintos:

- Anticuerpos policlonales.
- Anticuerpos monoclonales.
- Densitometría de escáner²³.

El empleo de anticuerpos monoclonales ha sido el de más amplia difusión, si bien su principal problema es el de la especificidad. En ocasiones, al existir reactividad cruzada entre alérgenos, puede aparecer un reconocimiento cruzado, lo que da lugar a una sobrevaloración del alérgeno. Por otro lado, al ser tan específicos de una única secuencia de aminoácidos dentro de la proteína, puede que sólo reconozcan una de las isoformas del alérgeno, con lo cual se produce una infravaloración del contenido. Otro problema que se deriva de la cuantificación basada en ensayos de ELISA es que la comparación entre los valores de alérgenos mayores por diferentes compañías también difiere de forma significativa, aunque se emplee el mismo método de análisis. Esto es debido a que, en la actualidad, no existen reactivos validados o estandarizados que garanticen la uniformidad de los resultados²⁴. Por tanto, no todos los anticuerpos monoclonales van a reconocer los mismos epítopos de los alérgenos, lo que conlleva una variabilidad considerable.

Los diferentes métodos de cuantificación de alérgenos dependen de la selección apropiada de las sustancias alérgicas que se va a valorar, aunque deben ser independientes del reconocimiento de los sueros de los pacientes²⁵. Éste es uno de los principales problemas cuando se pretende una estandarización única a nivel de alérgenos principales, ya que la determinación de un único alérgeno mayor puede no dar una ratio real de la potencia del extracto, con lo cual la homogeneidad de los lotes se verá seriamente comprometida, a excepción de la similitud con el alérgeno en cuestión. Por otro lado, al seleccionar exclusivamente uno o dos alérgenos principales como mucho, la importancia de los alérgenos menores y de los otros alérgenos principales es ignorada completamente, de modo que el tratamiento puede no ser eficaz para todos los grupos de poblaciones.

Desde 1978, se han tratado de emplear numerosos estándares internacionales que sirvieran como referencia para la cuantificación de los extractos; sin embargo, los esfuerzos por conseguir unos reactivos comunes no han tenido mucho éxito. El no trabajar con reactivos validados puede afectar a los resultados y dar lugar a valoraciones que no son comparables entre diferentes compañías; por tanto, un sistema de estandarización basado en microgramos de alérgenos requiere materiales de referencia reconocidos internacionalmente. Para tratar de reducir las diferencias entre compañías y evitar que cada una de ellas trabajara con reactivos propios, en el año 2002 surgió, con buen criterio, el proyecto CREATE, encuadrado en el 5.º Programa Marco de la Comunidad Europea²⁶. El objetivo de este proyecto era establecer una serie de reactivos comunes, preparados a partir de alérgenos nativos y recombinantes y de anticuerpos monoclonales específicos, con el fin de que los resultados pudieran ser unificados. Para ello, se diseñaron toda una serie de ensayos basados en la metodología ELISA. Aunque el objetivo final del proyecto no ha llegado a alcanzarse totalmente, resultados parciales han permitido que las formas recombinantes de los alérgenos Bet v 1 y Phl p 5a estén siendo evaluadas como estándares biológicos de referencia para ser incluidas en la Farmacopea Europea, lo que abre la puerta a que, en un futuro, se pueda trabajar con estándares internacionales armonizados. Hasta el momento, los resultados de los que se dispone no permiten el empleo exclusivo de alérgenos recombinantes en los pro-



tolos de estandarización alérgica, y no son suficientes para facilitar la comparación de los productos a partir de unidades masa de alérgeno mayor²⁷. En la actualidad, se trabaja en la mejora de las formas recombinantes de Phl p 5b, Ole e 1, Der p 1, Der f 1 y Der f 2.

En resumen, la estandarización de extractos alérgicos basada exclusivamente en unidades masa de alérgeno mayor no parece ser viable por el momento, y debe ser combinada con una estandarización de potencia biológica que garantice la seguridad y la eficacia de los extractos alérgicos. Sin embargo, la concentración adecuada y la identificación de alérgenos resultan cruciales para garantizar tanto la presencia del principio activo en las vacunas como la eficacia de la inmunoterapia²⁸.

Galénica de las vacunas alérgicas. Tipos de vacunas

Dentro de la clasificación de los medicamentos especiales, los medicamentos inmunológicos se definen como productos terapéuticos consistentes en vacunas, toxinas, sueros y alérgenos. Según el Real Decreto 1345/2007 (www.boe.es/boe/dias/2007/11/07/pdfs/A45652-45698.pdf), los productos alérgicos comprenden cualquier medicamento destinado a detectar o provocar una alteración adquirida y específica en la respuesta inmunológica a un agente alergenizante.

