

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 826 224**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/35 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)
A61J 3/00 (2006.01)
A61J 3/07 (2006.01)
C07K 16/16 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2014** **PCT/US2014/024401**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014** **WO14159607**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014** **E 14776121 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2020** **EP 2968529**

(54) Título: **Fabricación de formulaciones de maní para desensibilización oral**

(30) Prioridad:

14.03.2013 US 201361784964 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.05.2021

(73) Titular/es:

AIMMUNE THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
8000 Marina Boulevard, Suite 300
Brisbane, CA 94005-1884, US

(72) Inventor/es:

WALSER, BRYAN y
RAFF, HOWARD, V.

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 826 224 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

Fabricación de formulaciones de maní para desensibilización oral

5 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

[0001] Las alergias afectan a los seres humanos y animales de compañía y algunas reacciones alérgicas (p. ej., aquellas a los insectos, alimentos, látex, y las drogas) pueden ser tan graves como para ser potencialmente mortales.

- 10 **[0002]** Se producen reacciones alérgicas cuando el sistema inmunológico de un sujeto responde a un alérgeno. Normalmente, no se produce una reacción alérgica la primera vez que un sujeto se expone a un alérgeno en particular. Sin embargo, es la respuesta inicial a un alérgeno lo que prepara al sistema para reacciones alérgicas posteriores. En particular, el alérgeno es captado por células presentadoras de antígeno (APC; por ejemplo, macrófagos y células dendríticas) que degradan el alérgeno y luego muestran fragmentos de alérgeno a las células T. Las células T, en particular las células T "auxiliares" CD4+, responden secretando una colección de citocinas que tienen efectos sobre otras células del sistema inmunológico. El perfil de citocinas secretadas por las células T CD4+ que responden determina si las exposiciones posteriores al alérgeno inducirán reacciones alérgicas. Dos clases de células T CD4+ (Th1 y Th2; tipo auxiliar de linfocitos T) influyen en el tipo de respuesta inmune que se genera contra un alérgeno.
- 15 **[0003]** La respuesta inmune de tipo Th1 implica la estimulación de la inmunidad celular a los alergenos y agentes infecciosos y se caracteriza por la secreción de IL-2, IL-6, IL-12, IFN-gamma, y TNF-beta por células T CD4+ auxiliares y la producción de anticuerpos IgG. La exposición de células T CD4+ a alergenos también puede activar las células para que se conviertan en células Th2, que secretan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. La producción de IL-4 estimula la maduración de las células B que producen anticuerpos IgE específicos para el alérgeno. Estos anticuerpos IgE específicos de alergenos se unen a los receptores de mastocitos y basófilos, donde inician una respuesta inmune rápida a la próxima exposición al alérgeno. Cuando el sujeto se encuentra con el alérgeno por segunda vez, el alérgeno se une rápidamente a estas moléculas de IgE asociadas a la superficie, lo que produce la liberación de histaminas y otras sustancias que desencadenan reacciones alérgicas. Se sabe que los sujetos con altos niveles de anticuerpos IgE son particularmente propensos a las alergias.
- 20 Yonghua Zhuang et al, "Redefining the major peanut allergens", Immunologic Research, vol. 55, nº 1 - 3, páginas 125 - 134: tiene como objetivo identificar las proteínas que son los alergenos más activos en el maní. Yonghua Zhuang et al concluyeron que Ara h 2 y Ara h 6 son los principales alergenos del maní.
- 25 Fung Irene et al, "Relating microarray component testing and reported food allergy and food-triggered atopic dermatitis: a real-world analysis", Annals of Allergy, Asthma & Immunology, vol. 110, nº 3, páginas 173 - 177: tiene como objetivo caracterizar las asociaciones entre los resultados de un sistema de microarrays automatizado y la alergia alimentaria autoinformada y la dermatitis atópica desencadenada por alimentos. El sistema de microarrays automatizado analizó los componentes de la leche (Bos d 4, Bos d 5, Bos d 8, Bos d lactoferrina), huevo (Gal d 1, Gal d 2, Gal d 3, Gal d 5) y maní (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 y Ara h 6). Fung et al concluyeron que una gran diversidad de componentes de alergenos alimentarios se relaciona bien con los antecedentes autoinformados de alergia alimentaria y dermatitis atópica asociada a alimentos.
- 30 Singh, H. y col. (2011) se relaciona con un estudio de varias condiciones de RP-HPLC para detectar alergenos del maní. Pingali, K. et al. (2011) se relaciona con un estudio de los efectos del orden de mezcla de Cab-O-Silo y estearato de magnesio y microcapas durante la mezcla sobre las propiedades de la mezcla y la tableta.
- 35 Koppleman, SJ y col. (1999) se relaciona con un estudio de cambios conformatacionales inducidos por calor de Ara h1. Lehmann, K. et al. (2006) se relaciona con un estudio de la estructura y estabilidad de los alergenos del maní de tipo albúmina 2S y las implicaciones para la gravedad de las reacciones alérgicas al maní.
- 40 O'Connell R. (2012) se relaciona con el uso de tamices en la industria farmacéutica y la demanda de contaminación reducida.
- 45 Fu, TJ (2013) se relaciona con el impacto del procesamiento térmico en la detección ELISA de alergenos del maní.
- 50 **SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

[0004] La invención proporciona un método de monitorización de la consistencia y la estabilidad de los alergenos de maní lote a lote durante la producción de formulaciones encapsuladas de alergenos de maní caracterizados (CPA), dichas formulaciones se basan en harina de maní y de ser adecuadas para desensibilización oral, en donde dicho método comprende:

- 60 - determinar por RP-HPLC la relación de concentración de cada una de las proteínas Ara h1, Ara h2 y Ara h6 con respecto al contenido total de proteína de maní y entre sí en dicha harina de maní;
- comparar dichas proporciones entre dichos lotes de harina de maní.

[0005] La invención también proporciona un método de fabricación de formulaciones de alergenos de maní caracterizados de harina de maní, que comprende:

- 65 (a) mezclar harina de maní, diluyente, deslizante y/o lubricante,
(b) descargar el material mezclado,

- (c) hacer pasar el material mezclado a través de un tamiz de malla, y
- (d) encapsular el polvo mezclado,

5 en donde la harina a mezclar en la etapa (a) se selecciona de un lote que se evaluó mediante el método definido anteriormente.

10 [0006] En el presente documento se describe un método para preparar una formulación en cápsula de dosis baja útil en los métodos proporcionados aquí, que comprende: (a) mezclar harina de maní y diluyente en una primera mezcla; (b) añadir aproximadamente un 45% de diluyente en una segunda mezcla; (c) añadir el diluyente restante en una tercera mezcla; (d) añadir un deslizante y/o lubricante en una mezcla final; y (e) encapsular el polvo mezclado en una cápsula. En un aspecto, el diluyente de la etapa (a) comprende almidón o lactosa, celulosa microcristalina (Avicel®) o fosfato dicálcico. En otra realización, el diluyente de la etapa (b) y/o (c) comprende almidón, lactosa, celulosa microcristalina (Avicel®) o fosfato dicálcico. En otra realización, el deslizante del paso (d) el deslizante del paso (d) comprende dióxido de silicio coloidal (Cab-O-Silo), talco (*p. ej.*, Ultra Talc 4000) o combinaciones de los mismos. En otro aspecto, el lubricante del paso (d) comprende estearato de magnesio. En un ejemplo no limitativo, el deslizante comprende CabO-Sil. En un aspecto, el paso (d) comprende añadir un deslizante o un lubricante. En otro aspecto, el paso (d) comprende añadir un deslizante y un lubricante. En otro aspecto, el método comprende además tomar muestras de la mezcla combinada una o más veces antes de la encapsulación. En otra realización, la dosis comprende aproximadamente 0,5 o aproximadamente 1,0 mg de proteína de maní. En otro aspecto de los métodos descritos, la etapa (d) comprende además pasar el material mezclado a través de una pantalla de malla.

20 [0007] En el presente documento se describe un método para preparar una formulación de cápsula de dosis más alta útil en los métodos proporcionados aquí, que comprende: (a) mezclar harina de maní y diluyente en una primera mezcla; (b) descargar el material mezclado; (c) hacer pasar el material mezclado a través de un tamiz de malla y mezclar el material tamizado en una segunda mezcla; (d) añadir un deslizante y/o lubricante en una tercera mezcla; y (e) encapsular el polvo mezclado. En una realización, el método comprende opcionalmente tomar muestras del material mezclado de la etapa (d) una o más veces antes de la encapsulación. En otra realización más, el diluyente de la etapa (a) comprende almidón, lactosa o celulosa microcristalina (Avicel®) o fosfato dicálcico. En otra realización, la pantalla de malla del paso (c) comprende una pantalla de malla nº 20. En otra realización, el deslizante del paso (d) el deslizante del paso (d) comprende dióxido de silicio coloidal (Cab-O-Silo), talco (*p. ej.*, Ultra Talc 4000) o combinaciones de los mismos. En otra realización, el deslizante del paso (d) comprende Cab-O-Sil. En otra realización, el lubricante del paso (d) comprende estearato de magnesio. En una realización, la etapa (d) comprende añadir un deslizante o un lubricante. En otra realización, la etapa (d) comprende añadir un deslizante y un lubricante. En otra realización, la dosis comprende aproximadamente 10, aproximadamente 100 o aproximadamente 475 mg de proteína de maní.

25 [0008] Aquí se describe un método para preparar una formulación en cápsula útil en los métodos proporcionados aquí, que comprende pasar harina de maní a través de una malla; y encapsular el polvo mezclado. En una realización, la dosis comprende aproximadamente 475 mg de proteína de maní.