La presentación de los medicamentos alérgicos variará según el tipo de inmunoterapia que vaya a emplearse para el tratamiento de la enfermedad alérgica, y también en función de la vía de administración utilizada. Las distintas formas farmacéuticas de los extractos alérgicos son las siguientes:

- Soluciones inyectables.
- Suspensiones inyectables.
- Soluciones sublinguales o nasales.
- Comprimidos o cápsulas.
- Polvos o liofilizados.
- Parches.

Las vacunas utilizadas con mayor frecuencia en la práctica clínica contra las alergias están disponibles actualmente como productos estandarizados o pendientes de estandarización.

Una de las principales particularidades de la inmunoterapia empleada en el tratamiento de la alergia es su carácter individual. Según el Real Decreto 1345/2007, las vacunas individualizadas son las preparadas con agentes inmunizantes a concentración y dilución específicas, según la correspondiente prescripción facultativa para un paciente determinado.

Aunque existen distintos tipos de inmunoterapia y diferentes productos, muchos de ellos se encuentran actualmente en fase de investigación o en estudios clínicos, y no han sido aún aprobados para el tratamiento de la enfermedad alérgica²⁹. Hoy en día, los extractos utilizados para inmunoterapia son de dos tipos, principalmente: extractos no modificados, en los que los alérgenos son utilizados en condiciones nativas, y extractos modificados, en los que se llevan a cabo ciertos cambios para mejorar la inmunogenicidad y reducir la alergenidad (tabla 5).

Extractos alérgicos no modificados (véase el módulo «Mecanismos de acción» de este curso)

Dentro del grupo de extractos alérgicos no modificados se incluyen las vacunas, cuya formulación final se caracteriza porque los alérgenos se presentan en un estado nativo, sin sufrir ningún tipo de tratamiento posterior.



Vacunas acuosas

Las vacunas acuosas fueron la primera forma de inmunoterapia subcutánea utilizada. La preparación de estas vacunas puede hacerse de dos formas. La primera consiste en diluir, en una solución adecuada (que puede ser agua, o algún tampón fosfato o una solución salina), el producto resultante de la extracción de la fuente alérgica. En otras ocasiones, la disolución se realiza a partir de un extracto liofilizado a la concentración



Tabla 5. Características principales de los extractos para inmunoterapia

	Tipos de vacunas				
	Acuosa	Nasal	Sublingual	Con modificación física	Con modificación química
Concentración de alérgenos	Sin estandarizar	Ajustada por estandarización. Alta concentración de alérgenos (2-5 veces superior a los extractos nativos)	Ajustada por estandarización. Muy alta concentración de alérgenos (10-15 veces superior a los extractos nativos)	Ajustada por estandarización	Ajustada por estandarización. Muy alta concentración de alérgenos (10 veces superior a los extractos nativos)
Adyuvante	No	No	No	Sí	Sí
Excipiente	Solución acuosa salina	Solución acuosa salina	Solución acuosa fosfatada	Solución acuosa fosfatada	Solución acuosa fosfatada
Conservante	No	No	Fenol/glicerina	Fenol	Fenol

requerida. Estos extractos son poco utilizados en la práctica clínica en nuestro país, si bien están ampliamente difundidos en Estados Unidos y Sudamérica. Entre los principales inconvenientes encontramos que, por lo general, no se trata de vacunas estandarizadas, con lo que la variabilidad del extracto y la materia prima no resulta ajustada entre los diferentes lotes; son vacunas muy poco estables y de corta semivida, al estar disueltas directamente en solución salina o agua, y el riesgo de reacciones adversas que pueden provocar es considerable, y éstas son frecuentes.



Vacunas sublinguales

La inmunoterapia sublingual se basa en la administración de elevadas dosis de alérgeno mediante dispensación de gotas debajo de la lengua. Esta vía alternativa de administración de alérgenos surgió hace algunos años con el objetivo de reducir al mínimo los efectos adversos que en ocasiones aparecían en los pacientes tras la administración de extractos alérgicos por vía subcutánea. Desde entonces, ha cobrado fuerza en países como Francia o Italia, donde la mayoría de los tratamientos se hacen por vía sublingual³⁰. Se han realizado diferentes ensayos clínicos, más o menos exitosos, para demostrar su eficacia y seguridad³¹.



Aunque el mecanismo inmunológico subyacente no está todavía totalmente demostrado, en algunos estudios se ha sugerido que la inducción de tolerancia en la superficie de la mucosa oral puede ser eficaz debido a una supresión de la respuesta alérgica. Sí parece estar demostrado que el proceso de presentación antigénica es más lento, debido a las barreras que debe atravesar el alérgeno antes de entrar en contacto con las células presentadoras. Como consecuencia, uno de los puntos cruciales en la eficacia de las vacunas sublinguales es el tiempo que los alérgenos deben permanecer en la mucosa. Experimentos realizados con alérgenos previamente marcados con yodo con el objetivo de analizar la farmacocinética de este tipo de inmunoterapia han puesto de manifiesto que la señal en plasma se detecta apenas 30 minutos después de la aplicación de la muestra, si bien se detectó que la actividad persistía en la región sublingual hasta unas 40 horas después de dicha aplicación. Según se ha demostrado, el proceso de presentación celular es mucho más lento, puesto que el alérgeno debe absorberse en la mucosa y desencadenar la respuesta celular. Con el fin de conseguir una mayor estabilidad del alérgeno, uno de los componentes principales de este tipo de vacunas es el glicerol. Asimismo, para prolongar la presencia del alérgeno en la mucosa, algunos estudios se han encaminado a la utilización de compuestos mucoadhesivos en la formulación del extracto oral, con el objetivo de aumentar el tiempo de exposición del alérgeno, estimular la proliferación de células T y aumentar la producción de IgA e IgG.