30 [0009] En cualquiera de tales métodos, la harina de maní comprende proteínas de maní caracterizadas Ara h1, Ara h2 y Ara h6. La concentración de Ara h1, Ara h2 y Ara h6 se caracteriza por RP-HPLC. En otro aspecto, la concentración de Ara h1, Ara h2 y Ara h6 es al menos una cantidad de un patrón de referencia.

35 [0010] Una formulación encapsulada producida por cualquiera de los métodos descritos aquí puede ser estable durante al menos aproximadamente 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 o más meses.

40 [0011] En un aspecto, la formulación encapsulada es estable a una temperatura de aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C o desde aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C.

45 [0012] En otro aspecto, la formulación encapsulada es estable a una temperatura de aproximadamente 20°C, aproximadamente 21°C, aproximadamente 22,5°C, aproximadamente 23°C, aproximadamente 24°C, aproximadamente 25°C, aproximadamente 26°C, aproximadamente 27,5°C, aproximadamente 28°C, aproximadamente 29°C o aproximadamente 30°C.

50 [0013] Un tamaño de la cápsula A que puede ser utilizada para mantener las formulaciones producidas por los métodos descritos aquí puede ser, por ejemplo, tamaño 3, 00 o 000. En una realización, la cápsula comprende hidroxipropilo metilo celulosa (HPMC).

55 [0014] Los métodos descritos en este documento pueden comprender además almacenar una formulación en un medio contenedor. Se puede usar cualquier medio de recipiente adecuado para almacenar las formulaciones encapsuladas descritas en este documento. En un aspecto, el medio contenedor puede ser, por ejemplo, una botella. Una botella puede ser, por ejemplo, una botella de color ámbar para minimizar la exposición de las formulaciones encapsuladas a la luz ultravioleta. En otro aspecto, el medio contenedor comprende además un paquete desecante para controlar el contenido de humedad del medio contenedor.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0015] Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que establece realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los cuales:

- Figura 1: Extracto de harina de maní a 214 nm usando HPLC de fase inversa. También se muestran los estándares USDA Ara h, junto con una solución de BSA de 1 mg/ml. Los extractos son los siguientes: Panel superior: harina de maní, extracto de pH 8,2; segundo panel: pico Ara h1; tercer panel: pico Ara h2; cuarto panel: pico Ara h6; panel inferior: solución de BSA a 1 mg/ml.
- Figura 2: Resultados cromatográficos del análisis RP-HPLC de 112FA02411 (GMP).
- Figura 3: Resultados cromatográficos del análisis RP-HPLC de 112FA02411 (no GMP).
- Figura 4: Resultados cromatográficos del análisis RP-HPLC de 111FA36211 (no GMP).
- Figura 5: Tinción de proteína total de proteínas Ara h reunidas y purificadas por RP-HPLC.
- Figura 6: Inmunotransferencias de proteínas Ara h reunidas y purificadas por RP-HPLC.
- Figura 7: Diagrama de flujo del proceso de mezcla para cápsulas de dosis baja (0,5 mg y 1 mg).
- Figura 8: Proceso de mezcla para las cápsulas de dosis alta (al menos 10 mg).
- Figura 9: Resultados cromatográficos del análisis RP-HPLC de 112FA02411 (GMP).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0016] En la presente memoria se describen sistemas y métodos que aíslan proteínas de la harina de maní, que pueden usarse para fabricar composiciones farmacéuticas para el tratamiento de alergias al maní. Los sistemas y métodos utilizan cromatografía líquida (HPLC) de alta presión (fase) para capturar Ara h1, Ara h2 y Ara h6 de la harina de maní.

[0017] Durante la última década, se ha aprendido mucho acerca de los alérgenos en maní. El maní se asocia comúnmente con reacciones graves, incluida la anafilaxia potencialmente mortal. El estándar actual de atención en el manejo de la alergia alimentaria es la evitación dietética de los alimentos y la educación del sujeto/familia en el manejo agudo de una reacción alérgica. La carga de evitar y el miedo constante a la exposición accidental impacta negativamente en la calidad de vida relacionada con la salud tanto de los sujetos como de sus familias. Las encuestas de calidad de vida indican que las familias con niños que tienen alergias a los alimentos tienen un impacto significativo en la preparación de alimentos, las actividades sociales, la búsqueda de cuidado infantil adecuado, la asistencia a la escuela y el nivel de estrés, entre otras cosas.

[0018] En la actualidad, el único tratamiento para la alergia al maní es una dieta libre de maní y el fácil acceso a la epinefrina autoinyectable. Sin embargo, las dietas de evitación estricta pueden complicarse debido a la dificultad para interpretar las etiquetas y por la presencia de alérgenos no declarados u ocultos en los alimentos preparados comercialmente. Lamentablemente, las ingestiones accidentales son comunes, y hasta el 50% de los sujetos alérgicos a los alimentos tienen una reacción alérgica durante un período de dos años. Las reacciones alérgicas al maní pueden ser graves y potencialmente mortales; y las alergias al maní y/o nueces de árbol representan la gran mayoría de las anafilaxias fatales inducidas por alimentos. Esta combinación de dietas de evitación estrictas, la alta incidencia de exposiciones accidentales y el riesgo de reacciones graves o incluso mortales con exposiciones accidentales añade una carga y un estrés tremendo a los sujetos y sus familias. Para complicar aún más las cosas, está el hecho de que solo alrededor del 20% de los niños superarán la alergia al maní, lo que significa que la mayoría de las personas con alergia al maní la tendrán por el resto de sus vidas. Si unimos la creciente prevalencia y el aumento del consumo de maní en los países occidentales con el hecho de que solo aproximadamente 1 de cada 5 superará su alergia, que las reacciones alérgicas tienen el potencial de ser graves o incluso mortales, y que las exposiciones accidentales son comunes, desarrollar un tratamiento eficaz para la alergia al maní se vuelve aún más imperativo.

[0019] La inmunoterapia específica para alergia a los alimentos, en la alergia al maní en particular, en las formas de inmunoterapia oral (ITO) y la inmunoterapia sublingual (SLIT) ha sido estudiada en los últimos años y ha demostrado el fomento de seguridad y resultados de eficacia en los ensayos clínicos tempranos, incluyendo cambios beneficiosos inmunológicos. La ITO ha mostrado evidencia de inducir la desensibilización en la mayoría de los sujetos con cambios inmunológicos a lo largo del tiempo que indican una progresión hacia la tolerancia clínica.

[0020] Maní ITO: En Jones *et al.*, los niños alérgicos al maní se sometieron a un protocolo de ITO que consistía en un día de aumento de la dosis inicial, un aumento quincenal (a 2 g) y una fase de mantenimiento diario seguida de un EAO. Después de tolerar menos de 50 mg de proteína de maní durante una exposición alimentaria oral (EAO) al inicio del estudio, 27 de los 29 sujetos ingirieron 3,9 g de proteína de maní al completar el protocolo de ITO.

[0021] Recientemente, el Dr. Wesley Burks. (American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology National Conference. Orlando, Florida, 6 de marzo de 2012) presentó un trabajo que muestra que 10 niños con AP completaron un protocolo de ITO y se sometieron a una exposición alimentaria oral (EAO) 4 semanas después de suspender la ingesta oral de maní para evaluar el desarrollo de una "falta de respuesta sostenida" clínica. Tres de cada 10 sujetos

aprobaron la EAO; los autores consideraron a estos sujetos como clínicamente tolerantes. Durante el transcurso del tratamiento, los niveles de IgE de maní inferiores a 85 kU/L en un punto de tiempo de 3 meses después de la ITO fueron predictivos de sujetos que se volvieron inmunes tolerantes.

5 [0022] Un estudio controlado con placebo A multicéntrico doble ciego aleatorizado reportado por Varshney, *et al.*, examinó veintiocho sujetos. Tres sujetos se retiraron al principio del estudio debido a efectos secundarios alérgicos. Despues de completar la sobredosis, se realizó una exposición alimentaria doble ciego controlada con placebo, en donde todos los sujetos restantes con ITO de maní (n = 16) ingirieron la dosis máxima acumulada de 5000 mg (aproximadamente 20 maní), mientras que los sujetos con placebo (n = 9) sólo pudieron tolerar una dosis acumulada media de 280 mg (rango, 0-1900 mg; p <0,001). En contraste con el grupo de placebo, el grupo de ITO de maní mostró reducciones en el tamaño de la prueba de punción cutánea (P <0,001) y aumentos en la IgG4 específica de maní (P <0,001). Los sujetos con ITO de maní tuvieron aumentos iniciales en la IgE específica de maní (P <0,01) pero no mostraron un cambio significativo desde el inicio en el momento de la exposición alimentaria oral.

15 DEFINICIONES

20 [0023] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que las invenciones descritas en el presente documento pertenecen.

25 [0024] El término "animal", como se usa aquí, se refiere a seres humanos así como animales no humanos, incluyendo, por ejemplo, mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces. Preferiblemente, el animal no humano es un mamífero (p. ej., un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, un primate o un cerdo). Un animal puede ser un animal transgénico.

30 [0025] El término "antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que provoca la producción de una respuesta de anticuerpos (es decir, una respuesta humoral) y/o una reacción antígeno-específica con células T (es decir, una respuesta celular) en un animal.

35 [0026] El término "alérgeno", como se usa en el presente documento, se refiere a un subconjunto de antígenos que provocan la producción de IgE en adición a otros isotipos de anticuerpos. Los términos "alérgeno", "alérgeno natural" y "alérgeno de tipo silvestre" pueden usarse indistintamente. Los alérgenos preferidos para el propósito de la presente invención son los alérgenos proteicos.