Otra de las características principales de la composición de las vacunas sublinguales es la elevada concentración de alérgeno que contienen, que puede oscilar entre 10 y 50 veces más la concentración del extracto alérgico.



En las vacunas sublinguales, la composición del extracto alérgico es la misma que en las subcutáneas. La presentación habitual se hace en función de la potencia biológica y/o la concentración de alérgeno o alérgeno



nos mayoritarios, y lo único que se modifica es el excipiente que contienen. En la mayoría de los casos, los alérgenos vienen disueltos en soluciones acuosas fosfatadas para mantener el equilibrio de las proteínas, con glicerina para estabilizar los alérgenos, y con fenol al 0,5% para evitar la proliferación bacteriana, especialmente en los viales multidosis. En ocasiones, en la formulación se incluyen aromatizantes y saborizantes para enmascarar el sabor desagradable de las vacunas.

Vacunas topiconasales

Hace unos años, surgieron una serie de trabajos que tenían por objetivo desarrollar vacunas que se aplicaran directamente en las fosas nasales, al ser ésta la vía de penetración habitual de los aeroalérgenos. Los estudios realizados pusieron de manifiesto un efecto terapéutico bueno y eficaz en las rinitis perenne y estacional, con una mejoría significativa de la sintomatología y el consumo de fármacos, y un reducido número de reacciones adversas.

Las vacunas nasales poseen características similares a las de las vacunas que se emplean en terapia sublingual, y consisten en extractos disueltos en solución acuosa, que se pulverizan directamente en las fosas nasales. Se preparan con excipientes adecuados para la mucosa nasal, con un pH entre 6 y 7,5, y pueden contener una elevada concentración del extracto alérgico. Sin embargo, este tipo de vacunas no han proliferado, debido a que presentan algunos efectos secundarios molestos y a que, en ocasiones, reproducen la propia sintomatología alérgica, con secreciones nasales, estornudos, picor de nariz y obstrucción nasal.



Productos orales liofilizados

Recientemente, ha surgido una nueva forma de presentación para vacunas de inmunoterapia, dirigida a pacientes con rinitis. Consiste en un extracto alérgico liofilizado que se administra por vía oral y contiene, como excipientes, hidróxido sódico, manitol y gelatina. En la actualidad, no está disponible más que para el tratamiento de una especie de gramíneas (*Phleum pratense*), y no está comercializado en nuestro país.

Extractos modificados (véase el módulo «Mecanismos de acción» de este curso)

Cuando hablamos de vacunas alérgicas modificadas, nos estamos refiriendo a extractos alérgicos que han sido sometidos a algún tipo de tratamiento con el fin de aumentar su eficacia y/o seguridad. Las modificaciones que es posible aplicar a los extractos alérgicos son de tipo físico, químico o fisicoquímico.

Modificaciones físicas

En las modificaciones físicas se combinan los alérgenos con sustancias como el hidróxido de aluminio, el fosfato cálcico, la tirosina o los liposomas, con el objetivo de aumentar la eficacia y reducir los efectos adversos. Estas sustancias se unen a los alérgenos, en sus condiciones nativas, por adsorción, por absorción o incluso, a veces, por inclusión de los alérgenos dentro de los productos a los que se asocian.

El objetivo de combinar los extractos alérgicos responde, por un lado, al efecto adyuvante que se busca con estas sustancias y, por otro, a la conveniencia de reducir de la alergenidad (con lo que se disminuye la posibilidad de reacciones adversas). Aunque el mecanismo de acción varía considerablemente según el tipo utilizado, en general, el efecto adyuvante se consigue porque las sustancias con las que se asocia el alérgeno actúan, fundamentalmente, favoreciendo la presentación de los antígenos al sistema inmune mediante el secuestro de los antígenos vacunales y su posterior liberación de manera lenta y prolongada (estimulación antigénica más duradera); de este modo, retienen el alérgeno en el lugar de inoculación durante el mayor tiempo posible, lo que evita su desaparición en la circulación sanguínea, y produce una ligera inflamación o granuloma que activa la atracción de células presentadoras de antígeno y macrófagos y, por consiguiente, favorece la quimiotaxis.

El extracto alérgico unido al producto adyuvante se encuentra disuelto en una solución salina fenolada con un rango final de pH entre 6,5 y 7,5, y puede presentarse en forma estandarizada o en mg/mL. Se trata de productos estables si se almacenan a temperaturas adecuadas.