40 [0027] La frase "reacción alérgica", como se usa aquí, se refiere a una respuesta inmune que es IgE mediada con síntomas clínicos que afectan principalmente los sistemas cutáneo (p. ej., urticaria, angioedema, prurito), respiratorio (p. ej., sibilancias, tos, laríngeo edema, rinorrea, ojos llorosos/picazón), gastrointestinal (p. ej., vómitos, dolor abdominal, diarrea) y cardiovascular (es decir, si ocurre una reacción sistémica). Para los propósitos de la presente invención, una reacción asmática se considera una forma de reacción alérgica.

45 [0028] La frase "alergeno anafiláctico", como se usa en el presente documento, se refiere a un subconjunto de los alérgenos que son reconocidos para presentar un riesgo de reacción anafiláctica en individuos alérgicos cuando se encuentran en su estado natural, en condiciones naturales. Por ejemplo, los alérgenos del polen, los alérgenos de los ácaros, los alérgenos en la caspa o las excreciones de animales (p. ej., saliva, orina) y los alérgenos de los hongos no se consideran alérgenos anafilácticos. Por otro lado, los alérgenos alimentarios, los alérgenos de insectos y los alérgenos del caucho (p. ej., del látex) generalmente se consideran alérgenos anafilácticos. Los alérgenos alimentarios son alérgenos anafilácticos. En particular, legumbres (maní), alérgenos de frutos secos (p. ej., de nuez, almendra, anacardo, avellana, pistacho, piñón, nuez de Brasil), alérgenos lácteos (p. ej., de huevo, leche), alérgenos de semillas (p. ej., de sésamo, amapola, mostaza), soja, trigo y alérgenos de mariscos (p. ej., de pescado, camarón, cangrejo, langosta, almejas, mejillones, ostras, vieiras, cangrejos de río) son alérgenos alimentarios anafilácticos. Los alérgenos anafilácticos particularmente interesantes son aquellos a los que las reacciones suelen ser tan graves que crean un riesgo de muerte.

55 [0029] La frase "anafilaxia" o "reacción anafiláctica", como se usa en el presente documento, se refiere a un subconjunto de reacciones alérgicas caracterizadas por la degranulación de mastocitos secundaria a la reticulación de la alta afinidad del receptor de IgE en los mastocitos y los basófilos inducida por un alérgeno anafiláctico con posterior liberación de mediador y producción de respuestas patológicas sistémicas graves en órganos diana, por ejemplo, vías respiratorias, tracto digestivo de la piel y sistema cardiovascular. Como se conoce en la técnica, la gravedad de una reacción anafiláctica se puede controlar, por ejemplo, ensayando reacciones cutáneas, hinchazón alrededor de los ojos y la boca, vómitos y/o diarrea, seguidas de reacciones respiratorias tales como sibilancias y dificultad para respirar. Las reacciones anafilácticas más graves pueden provocar la pérdida del conocimiento y/o la muerte.

60 [0030] La frase "célula presentadora de antígeno" o "APC", como se usa aquí, se refiere a células que procesan y presentan antígenos a las células T para provocar una respuesta específica de antígeno, p. ej., macrófagos y células dendríticas.

5 [0031] Cuando dos entidades están "asociadas" unas a otras como se describe en el presente documento, que están unidas por una interacción covalente o no covalente directa o indirecta. Preferiblemente, la asociación es covalente. Interacciones deseables no covalentes incluyen, por ejemplo, enlace de hidrógeno, interacciones van der Walls, interacciones hidrófobas, interacciones magnéticas, etc.

10 [0032] La frase "reacción anafiláctica disminuida", como se usa aquí, se refiere a una disminución en los síntomas clínicos después del tratamiento de síntomas asociados con la exposición a un alérgeno anafiláctico, que puede implicar exposición a través de superficies cutáneas, respiratorias, gastrointestinales y mucosas (p. ej., oculares, nasales y auditivas) o una inyección subcutánea (p. ej., a través de una picadura de abeja).

15 [0033] El término "epítopo", como se usa aquí, se refiere a un sitio de unión que incluye un motivo de aminoácido de entre aproximadamente seis y quince aminoácidos que pueden ser vinculados por una inmunoglobulina (p. ej., IgE, IgG, etc.) o reconocidos por un receptor de células T cuando se presenta por una APC junto con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Un epítopo lineal es aquel en donde los aminoácidos se reconocen en el contexto de una secuencia lineal simple. Un epítopo conformacional es aquel en donde los aminoácidos se reconocen en el contexto de una estructura tridimensional particular.

20 [0034] Un "fragmento" de alérgeno de acuerdo con la presente invención es cualquier parte o porción del alergeno que es más pequeña que el alergeno natural intacto. En realizaciones preferidas de la invención, el alérgeno es una proteína como se define en las reivindicaciones y el fragmento es un péptido.

25 [0035] La frase "epítopo inmunodominante", como se usa en el presente documento, se refiere a un epítopo que está unido por el anticuerpo en un gran porcentaje de la población sensibilizada o cuando el título del anticuerpo es alta, en relación con el porcentaje o título de la reacción anticuerpo a otros epítopos presentes en el mismo antígeno. En un aspecto, un epítopo inmunodominante está unido por un anticuerpo en más del 50% de la población sensible, más preferiblemente más del 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99%.

30 [0036] La frase "secuencias inmunoestimulantes" o "ISS", como se usa aquí, se refiere a oligodesoxinucleótidos de origen bacteriano, viral, o invertebrado que se toman arriba por las APC y las activan para expresar ciertos receptores de membrana (p. ej., B7-1 y B7-2) y secretan varias citocinas (p. ej., IL-1, IL-6, IL-12, TNF). Estos oligodesoxinucleótidos contienen motivos CpG sin metilar y cuando se inyectan en animales junto con un antígeno, parecen sesgar la respuesta inmune hacia una respuesta de tipo Th1. Véase, por ejemplo, Yamamoto et al., *Microbiol. Immunol.* 36: 983, 1992; Krieg y col., *Nature* 374: 546, 1995; Pisetsky, *Immunity* 5: 303, 1996; y Zimmerman y col., *J. Immunol.* 160: 3627, 1998.

35 [0037] Como se usa en este documento, los términos "que comprende", "incluyendo", y "tal como" se utilizan en su sentido abierto, no limitante.

40 [0038] El término "aproximadamente" se usa como sinónimo del término "aproximadamente". Como entendería un experto en la técnica, el límite exacto de "aproximadamente" dependerá del componente de la composición. De manera ilustrativa, el uso del término "aproximadamente" indica valores ligeramente fuera de los valores citados, es decir, más o menos del 0,1% al 10%, que también son eficaces y seguros. En otro aspecto, el uso del término "aproximadamente" indica que valores ligeramente fuera de los valores citados, es decir más o menos 0,1% a 5%, que también son eficaces y seguros. En otro aspecto, el uso del término "aproximadamente" indica valores ligeramente fuera de los valores citados, es decir, más o menos 0,1% a 2%, que también son eficaces y seguros.

45 [0039] "Aislado" (usado de forma intercambiable con "sustancialmente puro") cuando se aplica a polipéptidos significa un polipéptido o una porción del mismo, que ha sido separado de otras proteínas con las que se produce naturalmente. Normalmente, el polipéptido también se separa sustancialmente (es decir, de al menos aproximadamente un 70% a aproximadamente un 99%) de sustancias tales como anticuerpos o matrices de gel (poliacrilamida) que se utilizan para purificarlo.

50 Formulaciones

55 [0040] formulaciones descritas en el presente documento incluyen uno o más ingredientes activos. Los ingredientes activos pueden aislarse de la harina de maní que puede obtenerse de cualquier fuente tal como, por ejemplo, Golden Peanut Company. La harina de maní puede ser de aproximadamente un 10% a aproximadamente un 15%, o aproximadamente un 12% de harina de maní desgrasada molida a partir de maní ligeramente tostado. La harina de maní puede, en algunos casos, ser liberada por un proveedor después de un análisis estándar de contenido y microbiología, y puede ser estable durante 9-12 meses bajo refrigeración. La harina de maní puede formularse, encapsularse y ensayarse antes de su administración a un sujeto.

60 [0041] Para el análisis de la harina de maní, la sustancia base (BS) y la formulación final, un ensayo de HPLC de fase inversa (RPHPLC) se ha desarrollado que separa tres maní alergenos proteicos harina: Ara h1, Ara h2 y Ara h6. Este ensayo forma la base para las pruebas de identidad y contenido en el momento del lanzamiento y durante la

estabilidad. El ensayo de HPLC de fase inversa se puede utilizar como ensayo de identificación y se utiliza para controlar la consistencia y la estabilidad de un lote a otro de los alérgenos de maní aceptables para la producción de la formulación de alérgenos de maní caracterizados.

5 [0042] Caracterización adicional de los alérgenos de proteínas también se puede realizar usando inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y análisis de gel.

10 [0043] Los maníes y la harina de maní son alimentos y aditivos comunes que se encuentran en muchas formulaciones alimentarias. El uso clínico previsto para el alérgeno de maní caracterizado identificado por los presentes inventores se encuentra en cantidades relativamente pequeñas (0,5 a 4000 mg/dosis) en comparación con las cantidades contenidas en los alimentos y puede administrarse por la misma vía que los productos que contienen maní ingerido por vía oral.

15 [0044] Las formulaciones descritas en el presente documento se pueden probar en un estudio multicéntrico controlado con placebo para demostrar la seguridad y eficacia del alérgeno de maní caracterizado en sujetos de aproximadamente 4 a aproximadamente 26 años de edad con reacciones clínicas moderadas a graves a la ingestión de maní. Se pueden excluir los sujetos con afecciones de salud concomitantes importantes, asma no controlada o ingreso previo a una unidad de cuidados intensivos debido a anafilaxia. Los medicamentos antialérgicos estándar (p. ej., antihistamínicos, corticosteroides orales, etc.) se pueden permitir durante el mantenimiento y mientras se aumenta 20 la dosis con el alérgeno caracterizado del maní (CPA).

25 [0045] Una formulación que comprende alérgeno de maní caracterizado (CPNA) puede incluir proteína de maní (que comprende proteínas alergénicas de maní Ara h1, Ara h2 y Ara h6) formulada con uno o más diluyentes, uno o más deslizantes, uno o más lubricantes y, opcionalmente, uno o más agentes de relleno, en dosis graduadas, que comprenden cápsulas que contienen aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 100 mg y aproximadamente 1000 mg cada una de proteína de maní. Cada cápsula puede abrirse y mezclarse el contenido con un alimento que enmascara el sabor inmediatamente antes de la administración.

30 [0046] Un ingrediente activo farmacéutico se obtiene inicialmente como maní crudo, *Arachis hypogaea*, un miembro de la familia de las leguminosas. El maní crudo puede obtenerse de múltiples fuentes agrícolas, donde el maní crudo sin cáscara se procesa en un 12% de harina de maní tostado (PF) desgrasada. El PF puede comprender un certificado de análisis (C de A) para su posterior procesamiento en condiciones cGMP.

35 [0047] La formulación, llenado y prueba de las cápsulas de CPNA se pueden realizar en un sitio de fabricación por contrato de cGMP. En las condiciones de fabricación de cGMP, la harina de proteína (PF), que se compone de aproximadamente 50% de proteína de maní p/p, se mezcla con uno o más diluyentes, uno o más deslizantes y uno o más lubricantes.

40 [0048] En un aspecto, una composición comprende uno o más diluyentes. Los "diluyentes" para usar en las formulaciones incluyen, pero no se limitan a, ácido algínico y sales del mismo; derivados de celulosa tales como carboximetilcelulosa, metilcelulosa (p. ej., Methocel®), hidroxipropilmelcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa (p. ej., Klucel®), etilcelulosa (p. ej., Ethocel®), celulosa microcristalina (p. ej., Avicel®); celulosa microcristalina silicificada; dextrosa microcristalina; amilosa; silicato de magnesio y aluminio; ácidos polisacáridos; bentonitas; gelatina; polivinilpirrolidona/copolímero de acetato de vinilo; crospovidona; povidona; almidón; almidón pregelatinizado; tragacanto, dextrina, un azúcar, como sacarosa (p. ej., Dipac®), glucosa, dextrosa, melaza, manitol, sorbitol, xilitol (p. ej., Xylitab®), lactosa (p. ej., lactosa monohidrato, lactosa anhidra, etc.); fosfato dicálcico; una goma natural o sintética como acacia, tragacanto, goma ghatti, mucílago de cáscaras de isapol, polivinilpirrolidona (p. ej., Polyvidone® CL, Kollidon® CL, Polyplasdone® XL-10), arabogalactan de alerce, Veegum®, polietilenglicol, ceras, alginato de sodio, un almidón, por ejemplo, un almidón natural tal como almidón de maíz o almidón de patata, un almidón pregelatinizado tal como Colorcon (Starch 1500), National 1551 o Amijel®, o almidón glicolato de sodio tal como Promogel® o Explotab®; un almidón reticulado tal como almidón glicolato de sodio; un polímero reticulado como crospovidona; una polivinilpirrolidona reticulada; alginato tal como ácido algínico o una sal de ácido algínico tal como alginato de sodio; una arcilla tal como Veegum® HV (silicato de magnesio y aluminio); una goma como agar, guar, algarroba, Karaya, pectina o tragacanto; glicolato de almidón de sodio; bentonita; una esponja natural; un tensioactivo; una resina tal como una resina de intercambio catiónico; pulpa de cítricos; Laurilo Sulfato de Sodio; laurilo sulfato de sodio en almidón combinado; y combinaciones de los mismos. En un aspecto, la formulación comprende celulosa microcristalina o almidón de 1500. En otro aspecto, la formulación comprende celulosa microcristalina y almidón 1500.

60 [0049] Los deslizantes adecuados (agentes antiaglomerantes) para uso en las formas de dosificación sólidas se describen en el presente documento incluyen, pero sin limitación, dióxido de silicio coloidal (Cab-O-Silo), talco (p. ej., Ultra Talc 4000) y combinaciones de los mismos. En un aspecto, la composición comprende Cab-O-Sil.

65 [0050] Los lubricantes adecuados para uso en las formas de dosificación sólidas descritas en este documento incluyen, pero no se limitan a, ácido esteárico, hidróxido de calcio, talco, almidón de maíz, fumarato de estearilo de sodio, metal alcalino y sales de metales alcalinotérreos, tales como aluminio, calcio, magnesio, zinc, ácido esteárico, estearatos de

5 sodio, estearato de magnesio, estearato de zinc, ceras, Stearowet®, ácido bórico, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, leucina, un polietilenglicol o un metoxipolietilenglicol como Carbowax™, PEG 4000, PEG 5000, PEG 6000, propilenglicol, oleato de sodio, behenato de glicerilo, palmitoestearato de glicerilo, benzoato de glicerilo, laurilo sulfato de magnesio o sodio y combinaciones de los mismos. En una realización, la composición comprende estearato de magnesio. En otra realización, la composición comprende estearilo fumarato de sodio.

10 [0051] En algunos aspectos, una formulación puede comprender además uno o más agentes de relleno. Los "agentes de relleno" incluyen compuestos tales como lactosa, carbonato de calcio, fosfato de calcio, fosfato de calcio dibásico, sulfato de calcio, celulosa microcristalina, polvo de celulosa, dextrosa, dextratos, dextrano, almidones, almidón pregelatinizado, sacarosa, xilitol, lactitol, manitol, sorbitol, cloruro de sodio, polietilenglicol y combinaciones de los mismos.

15 [0052] Los ingredientes descritos en el presente documento se pueden mezclar de acuerdo, por ejemplo, con los procesos ilustrados en las Figuras 7 y 8. Las formulaciones mixtas se pueden encapsular posteriormente como 0,5, 1, 10, 100 mg, 475 mg y 1000 mg de proteína de maní en tamaño 3, 00 o 000. Cápsulas de hidroxipropilmetylcelulosa (HPMC). Los estudios de compatibilidad pueden evaluar combinaciones de la harina de maní con uno o más de los excipientes, que pueden tener, en algunos casos, reconocimiento GRAS. El diluyente brinda la oportunidad de formular las dosis bajas y altas para contener un volumen adecuado para la dispersión de la cápsula abierta. El deslizante y el lubricante añaden fluidez al PF de maní en la medida que el sujeto o el médico vacía fácilmente la cápsula de harina en el momento de la administración. Para los ensayos clínicos, las cápsulas se pueden envasar a granel en un medio contenedor como, por ejemplo, botellas. En algunos casos, los medios de recipiente pueden tratarse para evitar (parcial o totalmente) la exposición a la luz. Por ejemplo, un recipiente puede ser de color ámbar. Un medio contenedor también puede, en algunos casos, contener un desecante para evitar (parcial o totalmente) la exposición a la humedad durante el transporte y el almacenamiento. En el momento de su uso, las cápsulas que contienen CPNA se pueden abrir y el contenido se puede mezclar con el alimento que enmascara el sabor inmediatamente antes de la administración.

20 [0053] Con el fin de estandarizar la entrega de los alérgenos de proteínas de maní, una formulación de alérgeno de maní caracterizado fabricado de CGMP (CPNA) ha sido desarrollado. El contenido de proteínas de la formulación es fundamental desde dos aspectos. Primero, la proteína total administrada debe ser constante entre lotes y, segundo, debe controlarse la proporción de alérgenos individuales críticos.

25 [0054] El contenido total de proteína de la sustancia a granel y la liberación de formulación final puede ser cuantificada usando métodos de determinación de proteínas descritas en este documento que se ocupan de los problemas actuales en la industria: a saber, antes de la presente solicitud el establecimiento de las cantidades absolutas o relativas de los alérgenos de proteínas de maní individuales en la harina de maní es más problemática y no ha sido controlada.

30 [0055] La proteína de maní se compone de varios alérgenos de proteínas individuales normalmente detectables por gel de poliacrilamida electroforesis e inmunotransferencia usando antisueros policlonales específicos de alérgeno de los seres humanos alérgicos o animales inmunizados. De estas proteínas, basadas en la inmunotransferencia, la reactividad contra extractos de maní crudo por sueros humanos de humanos alérgicos al maní y la liberación de histamina *in vitro* de basófilos sensibilizados, Ara h1, Ara h2 y Ara h6 se han identificado como alérgenos de proteína de maní alergénicos, con Ara h2 y Ara h6 contribuyendo con la mayor parte de la actividad alergénica del extracto de maní crudo.

35 [0056] Antes de este documento, las proteínas alergénicas de maní típicamente han sido fraccionados de extractos de maní crudo por cromatografía de exclusión por tamaño (CET) o electroforesis en gel de poliacrilamida. Estas técnicas pueden presentar una visión relativa del espectro de proteínas Ara, pero no proporcionan la resolución y sensibilidad necesarias para comparar la expresión individual de alérgenos de maní entre lotes de harina de maní, ni posibles cambios en la estructura de la proteína a lo largo del tiempo. Para abordar estas limitaciones, los presentes inventores han desarrollado un método de HPLC de fase inversa (RP-HPLC) para mejorar la resolución y permitir la separación física de los alérgenos del maní Ara h1, Ara h2 y Ara h6.

40 [0057] Un ensayo fue desarrollado para la determinación y caracterización de proteínas alergénicas Ara h1, 2 y 6 en harina de maní tostado. Se modificó un procedimiento de extracción simple de una sola etapa utilizando tampón Tris a pH 8,2, seguido de centrifugación y filtración. Las muestras se preparan a 100 mg/mL y se extraen a 60°C durante 3 horas. El filtrado puro final es adecuado para análisis directo por HPLC.