Estudios doble ciego realizados en pacientes han puesto de manifiesto una elevada eficacia de estos productos para el tratamiento de la enfermedad alérgica. Las reacciones adversas son poco frecuentes (véase el módulo «Evidencia» de este curso).



Modificaciones químicas

En las modificaciones químicas se introduce un proceso que afecta a la estructura química del alérgeno con el fin de aumentar, de forma significativa, la seguridad de la vacuna. Existen diferentes métodos de modificación química:

Polimerización de alérgenos. El proceso de polimerización es un tratamiento químico del extracto que contiene los alérgenos, cuyo objetivo es aumentar la seguridad de dicho extracto. El glutaraldehído es, hoy en día, el producto más empleado, ya que da lugar a moléculas de elevado peso molecular, con mucha menos alergenicidad (hasta un 95% menos), preservando la capacidad inmunogénica. Se han empleado otras sustancias para obtener moléculas que contuvieran los alérgenos de los extractos nativos y redujeran la posibilidad de reacciones adversas; es el caso del formaldehído, los alginatos, moléculas de IgG, etc.

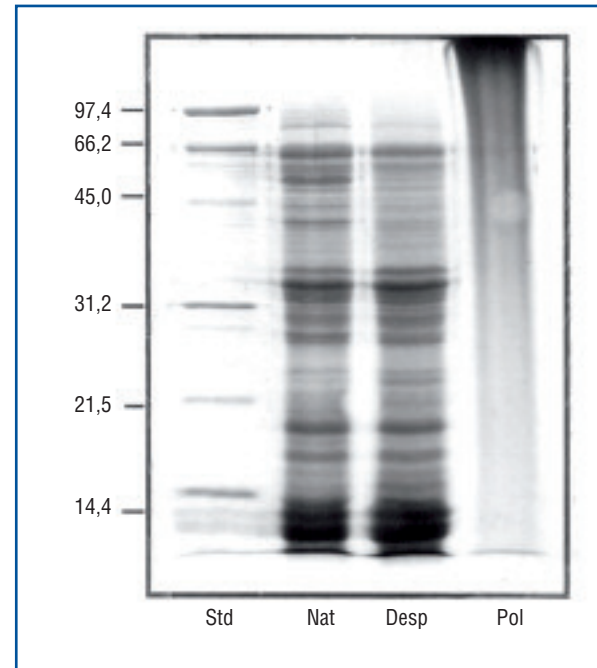


Figura 29. Polímeros. Tras la polimerización, se obtienen macrocomplejos de alto peso molecular que contienen todos los alérgenos presentes en los extractos nativos

Como consecuencia de la polimerización, se obtienen macrocomplejos de alto peso molecular que