45 [0058] La separación de HPLC utiliza una separación de fase inversa usando una columna de poro ancho 300 Å de sílice con una fase estacionaria butilo enlazada. Puede emplearse un gradiente binario basado en ácido trifluoroacético al 0,1% y acetonitrilo. La fase móvil puede ser compatible con la espectrometría de masas. La detección se puede lograr con un detector de UV a 214 nm, ya que la sensibilidad se puede reducir con la detección a 280 nm.

50 [0059] La especificidad del método se puede determinar comparando los tiempos de retención y los patrones de pico del extracto de maní completo con las proteínas Ara h. Los picos de la proteína Ara h principal, en algunos casos, pueden no resolverse como entidades discretas, sino que pueden aparecer como conjuntos de muchas proteínas

similares. Por tanto, los alérgenos Ara h1, Ara h2 y Ara h6 pueden aparecer como grupos de picos dentro de una región de tiempo de retención. Por consiguiente, la cantidad relativa de una proteína Ara h particular se determina luego como el porcentaje del área total dentro de una región de elución definida. Se evalúa la resolución cromatográfica de las diversas regiones y el método puede ser útil para comparar diferencias sutiles en estos patrones regionales para diferentes lotes y fuentes de proteínas de harina de maní y la estabilidad de la formulación.

[0060] Una serie cromatográfica ejemplar representativa a 214 nm se muestra en la Figura 1 comparando el extracto crudo (panel superior) con perfiles de proteínas purificadas Ara h1, Ara h2 y Ara h6 y BSA.

- [0061]** La precalificación del método RP-HPLC se puede evaluar comparando tres preparaciones independientes de un solo lote de harina de maní, comparando los resultados de ensayos repetidos realizados por dos analistas diferentes en dos días diferentes, o comparando los resultados de preparaciones independientes de diferentes lotes de harina de maní en el mismo día o en días diferentes.
- [0062]** La precisión se puede estimar realizando la extracción de una única muestra por triplicado y analizando los resultados de acuerdo con el método propuesto (ver, por ejemplo, la **Tabla 1**). Se realizan extracciones y determinaciones por triplicado de un solo lote de harina de maní; los valores reportados son el porcentaje de área de cada especie de Ara h. La integración de los picos se puede realizar mediante el uso de eventos de integración forzada en un sistema de datos (p. ej., ChemStation) o la integración manual. La precisión de estas preparaciones independientes por triplicado de un solo lote de harina de maní puede oscilar entre aproximadamente un 1,1% de desviación estándar relativa (RSD) para Ara h6 y aproximadamente un 18,3% para Ara h1. El mayor (% RSD) para Ara h1 puede estar asociado con la integración del hombro Ara h1 del grupo posterior más grande.

Tabla 1: Precisión del método RP-HPLC

Lote de harina de maní nº	% Área		
	Ara H ₂	Ara h6	Ara h1 (hombro)
112FA02411	12,20	6,36	7,41
	11,95	6,30	9,68
	12,30	6,22	10,72
	Promedio	12,15	6,30
Des. Est.	0,1762	0,0718	1,6955
% RSD	1,45%	1,14%	18,29%

[0063] Un segundo método de precisión compara los resultados obtenidos por dos analistas diferentes que realizan el ensayo en dos días diferentes. Cada valor presentado representa el promedio de inyecciones duplicadas. La **Tabla 2** proporciona resultados ejemplares de una comparación de los valores porcentuales de área y el contenido de proteína extraíble de tres lotes de harina de maní, por dos analistas diferentes en días diferentes. La comparación de los resultados cuantitativos obtenidos de estos ensayos arroja valores de Ara h que concuerdan entre el 86% y el 107%; El contenido total de proteínas puede estar entre el 95% y el 102%. También se puede presentar el porcentaje de coincidencia entre los dos analistas.

Tabla 2: Precisión del método RP-HPLC

Lote de harina de maní nº	% Área					
	Ara h2		Ara h6		Ara h1 (hombro)	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
111FA36111	10,60	12,29	5,59	5,77	8,82	9,73
% Partido	86,31		96,76		90,70	
111FA36211	10,65	12,02	5,48	5,67	11,14	9,36
% Partido	88,58		96,63		118,97	
112FA02411	10,62	12,15	5,93	6,30	9,91	9,27
% Partido	87,40		94,12		106,92	

Los valores son el promedio de dos inyecciones.

[0064] Análisis de varios lotes PF se puede usar para demostrar que la expresión de Ara h1, Ara h2 y Ara h6 es consistente, tanto individual como respecto a la otra a través de un montón de harina de maní. Este ensayo también puede constituir la base para las pruebas de identidad y contenido en el momento del lanzamiento y durante la determinación de la estabilidad.

[0065] El ensayo se llevará a cabo y analizará por un segundo fabricante cGMP. Los perfiles de HPLC (ver, por ejemplo, **Figura 2, Figura 3 y Figura 4**), proteína total y porcentaje de cada alérgeno dentro de la proteína total (ver, por ejemplo, **Tabla 3**) son generalmente consistentes entre los ensayos realizados por ambos laboratorios usando los mismos lotes de harina de maní (permite unir los datos).

5

Tabla 3 Comparación de las proteínas Ara h y el contenido total de proteínas extraíbles

Lote de harina de maní	% Área			% Proteína
	Ara h2 (hombro)	Ara h6 (hombro)	Ara h1 (hombro)	
111FA36111	11,40	5,29	9,79	11,26
111FA36211	11,20	5,67	9,85	11,03
112FA02411 (No GMP)	11,31	5,68	10,41	10,23
112FA02411 (GMP)	10,58	5,79	10,16	10,25

15

Estudios de confirmación RP-HPLC

[0066] Para confirmar que el perfil del pico de RP-HPLC en realidad separa e identifica Ara h1, Ara h2 y Ara h6, el material aislado a partir de cada pico puede ser caracterizado adicionalmente por gel de electroforesis de poliacrilamida SDS usando, por ejemplo, un gel prefabricado 4-20 Novex Tris-HCl (ver, por ejemplo, la **Figura 5**). Pueden transferirse geles adicionales a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF), procesarse para inmunotransferencia y pueden reaccionar con antisueros de pollo Ara h1, Ara h2 o Ara h6 y desarrollarse con IgG anti-pollo de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante usando, por ejemplo, un ensayo método descrito por de Jong et al. (EMBO J., 1988; 7 (3): 745-750). Cabe señalar que, si bien los extractos pueden derivarse de la harina de maní tostado, los antisueros pueden generarse contra las proteínas Ara h purificadas a partir de extractos de maní crudo. Los antisueros reaccionan tanto con las proteínas Ara h de control derivadas de maní crudo como con las proteínas Ara h aisladas obtenidas de extractos de maní tostado (véase, por ejemplo, la **Figura 6**).

20

[0067] Las inmunotransferencias muestran que el material aislado de cada uno de los tres picos de HPLC principales eran reactivos con los antisueros específicos de proteína de maní apropiado, y que el peso molecular de las proteínas inmunorreactivas correspondió a los pesos moleculares de proteínas como se informa en la literatura (Koppelman et al, 2010). Se determinó que las proteínas Ara h extraídas de la harina de maní no son sensibles al calentamiento a 60°C. Pueden realizarse experimentos de confirmación adicionales; estos ensayos pueden usarse para establecer el ensayo indicador de estabilidad más apropiado que proporcione la mayor sensibilidad a los cambios que ocurren durante el almacenamiento a largo plazo. Sin embargo, los primeros datos de inmunotransferencia descritos en este documento indican que el método RP-HPLC informado rastreará las proteínas de maní individuales entre los lotes de harina de maní.

30

Fuente y ensayo de la harina de maní

[0068] Harina de maní (PF) para uso en una formulación descrita aquí puede ser obtenida de cualquier productor fiable, incluyendo, pero no limitado al Golden Peanut Company (GPC) que fabrica harina de maní y aceite de maní (un subproducto de desgrasar el maní tostado).

45

[0069] Instalaciones de fabricación de una GPC pueden ser auditadas por un organismo de certificación reconocido internacionalmente por la seguridad de los alimentos programas (p. ej., Intertek Labtest (UK) Limited). La auditoría puede centrarse en el cumplimiento del British Retail Consortium Food Standard (BRC) Global Standards for Food Safety. (BRC). Los Estándares Globales de BRC son un programa de certificación de calidad y seguridad líder en todo el mundo, utilizado en todo el mundo por más de 17.000 proveedores certificados en 90 países a través de una red de más de 80 organismos de certificación acreditados y reconocidos por BRC. Los estándares globales de BRC son ampliamente utilizados por proveedores y minoristas globales. Facilitan la estandarización de calidad, seguridad, criterios operativos y el cumplimiento de las obligaciones legales por parte de los fabricantes. También ayudan a brindar protección al consumidor. No hubo hallazgos importantes o críticos de no conformidad durante la auditoría más reciente.

55

[0070] El PF puede ser harina de maní molida a aproximadamente 12% desgrasada de maní ligeramente tostado. El PF puede ser adquirido por el proveedor después de un análisis estándar de contenido y microbiología, y se identifica como estable durante 9 meses bajo refrigeración.

60

Prueba de liberación de material crudo entrante para PF

65

[0071] La materia prima de PF puede ser probada para la apariencia, identidad, contenido de proteína total y contenido de humedad antes de liberación para la producción de GMPc (véase, por ejemplo, la **Tabla 4**). El PF puede almacenarse en condiciones controladas a 2-8°C.