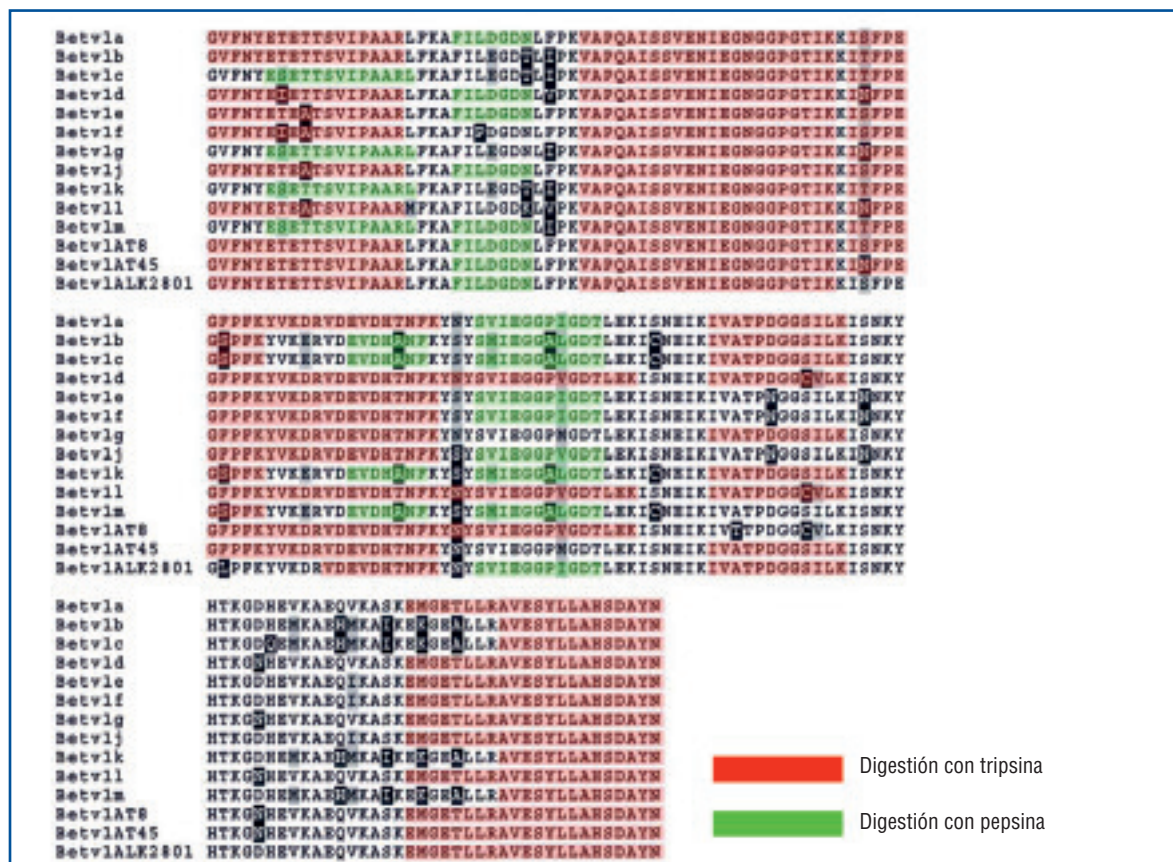


Figura 30. Secuencias del alérgeno Bet v 1 y sus isoformas, reconocidas mediante espectrometría de masas tras la digestión del extracto polímero con tripsina o pepsina



contienen todos los alérgenos presentes en los extractos nativos (figura 29). Estudios recientes, llevados a cabo tras la digestión de los polímeros y el análisis con espectrometría de masas, han puesto de manifiesto la presencia de secuencias homólogas de aminoácidos de alérgenos nativos en los compuestos polimerizados³² (figura 30; tabla 6). El principal objetivo de este proceso es aumentar la seguridad del extracto reduciendo la alergenicidad, lo que permite que las concentraciones dispensadas en las vacunas sean mayores y conduce, por consiguiente, a un aumento de la eficacia.

Tras la polimerización, los productos son purificados por ultrafiltración y diálisis para retirar cualquier resto de agente polimerizante, y diluidos en soluciones salinas fisiológicas fenoladas para preparar los tratamientos.

Algunos extractos alérgicos se caracterizan por la combinación de más de un proceso químico, lo que da lugar a polímeros altamente purificados muy seguros y eficaces, según se ha confirmado en ensayos clínicos doble ciego controlados con placebo.



Modificaciones fisicoquímicas

Los productos englobados en este grupo se caracterizan por haber sido sometidos a los dos tipos de modificaciones. El caso más común es la combinación de moléculas polimerizadas con hidróxido de aluminio o algún otro agente con el fin de que actúe como adyuvante, potenciando la respuesta inmunológica. Como en los anteriores, la dilución se lleva a cabo en solución salina fisiológica fenolada, y son preparados para ser utilizados como vacunas.

Los excipientes. Variables terapéuticas

En general, los excipientes se definen como sustancias constituyentes de los productos farmacéuticos elaborados, que se administran al paciente junto con el principio activo. La elección de los distintos excipientes que utilizar en las vacunas para la alergia se efectúa de acuerdo con las funciones que presentan, consideran-

Tabla 6. Coincidencia de las secuencias en alérgenos de *Betula alba* en dos extractos nativos y en sus correspondientes extractos despigmentados y polimerizados. La probabilidad está calculada en base al solapamiento, la intensidad de la señal y la calidad del análisis de masas

Alérgeno	Acceso Swis Prot	Extractos nativos		Extractos despigmentados polimerizados	
		Probabilidad de coincidencia y porcentaje de solapamiento	Probabilidad de coincidencia y porcentaje de solapamiento	Probabilidad de coincidencia y porcentaje de solapamiento	Probabilidad de coincidencia y porcentaje de solapamiento
Bet v 1.0101	P15494	Alta (83%)	Alta (71%)	Alta (33%)	Alta (62%)
Bet v 1.0201	P45431	Alta (80%)	Media (74%)	Alta (20%)	Media (34%)
Bet v 1.0301	P43176	Media (80%)	Media (74%)	Media (20%)	Media (32%)
Bet v 1.0401/1.0801	P43177	Alta (84%)	Alta (81%)	Alta (32%)	Alta (43%)
Bet v 1.0501	P43178	Baja (60%)	Baja (59%)	Media (22%)	Media (49%)
Bet v 1.0601/1.0901	P43179	Alta (79%)	Alta (78%)	Media (22%)	Alta (54%)
Bet v 1.0701	P43180	Alta (79%)	Media (74%)	Alta (28%)	Alta (36%)
Bet v 1.1001	P43183	Media (74%)	Media (73%)	Media (22%)	Media (49%)
Bet v 1.1101	P43184	Media (80%)	Media (74%)	Media (20%)	Media (32%)
Bet v 1.1201	P43185	Baja (72%)	Baja (62%)	Baja (16%)	Baja (36%)
Bet v 1.1301/1.1401	P43186	Alta (84%)	Alta (78%)	Alta (25%)	Alta (36%)
Bet v 2	P25816	Alta (47%)	Alta (20%)	Alta (5%)	Alta (12%)
Bet v 3	P43187	Baja (0%)	Baja (0%)	Baja (0%)	Baja (0%)
Bet v 4	Q39419	Alta (26%)	Alta (26%)	Baja (0%)	Baja (0%)
Bet v 6	P15777	Alta (64%)	Alta (40%)	Alta (12%)	Alta (20%)
Bet v 7	P81531	Alta (67%)	Alta (67%)	Alta (20%)	Alta (9%)



do la vía de administración de los extractos alérgicos, así como la dosis para mejorar la aceptabilidad del paciente e incrementar la duración de la fase de acción del producto.

El agua

El agua es el solvente más utilizado para cualquier producto farmacéutico. Según la Farmacopea Europea, existen diferentes tipos de agua que pueden utilizarse en productos farmacéuticos.

Cuando el agua vaya a ser utilizada en soluciones inyectables, deberá cumplir unas características especiales. Estos puntos críticos incluyen un exhaustivo análisis microbiológico para demostrar que el agua está libre de agentes microbiológicos y endotoxinas bacterianas (que no pueden ser superiores a 0,25 UI/mL), ensayos de conductividad, y valoración de la concentración total de carbono orgánico.

En caso de que el agua vaya a ser utilizada como vehículo para la administración de fórmulas orales o nasales no estériles, deberá ser purificada. Ésta se prepara por destilación, y debe satisfacer los límites de endotoxinas y microorganismos.

Conservantes antimicrobianos y estabilizantes

Los conservantes son sustancias que se emplean para aumentar la semivida del producto y retardar y/o reducir el crecimiento microbiano. Los microorganismos pueden reproducirse en los productos almacenados, especialmente si se trata de vacunas multidosis, por lo que la eficacia de los agentes conservantes es crucial para garantizar la semivida y la eficacia del producto. La efectividad del compuesto antimicrobiano en el producto final es testada siguiendo las pautas descritas en la Farmacopea Europea (apartado 5.1.3.).

El fenol al 0,5% es un bactericida comúnmente empleado, que se utiliza en las vacunas multidosis. El glicerol también se utiliza de manera amplia para inhibir el crecimiento de los microorganismos.

En el caso de las vacunas inyectables para dosis múltiples, es importante que contengan un conservante bactericida o antimicrobiano en una concentración suficiente para prevenir el desarrollo de microorganismos. Los excipientes utilizados en estos casos deben ser, preferiblemente, sustancias isotónicas que reduzcan el dolor durante la inyección. El agua es el más comúnmente empleado, y la tonicidad adecuada suele alcanzarse mediante la adición de cloruro sódico.

Adyuvantes

Los adyuvantes son sustancias que se agregan a las vacunas para aumentar su eficacia y mejorar la producción de anticuerpos en el sistema inmunológico, aunque en ocasiones se ha descrito que pueden amplificar la respuesta inflamatoria. El estudio de nuevos adyuvantes es uno de los principales temas de investigación en el campo de las vacunas.

En alergia, los compuestos más utilizados como adyuvantes de la respuesta inmunológica son las sales minerales (entre las que destacan el hidróxido de aluminio y el fosfato cálcico), las emulsiones grasas (LPS o monofosforil lípido A), los derivados microbianos y los inmunomoduladores humanos (citocinas). Recientemente, se han ensayado sistemas con partículas de carbohidratos, preparaciones de alérgenos microencapsulados o extractos de bacterias, con resultados satisfactorios. Las asociaciones de antígenos alérgicos con adyuvantes del tipo de algunas citocinas (IL-2 o interferón) están investigándose cada vez con un mayor interés debido a su potencial de estimulación antigénica, y probablemente, en un futuro, se incremente su utilización.



El hidróxido de aluminio se emplea desde hace mucho tiempo para la adsorción de los antígenos de las vacunas (tétanos, difteria, tos ferina...). En el caso de los alérgenos, su uso está ampliamente generalizado, pues permite una liberación lenta del extracto en el punto de inyección y una potenciación de la respuesta inmunológica. En un estudio realizado con veneno de himenópteros se analizó la respuesta inmunológica producida en dos grupos de pacientes³³. Un grupo se trató con extracto en solución acuosa, sin adyuvante, y el otro recibió un extracto adsorbido a hidróxido de aluminio. En ambos casos la concentración del extracto era la misma. El grupo tratado sin adyuvante presentó un mayor número de reacciones locales que el tratado con



adyuvante, y, además, este último desarrolló de forma más rápida la síntesis de IgG4; los niveles de IgE se comportaron de forma similar en ambos grupos.

Normativa legal

En el momento actual, la normativa legal en España sobre productos y vacunas alérgicas está muy poco desarrollada en general. A escala europea existe la Directiva 2001/83, que describe los productos inmunológicos, y a partir de la cual se han desarrollado las transposiciones a las legislaciones nacionales; sin embargo, en Europa no existe una armonización de los productos alérgicos.