Tabla 4: Prueba de materias primas para PF

Ensayo	Método	Criterios de aceptación
Apariencia Polvo/Color	Visual	Polvo fino de color bronceado
Identidad	RP-HPLC	Comparable al cromatograma de referencia
Contenido de proteína	Contenido de nitrógeno por el método de combustión AOCS para la determinación de proteína cruda (método oficial AOCS Ba 4e-93)	Informe de resultados
Humedad	Pérdida por secado (LOD) USP <921>	Informe de resultados

15 *Excipientes de formulación*

[0072] La **Tabla 5** proporciona excipientes ejemplares que pueden usarse en una formulación descrita en el presente documento. Otros excipientes que pueden usarse en una formulación descrita en este documento se proporcionan en otra parte de la descripción.

[0073] La forma de dosificación pretendida ejemplar incluye, por ejemplo, una cápsula basada en hidroxipropilmetylcelulosa (HPMC); la concentración de la forma de dosificación puede ser de aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 475 mg o aproximadamente 1000 mg de proteína de maní. La propia proteína de maní, en algunos casos, puede ser un material cohesivo sin propiedades de flujo inherentes que conduzcan a los procesos de fabricación farmacéutica convencionales. Por tanto, pueden añadirse ingredientes farmacéuticos inactivos (excipientes) a la formulación de modo que la flor de maní pueda desarrollarse en una forma farmacéutica adecuada con características de flujo para mejorar tanto la fabricación como también el suministro de la forma farmacéutica.

[0074] Estudios de compatibilidad pueden llevarse a cabo para evaluar combinaciones de harina de maní con categorías de excipientes ejemplares (diluyente, lubricante y deslizante). Los excipientes pueden tener reconocimiento GRAS o demostrar que son seguros en formulaciones farmacéuticas. El diluyente brinda la oportunidad de formular las dosis bajas y altas para contener el volumen adecuado para la dispersión de la cápsula abierta. El deslizante y el lubricante añaden fluidez al PF de manera que el sujeto vacía fácilmente la harina de la cápsula.

[0075] De acuerdo con la **Tabla 5** cada uno de los excipientes bajo consideración se designan como USP, NF o USP-NF.

40 **Tabla 5: Excipientes en consideración**

Funcionalidad	Excipiente	Fabricante (nombre comercial)	Grado	Descripción
Diluyentes	Lactosa monohidrato	Foremost (Lactose 316/Fast-Flo)	NF	Diluyente orgánico simple (monohidrato)
	Lactosa anhidra	Kerry/Sheffield (Lactose DT)	NF	Diluyente orgánico simple (anhidro)
	Manitol	Roquette (Pearlitol 300DC)	NF	Diluyente orgánico simple
	Celulosa microcristalina	FMC (Avicel pH102)	NF	Diluyente orgánico complejo
	Almidón de maíz parcialmente pregelatinizado	Colorcon (almidón 1500)	USP/NF	Diluyente orgánico complejo
	Celulosa microcristalina silicificada	JRS Pharma (PROSOLV HD90)	USP	Diluyente coprocesado orgánico/inorgánico complejo
	Fosfato dicálcico	Innophos (DiTab)	NF	Diluyente inorgánico

(Continuación)

	Funcionalidad	Excipiente	Fabricante (nombre comercial)	Grado	Descripción
5	Deslizante	Dióxido de silicio coloidal	Cabot (Cab-O-Silo M5P)	USP	Agente deslizante/antiaglutinante
10		Talco	Ultra Chemicals (Ultra Talc 4000)	USP	Agente deslizante/antiaglutinante
15	Lubricantes	Estearato de magnesio (fuente vegetal)	Mallinckrodt	USP	Lubricante
20		Estearilo fumarato de sodio	JRS Pharma (Pruv)	USP	Lubricante
25	Carcasa de la cápsula	Carcasa de cápsula HPMC blanca opaca	Capsugel (V Caps)	n/A	Cubierta de la cápsula de fuente vegetal
30	Agentes colorantes en cápsula	Mezclas de pigmentos	V54,9041 V18,9221 V41,9071	TBD	Representante del color final de la cubierta de la cápsula
35		Color caramelo	Sensient	TBD	Colorante para combinar mezclas de placebo

30 *Formulación del alérgeno de maní caracterizado*

[0076] La harina de maní (que contiene proteínas alergénicas de maní Ara h1, Ara h2 y Ara h6) se puede formular con un agente de carga y de flujo en dosis graduadas, que comprenden cápsulas que contienen 0,5 mg, 1 mg, 10 mg, 100 mg y 1000 mg cada uno de proteína de maní.

35 *Cápsulas de dosis baja (0,5 mg y 1 mg)*

[0077] La **Figura 7** y la **Tabla 6** describen el proceso de mezcla propuesto para las cápsulas de dosis baja, que incluyen las cápsulas de proteína de maní de 0,5 mg y de proteína de maní de 1 mg.

40 [0078] En el presente documento se describe un método para preparar una formulación de cápsula de dosis baja útil en los métodos proporcionados aquí, que comprende: (a) mezclar harina de maní y diluyente en una primera mezcla; (b) añadir aproximadamente un 45% de diluyente en una segunda mezcla; (c) añadir el diluyente y/o lubricante restante en una tercera mezcla; (d) añadir un deslizante en una mezcla final; y (e) encapsular el polvo mezclado en una cápsula.

45 En una realización, el diluyente de la etapa (a) comprende almidón, lactosa o celulosa microcristalina (Avicel®) o fosfato dicálico. En otra realización, el diluyente de la etapa (b) y/o (c) comprende almidón, lactosa o celulosa microcristalina (Avicel®) o fosfato dicálico. En otra realización, el deslizante de la etapa (d) deslizante del paso (d) comprende dióxido de silicio coloidal (Cab-O-Silo), talco (p. ej., Ultra Talc 4000) o combinaciones de los mismos. En otra realización, el deslizante del paso (d) comprende Cab-O-Sil. En otra realización, el lubricante del paso (d) comprende estearato de magnesio. En otra realización, el método comprende además tomar muestras de la mezcla combinada una o más veces antes de la encapsulación. En otra realización, la dosis comprende aproximadamente 0,5 o aproximadamente 1,0 mg de proteína de maní. En una realización, el método comprende opcionalmente tomar muestras del material mezclado de la etapa (d). En una realización, la etapa (d) comprende añadir un deslizante o un lubricante. En otra realización, la etapa (d) comprende añadir un deslizante y un lubricante.

55 **Tabla 6: Pasos operativos propuestos para cápsulas de dosis baja (0,5 mg y 1 mg)**

	Paso de operación	Tipo de equipo	Detalles	Comentarios
60	1	Licuadora de difusión	Licuadora en V	Tamaño de la carcasa de la licuadora TBD basado en el tamaño del lote. El uso de la barra intensificadora depende de los resultados de uniformidad de los lotes de desarrollo
65	2	Licuadora de difusión	Licuadora en V	Tamaño de la carcasa de la licuadora TBD según el tamaño del lote

(Continuación)

	Paso de operación	Tipo de equipo	Detalles	Comentarios
5	3	Licuadora de difusión	Licuadora en V	Tamaño de la carcasa de la licuadora TBD según el tamaño del lote
	4	Licuadora de difusión	Licuadora en V	Tamaño de la carcasa de la licuadora TBD según el tamaño del lote
10	5	Ladrón de muestras	TBD	Longitud del ladrón y tamaño de la cámara adecuados para el tamaño de la licuadora y requisitos de tamaño de la muestra analítica
	6	Encapsulador	Disco de dosificación/barreno	Método de encapsulación TBD basado en evaluaciones de variación de peso de llenado en lotes de desarrollo

Cápsulas de dosis alta (10 mg, 100 mg y 475 mg)

[0079] La **Figura 8** y la **Tabla 7** describen el proceso de mezcla propuesto para las cápsulas de dosis alta, que incluyen las cápsulas de proteína de maní de 10 mg, proteína de maní 100 mg y proteína de maní de 475 mg.

[0080] En el presente documento se describe un método para preparar una formulación de cápsula de dosis alta útil en los métodos proporcionados aquí, que comprende: (a) mezclar harina de maní y diluyente en una primera mezcla; (b) descargar el material mezclado; (c) hacer pasar el material mezclado a través de un tamiz de malla y mezclar el material tamizado en una segunda mezcla; (d) añadir un deslizante y/o lubricante en una tercera mezcla; (e) encapsular el polvo mezclado. En una realización, el método comprende opcionalmente tomar muestras del material mezclado de la etapa (d) una o más veces antes de la encapsulación. En otra realización más, el diluyente de la etapa (a) comprende almidón, lactosa o celulosa microcristalina (Avicel®) o fosfato dicalcico. En otra realización, la pantalla de malla del paso (c) comprende una pantalla de malla nº 20. En otra realización, el deslizador del paso (d) el deslizante del paso (d) comprende dióxido de silicio coloidal (Cab-O-Silo), talco (p. ej., Ultra Talc 4000) o combinaciones de los mismos. En otra realización, el deslizante del paso (d) comprende Cab-O-Sil. En otra realización, el lubricante del paso (d) comprende estearato de magnesio. En una realización, la etapa (d) comprende añadir un deslizante o un lubricante. En otra realización, la etapa (d) comprende añadir un deslizante y un lubricante.

Tabla 7: Pasos operativos propuestos para cápsulas de dosis alta (10 mg, 100 mg y 475 mg)

	Paso de operación	Tipo de equipo	Detalles	Comentarios
40	1	Licuadora de difusión	Licuadora en V	Tamaño de la carcasa de la licuadora TBD según el tamaño del lote
	2	Tamiz	ESTÁNDAR DE ESTADOS UNIDOS nº 20 (850 mm)	Promover la uniformidad de la mezcla
45	3	Licuadora de difusión	Licuadora en V	Tamaño de la carcasa de la licuadora TBD según el tamaño del lote
	4	Licuadora de difusión	Licuadora en V	Tamaño de la carcasa de la licuadora TBD según el tamaño del lote
50	5	Ladrón de muestras	TBD	Longitud del ladrón y tamaño de la cámara adecuados para el tamaño de la licuadora y los requisitos de tamaño de muestra analítica
	6	Encapsulador	Disco de dosificación/barreno	Método de encapsulación TBD basado en evaluaciones de variación de peso de llenado en lotes de desarrollo

Control de la sustancia a granel

[0081] Especificaciones propuestas ejemplares para la sustancia a granel formulada se resumen en la **Tabla 8**.

Tabla 8: Especificaciones propuestas para la sustancia a granel

	Atributo	Método	Criterios de aceptación
65	Apariencia Polvo/Color	Visual	TBD
	Humedad	LOD	Informe de resultados

(Continuación)

		Atributo	Método	Criterios de aceptación
5	Identidad	Presencia de proteínas Ara h1, Ara h2 y Ara h6	HPLC de fase inversa	Comparable al informe del cromatograma de referencia porcentual de área de Ara h1, Ara h2 y Ara h6
10	Fuerza (ensayo)	Determinación de proteínas totales	Contenido de nitrógeno por el método de combustión AOCS para la determinación de proteína cruda (método oficial AOCS Ba 4e-93)	Dosis bajas (0,5 y 1 mg): Concentración de proteína objetivo 6 15% Dosis altas (10, 100 y 475 mg): Concentración de proteína diana \pm 10%
15	La seguridad	Biocarga	Límites microbiológicos USP <61> Enumeración microbiana	Recuento microbiano aeróbico total: NMT 1000 UFC/g
20			Microorganismos especificados por USP <62>	Recuento total de levaduras y mohos: No más de 100 UFC/g <i>E. coli</i> : Ausente <i>S. aureus</i> : Ausente <i>P. aeruginosa</i> : Ausente Especies de <i>Salmonella</i> : Ausente

25 *Prueba de estabilidad a granel*

[0082] La formulación puede ser llenada en cápsulas dentro de las 24 horas de mezcla.

30 **Formulación**35 *Descripción general de composición de química y fabricación*

[0083] La harina de maní (que contiene proteínas alergénicas de maní Ara h1, Ara h2 y Ara h6) se pueden formular con un aumento de volumen y un agente de flujo en dosis graduadas, que comprende cápsulas que comprenden aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 475 mg o aproximadamente 1000 mg de cada una de proteína de maní con uno o más diluyentes, uno o más deslizantes, uno o más lubricantes. Opcionalmente, se pueden añadir uno o más agentes de relleno. Cada cápsula puede abrirse y mezclarse el contenido con un alimento que enmascara el sabor inmediatamente antes de la administración.

[0084] Cápsulas no animales que cumplan las normas globales farmacéuticas pueden usarse para las formulaciones descritas en el presente documento. En una realización no limitante, se pueden usar cápsulas de HPMC de Capsugel.

[0085] En otra realización no limitante, también pueden ser producidas cápsulas pueden estar codificadas por colores para distinguir las diferentes dosis correspondientes a cápsulas de placebo con códigos de color.

Tabla 9: Formas de dosificación ejemplares

	Dosis de proteína de maní	Tamaño de la cápsula
1	0,5 mg	3
2	1 mg	3
3	10 mg	00
4	100 mg	00
5	475	000

50 [0086] La composición de excipiente final de la formulación puede ser determinada después de la finalización del estudio de compatibilidad en curso con los diferentes excipientes (ver **Tabla 5**).

Proceso de fabricación

55 [0087] El método/equipo de encapsulación puede ser determinado en base a las evaluaciones de la variación de peso de relleno en lotes de desarrollo. Los controles en proceso pueden incluir controles de peso periódicos.

Control de la formulación

[0088] Las especificaciones de liberación ejemplares de las formulaciones se presentan en la **Tabla 10**.

Tabla 10: Especificaciones propuestas para la formulación

	Atributo	Método	Criterios de aceptación
5	General	Apariencia Polvo/color	Visual TBD
		Integridad de la cápsula	Cápsulas intactas sin signos visibles de agrietamiento. Las cápsulas se abren fácilmente sin romperse
		Uniformidad de contenido	Cumple con los requisitos de USP <905>
		Masa entregable	% de peso entregado Resultados del informe
		Humedad	Pérdida por secado (LOD) USP <921> Resultados del informe
10	Identidad	Presencia de proteínas Ara h1, Ara h2 y Ara h6	Comparable con el cromatograma de referencia y el porcentaje de área del informe de Ara h1, Ara h2 y Ara h6
		Fuerza (ensayo)	Contenido de nitrógeno por el método de combustión AOCS para la determinación de proteína cruda (método oficial AOCS Ba 4e-93) Dosis bajas (0,5 y 1 mg): Concentración de proteína diana ± 15% Dosis altas (10 y 100 mg): Concentración de proteína diana ± 10%
15	Seguridad	Biocarga	Límites microbiológicos USP <61> Enumeración microbiana USP <62> Microorganismos especificados Recuento total de microbios aeróbicos: No más de 1000 UFC/g Recuento total de levaduras y mohos: No más de 100 UFC/g <i>E. coli</i> : Ausente <i>S. aureus</i> : Ausente <i>P. aeruginosa</i> : Ausente Especies de <i>Salmonella</i> : Ausente
20			
25			
30			
35	Aspecto		
40			
45			
50			
55			
60			
65			

Aspecto

[0089] Las evaluaciones de apariencia pueden realizarse en la sustancia a granel (p. ej., formulación durante una o más etapas de preparación y/o de la mezcla final antes del encapsulado) y la formulación. La evaluación de la apariencia puede incluir, por ejemplo, inspeccionar visualmente el recipiente contra un fondo blanco iluminado por una luz de espectro.

Uniformidad de contenido

[0090] La uniformidad del contenido (UC) de las cápsulas se puede realizar de acuerdo con normas de la USP. La uniformidad del contenido puede basarse en un ensayo de combustión del contenido de nitrógeno proteico total. La intención es identificar un instrumento de combustión con la sensibilidad para permitir analizar cápsulas individuales en todas las dosis.

Masa entregable

[0091] La masa entregable de la cápsula puede evaluarse pesando las cápsulas, vaciando el contenido y pesando las cápsulas vacías. A continuación, se puede calcular el % de la cantidad entregada.

Contenido de humedad

[0092] El contenido de humedad puede afectar a la estabilidad de las proteínas, y la comprensión de los cambios en el contenido de la humedad durante el tiempo es útil para la comprensión de los cambios en la formulación que pueden, en algunos casos, dar lugar a una vida útil más corta. Para las cápsulas llenas de harina de maní, el contenido de humedad se puede medir utilizando determinaciones de pérdida por secado (LOD) de acuerdo con la USP. Las condiciones para el LOD pueden determinarse en función de los requisitos de excipientes y los requisitos para la harina de maní.

Identidad (RP-HPLC)

[0093] Se puede usar RP-HPLC para confirmar la identidad del PF, BS y la formulación final. Las muestras pueden analizarse de acuerdo con los métodos descritos con más detalle en la solicitud relacionada titulada "Peanut

Formulations and Uses Thereof", presentada el mismo día adjunto (expediente de abogado Nº 43567-702,101) y los cromatogramas resultantes pueden compararse con el chromatograma de ejemplo proporcionado en el método de prueba (Ver, por ejemplo, **Figura 9**).

- 5 [0094] Una identificación positiva de harina de maní puede confirmarse si el chromatograma de la muestra coincide con el chromatograma proporcionado en el método. Si no se confirma una indicación positiva, una gran cantidad de harina de maní puede descartarse como de calidad inferior. La ausencia de activo en los placebos puede confirmarse demostrando que no eluyen los picos entre 12 y 35 minutos en la chromatografía.

10 *Proteína extraíble total*

- 15 [0095] Un enfoque similar a la determinación de proteína extraíble total de la harina de maní se puede utilizar para la determinación de proteína extraíble total en las formulaciones de cápsulas. El enfoque puede evaluarse para todos los puntos fuertes. En resumen, el contenido de la cápsula se puede vaciar, pesar y analizar mediante RP-HPLC. El análisis chromatográfico de las muestras de harina de maní extraídas mediante este procedimiento produce una "huella digital" chromatográfica que es exclusiva de los extractos de harina de maní. Se puede integrar la región de las muestras que eluyen entre aproximadamente 12 minutos y 35 minutos. El área total integrada puede cuantificarse frente a un estándar BSA. A continuación, se puede calcular el contenido total de proteínas extraíbles usando la siguiente ecuación.

20

$$\text{Mg/g proteína} = \frac{R_u}{R_s} \times C_{STD} \times \frac{V_{Muestra}}{Wt_{Muestra}}$$

25 donde:

R_u = Área total del pico de proteína Ara h o Área del pico de la especie Ara h en la muestra de trabajo;
 R_s = Área de pico promedio de BSA en todos los estándares de trabajo C_{STD} = Concentración del estándar de trabajo BSA (mg/mL);
 $V_{muestra}$ = Volumen total de diluyente de la muestra de trabajo (10,0 ml); y
 $P_{muestra}$ = Peso de la muestra de harina de maní (g).

35 *Relaciones de proteína aparentes Ara h1, Ara h2 y Ara h6*

- 30 [0096] El análisis chromatográfico de las muestras extraídas usando el método de RP-HPLC puede producir una "huella digital" chromatográfica que es única para extractos de harina de maní, y las proporciones relativas de las regiones correspondientes a Ara h1, Ara h2 y Ara h6 (véase, por ejemplo, **Figura 1**). El contenido de proteína de cada una de estas regiones (mg/g) puede cuantificarse de acuerdo con la ecuación proporcionada anteriormente. A continuación, se calcula el contenido porcentual relativo de proteína total para cada región de acuerdo con la siguiente ecuación.