En el Estado español, la legislación (Ley 29/2006; http://www.boe.es/g/es/bases_datos/doc.php?coleccion=iberlex&id=2006/13554) incluye los extractos alérgicos como medicamentos inmunológicos, pero exige las vacunas alérgicas individualizadas de la autorización de registro de medicamentos convencionales.

Actualmente, el Real Decreto 1345/2007 (www.boe.es/boe/dias/2007/11/07/pdfs/A45652-45698.pdf) incluye los siguientes artículos sobre productos alérgicos:

Artículo 2

Considera productos alérgicos todos los medicamentos consistentes en vacunas, toxinas, sueros y alérgenos, y define los productos alérgicos como cualquier medicamento destinado a detectar o provocar una alteración adquirida y específica en la respuesta inmunológica a un agente alergenizante. Los siguientes artículos especifican los puntos relacionados con los productos alérgicos:

- **Artículo 19.** Medicamento inmunológico.
- **Artículo 20.** Vacunas individualizadas (véase el apartado «Galénica de las vacunas alérgicas. Tipos de vacunas»): son las preparadas con agentes inmunizantes a concentración y dilución específica, en base a la correspondiente prescripción facultativa para un paciente determinado.
- **Artículo 21.** Alérgeno: todo producto destinado a identificar o provocar una modificación específica y adquirida de la respuesta inmunológica a un agente alergenizante.

Sección 2.ª. Vacunas y alérgenos

- **Artículo 44.** Vacunas individualizadas. Para las vacunas de uso individual, se podrán establecer limitaciones del alcance de lo indicado en el Anexo I («Requisitos para la autorización de medicamentos»), de acuerdo con las características de estos productos.

En otros países como Alemania, los diagnósticos y tratamientos deben estar registrados, pero no así las vacunas individuales. En Portugal no existe un registro de vacunas individuales, y en Francia las vacunas individuales requieren un registro específico.

Agradecimientos

El autor agradece la colaboración recibida de Carmen García, Visitación Estepa, Inmaculada Bel, Juan Manuel Gutiérrez, Víctor Iraola, Mayte Gallego, Eva Perea y M.ª Dolores García, de los laboratorios LETI, quienes en todo momento, y de forma desinteresada, se han prestado a facilitar el material necesario para la elaboración de este texto. Igualmente, agradece a la Dra. Carmen Moreno y al Dr. Jerónimo Carnés Isidro la revisión crítica y las sugerencias aportadas.

Bibliografía

1. Plunkett G. Stability of allergen extracts used in skin testing and immunotherapy. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008; 16(3): 285-291. [Resumen]
2. Grier TJ, LeFevre DM, Duncan EA, Esch RE. Stability of standardized grass, dust mite, cat, and short ragweed allergens after mixing with mold or cockroach extracts. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2007; 99(2): 151-160. [Resumen] [Texto completo]
3. Aalberse R. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106: 228-238. [Resumen] [Texto completo]
4. Berrens L. What is a major allergen? *Clin Exp Allergy.* 1994; 24: 606-609. [Resumen]
5. Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106(2): 228-238. [Resumen] [Texto completo]



6. Pomés A. Intrinsic properties of allergens and environmental exposure as determinants of allergenicity. *Allergy*. 2002; 57(8): 673-679. [[Resumen](#)] [[Texto completo](#)]
7. Furmonaviciene R, Shakib F. The molecular basis of allergenicity: comparative analysis of the three dimensional structures of diverse allergens reveals a common structural motif. *Mol Pathol*. 2001; 54: 155-159. [[Resumen](#)]
8. Thomas WR, Smith W. How good are carbohydrates as allergens? *Clin Exp Allergy*. 2002; 32(5): 658-661. [[Resumen](#)] [[Texto completo](#)]
9. Smith AM, Benjamin DC, Hozic N, Derewenda U, Smith WA, Thomas WR, et al. The molecular basis of antigenic cross-reactivity between the group 2 mite allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 107(6): 977-984. [[Resumen](#)] [[Texto completo](#)]
10. Carnés J, Fernández-Caldas E, Boluda L, Casanovas M, Sastre J, Lluch Bernal M, et al. Rapid release of Ole e 1 from olive pollen using different solvents. *Allergy*. 2002; 57(9): 798-804. [[Resumen](#)] [[Texto completo](#)]
11. Saridomichelakis MN, Marsella R, Lee KW, Esch RE, Farmaki R, Koutinas AF. Assessment of cross-reactivity among five species of house dust and storage mites. *Vet Dermatol*. 2008; 19(2): 67-76. [[Resumen](#)]
12. Pérez-Santos C. *Alergia a animales (edición española)*. Barcelona: IATROS Edicions, 1995.
13. Wood RA, Chapman MD, Adkinson NF, Eggleston PA. The effect of cat removal on allergen content in household dust. *J Allergy Clin Immunol*. 1989; 83: 730-735. [[Resumen](#)]
14. King TP. Immunochemical studies of stinging insect venom allergens. *Toxicon*. 1996; 34(11-12): 1.455-1.458. [[Resumen](#)]
15. Fernández-Caldas E, Carnés J, Iraola V, Casanovas M. Comparison of the allergenicity and Ole e 1 content of 6 varieties of *Olea europaea* pollen collected during 5 consecutive years. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2007; 98(5): 464-470. [[Resumen](#)] [[Texto completo](#)]
16. Fernández-Caldas E, Carnés J, Gallego M, Mari A, Pagán Alemán JA. Standardization of animal epithelia. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M*. 2006; (95): 107-116. [[Resumen](#)]
17. Moreno F, del Cuvillo A, Méndez R, García E, Lobatón P, Casanovas M. Compuestos de bajo peso molecular liberados durante el proceso de despigmentación de *Dermatophagoides pteronyssinus* inducen una respuesta Th2 en pacientes sensibilizados a ácaros. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007; 17 Supl 3: 127. [[Texto completo](#)]
18. Casanovas M, Gómez MJ, Carnés J, Fernández-Caldas E. Skin tests with native, depigmented and glutaraldehyde polymerized allergen extracts. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2005; 15(1): 30-36. [[Resumen](#)] [[Texto completo](#)]
19. Galán C, Cariñanos P, García-Mazo H, Alcázar P, Domínguez-Vilches E. Model for forecasting *Olea europaea* L. airborne pollen in South-West Andalusia, Spain. *Int J Biometeorol*. 2001; 45: 59-63. [[Resumen](#)]
20. Galán C, García-Mozo H, Cariñanos P, Alcázar P, Domínguez-Vilches E. The role of temperature in the onset of the *Olea europaea* L. pollen season in southwestern Spain. *Int J Biometeorol*. 2001; 45: 8-12. [[Resumen](#)]
21. Brighton WH, Topping MD, Henocq E. Activity units for allergen extracts. *Clin Exp Allergy*. 1979; 9: 591-596.
22. Incorvaia C, Frati F, Puccinelli P, Riario-Sforza GG, Dal Bo S. Dose dependence of efficacy and safety of subcutaneous immunotherapy. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2006; 65(1): 41-43. [[Resumen](#)]
23. Boluda L, Sastre J, Casanovas M, Fernández-Caldas E. Determination of Ole e 1 by enzyme immunoassay and scanning densitometry. Validation by skin-prick testing. *J Immunol Methods*. 1999; 223(1): 17-26. [[Resumen](#)]
24. Álvarez-Cuesta E, Bousquet J, Canonica GW, Durham SR, Malling HJ, Valovirta E, EAACI, Immunotherapy Task Force. Standards for practical allergen-specific immunotherapy. *Allergy*. 2006; 61 Supl 82: 1-20. [[Resumen](#)] [[Texto completo](#)]
25. Barber D, Polo F, Lombardero M, Villalba M, Rodríguez R. The importance of minor allergens in allergen standardization. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M*. 2006; (95): 128-134 [discusiones 134, 155]. [[Resumen](#)]
26. Van Ree R. The CREATE project: a new beginning of allergen standardization based on mass units of major allergens. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M*. 2003; (94): 70-73 [discusiones 74-75]. [[Resumen](#)]
27. Van Ree R, Chapman MD, Ferreira F, et al. The CREATE project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification. *Allergy*. 2008; 63(3): 310-326. [[Resumen](#)] [[Texto completo](#)]
28. Van Ree R; CREATE Consortium. The CREATE project: future perspectives. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M*. 2006; (95): 98-99 [discusiones 100-104]. [[Resumen](#)]
29. Carnés J, Robinson DS. New strategies for allergen immunotherapy. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2008; 2: 92-101. [[Resumen](#)]
30. Esch RE. Sublingual immunotherapy. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008; 16(3): 260-264. [[Resumen](#)]
31. Cadario G, Ciprandi G, Di Cara G, Fadel R, Incorvaia C, Marcucci F, et al. Comparison between continuous or intermittent schedules of sublingual immunotherapy for house dust mites: effects on compliance, patient satisfaction, quality of life and safety. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2008; 21(2): 471-473. [[Resumen](#)]
32. Carnés J, Himly M, Gallego M, Iraola V, Robinson D, Fernández-Caldas E, et al. Detection of allergen composition and in vivo immunogenicity of depigmented allergoids of *Betula alba*. *Clin Exp Allergy*. 2009; 39: 426-434. [[Resumen](#)]
33. Ruëff F, Wolf H, Schnitker J, Ring J, Przybilla B. Specific immunotherapy in honeybee venom allergy: a comparative study using aqueous and aluminium hydroxide adsorbed preparations. *Allergy*. 2004; 59(6): 589-595. [[Resumen](#)] [[Texto completo](#)]