40

$$\text{Ara h\%} = \frac{\text{Área pico Ara h}}{\text{Área pico Total / proteína}} \times 100$$

45 *Contenido de proteínas*

- 50 [0097] El contenido de proteína en cápsulas rellenas se puede determinar de la misma manera que la de la harina de maní (Método Oficial AOCS Ba 4e-93). Dado que las determinaciones precisas del contenido de proteínas pueden depender del contenido de nitrógeno de la muestra, no se pueden utilizar excipientes que contengan nitrógeno en la formulación. El método se basa en el método Dumas y se basa en la combustión de la proteína cruda en oxígeno puro y la medición del gas nitrógeno desprendido. El método que se puede utilizar puede ser el Método Oficial AOCS Ba 4e-93. La definición y el alcance del método AOCS se proporcionan a continuación.

- 55 [0098] En resumen, este método describe un método de combustión genérico para la determinación de la proteína bruta. La combustión a alta temperatura en oxígeno puro libera nitrógeno, que se mide por detección de conductividad térmica y luego se convierte en proteína equivalente mediante un factor numérico apropiado. Este es un método alternativo al método de Kjeldahl con catalizador de mercurio y tiene dos ventajas: 1) se necesita menos tiempo para la determinación de nitrógeno y 2) no se utilizan productos químicos peligrosos y tóxicos.

60 *Pruebas de estabilidad*

- 65 [0099] Las formulaciones se pueden almacenar a 2-8°C. Para evaluar la estabilidad acelerada y a largo plazo, las formulaciones se pueden probar de acuerdo con la frecuencia y las especificaciones descritas en la **Tabla 11** y la **Tabla 12**. Las pruebas de apariencia/color, humedad, identidad y resistencia se pueden realizar en todos los puntos de tiempo, y la carga biológica puede realizarse anualmente a los 12, 24 y 36 meses.

Tabla 11A: Esquema de prueba del protocolo de estabilidad para una formulación

5	Temperatura	5°C +/-3°C	25°C +/-2°C 60% HR
10	Frecuencia de prueba	1,3,6,9,12,18,24,36 meses	1,3,6,9,12,18,24,36 meses

[0100] Las Tablas 11B - 11F proporcionan datos obtenidos probando la estabilidad de varias formulaciones a 5°C.

Tabla 11B

Condición de estabilidad: alérgeno de maní caracterizado a 5°C, cápsula de 475 mg						
Especificaciones			Intervalos de estabilidad			
Prueba	Método	Criterios de aceptación	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
Identificación (HPLC)	TM-074	Área de informe % Ara h1	10,18	8,5	9,67	9,31
		Área de informe % Ara h2	9,48	9,89	10,88	8,93
		Área de informe % Ara h6	5,89	5,16	5,32	4,21
		Informe la relación de Ara h2/h6	1,61	1,92	2,05	2,12

Tabla 11C

Condición de estabilidad: alérgeno de maní caracterizado a 5°C, cápsula de 100 mg						
Especificaciones			Intervalos de estabilidad			
Prueba	Método	Criterios de aceptación	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
Identificación (HPLC)	TM-074	Área de informe % Ara h1	7,97	10,33	10,51	9,64
		Área de informe % Ara h2	8,81	8,78	9,01	8
		Área de informe % Ara h6	4,17	3,92	4,27	3,61
		Informe la relación de Ara h2/h6	2,11	2,24	2,11	2,22

Tabla 11D

Condición de estabilidad: alérgeno de maní caracterizado a 5°C, cápsula de 10 mg						
Especificaciones			Intervalos de estabilidad			
Prueba	Método	Criterios de aceptación	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
Identificación (HPLC)	TM-074	Área de informe % Ara h1	6,66	7,71	9,36	7,11
		Área de informe % Ara h2	10,95	9,75	9,54	10,16
		Área de informe % Ara h6	5,93	5,8	5,55	5,51
		Informe la relación de Ara h2/h6	1,85	1,68	1,72	1,84

Tabla 11E

Condición de estabilidad: alérgeno de maní caracterizado a 5°C, cápsula de 1,0 mg						
Especificaciones			Intervalos de estabilidad			
Prueba	Método	Criterios de aceptación	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
Identificación (HPLC)	TM-074	Área de informe % Ara h1	7,35	7,43	8,54	7,65
		Área de informe % Ara h2	16,11	14,39	12,31	12,94
		Área de informe % Ara h6	7,14	6,56	5,77	6,36
		Informe la relación de Ara h2/h6	2,26	2,19	2,13	2,03

Tabla 11F

Condición de estabilidad: alérgeno de maní caracterizado a 5°C, cápsula de 0,5 mg						
Especificaciones			Intervalos de estabilidad			
Prueba	Método	Criterios de aceptación	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
Identificación (HPLC)	TM-074	Área de informe % Ara h1	7,12	8,25	8,3	8
		Área de informe % Ara h2	19,37	14,76	15,26	16,15
		Área de informe % Ara h6	8,77	8,69	8,9	8,8
		Informe la relación de Ara h2/h6	2,21	1,7	1,71	1,84

[0101] Las Tablas 11G - 11K proporcionan datos obtenidos probando la estabilidad de varias formulaciones a 25°C.

Tabla 11G

Condición de estabilidad: alérgeno de maní caracterizado a 25°C, cápsula de 475 mg						
Especificaciones			Intervalos de estabilidad			
Prueba	Método	Criterios de aceptación	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
Identificación (HPLC)	TM-074	Área de informe % Ara h1	10,18	8,26	10,1	9,93
		Área de informe % Ara h2	9,48	9,86	10,48	9,77
		Área de informe % Ara h6	5,89	5,09	5,25	4,41
		Informe la relación de Ara h2/h6	1,61	1,94	2	2,22

Tabla 11H

Condición de estabilidad: alérgeno de maní caracterizado a 25°C, cápsula de 100 mg						
Especificaciones			Intervalos de estabilidad			
Prueba	Método	Criterios de aceptación	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
Identificación (HPLC)	TM-074	Área de informe % Ara h1	7,97	9,92	10,42	9,75
		Área de informe % Ara h2	8,81	8,32	9,4	8,04
		Área de informe % Ara h6	4,17	4,18	4,28	3,6
		Informe la relación de Ara h2/h6	2,11	1,99	2,2	2,23

Tabla 11I

Condición de estabilidad: alérgeno de maní caracterizado a 25°C, cápsula de 10 mg						
Especificaciones			Intervalos de estabilidad			
Prueba	Método	Criterios de aceptación	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
Identificación (HPLC)	TM-074	Área de informe % Ara h1	6,66	7,99	9,47	7,26
		Área de informe % Ara h2	10,95	10,77	10,23	10,11
		Área de informe % Ara h6	5,93	5,81	4,99	5,83
		Informe la relación de Ara h2/h6	1,85	1,85	2,05	1,73

Tabla 11J

Condición de estabilidad: alérgeno de maní caracterizado a 25°C, cápsula de 1,0 mg						
Especificaciones			Intervalos de estabilidad			
Prueba	Método	Criterios de aceptación	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
Identificación (HPLC)	TM-074	Área de informe % Ara h1	7,35	7,63	8,24	7,74
		Área de informe % Ara h2	16,11	12,59	12,97	12,89
		Área de informe % Ara h6	7,14	6,55	5,81	6,05
		Informe la relación de Ara h2/h6	2,26	1,92	2,23	2,13

Tabla 11K

Condición de estabilidad: alérgeno de maní caracterizado a 25°C, cápsula de 0,5 mg						
Especificaciones			Intervalos de estabilidad			
Prueba	Método	Criterios de aceptación	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
Identificación (HPLC)	TM-074	Área de informe % Ara h1	7,12	8,22	7,95	7,83
		Área de informe % Ara h2	19,37	9,49	16,3	16,28
		Área de informe % Ara h6	8,77	15	8,76	8,2
		Informe la relación de Ara h2/h6	2,21	1,58	1,86	1,99

Tabla 12A: Especificaciones del protocolo de estabilidad para una formulación

Atributo		Método	Criterios de aceptación
General	Apariencia Polvo/color	Visual	TBD
	Integridad de la cápsula	Visual	Cápsulas intactas sin signos visibles de agrietamiento. Las cápsulas se abren fácilmente sin romperse
	Humedad	Pérdida por secado (LOD) USP <921>	Resultados de informe
Identidad	Presencia de proteínas Ara h1, Ara h2 y Ara h6	HPLC de fase inversa	Comparable con el cromatograma de referencia e informe de porcentaje de área de Ara h1, Ara h2 y Ara h6
Fuerza (ensayo)	Contenido de proteínas	Contenido de nitrógeno por el método de combustión AOCS para la determinación de proteína cruda (método oficial AOCS Ba 4e-93)	Dosis bajas (0,5 y 1 mg): Concentración de proteína diana \pm 15% Dosis altas (10 y 100 mg): Concentración de proteína diana \pm 10%
Seguridad	Biocarga*	Límites microbiológicos USP <61> Enumeración microbiana USP <62> Microorganismos especificados	Recuento total de microbios aeróbicos: No más de 1000 UFC/g Recuento total de levaduras y mohos: No más de 100 UFC/g <i>E. coli</i> : Ausente <i>S. aureus</i> : Ausente <i>P. aeruginosa</i> : Ausente Especies de <i>Salmonella</i> : Ausente

* La carga biológica se puede medir al momento del lanzamiento y anualmente.

[0102] Tablas 12B - 12K proporcionan datos obtenidos mediante la evaluación de la estabilidad y características de varias formulaciones a 5°C y 25°C en diversos puntos temporales.

55

60

65

Tabla 12B

Condiciones de estabilidad: 5°C; Cápsula de 0,5 mg

Prueba	Método	Especificaciones	Criterios de aceptación	Intervalos de estabilidad			
				Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
Apariencia (n = 10)	Visual	Cápsula blanca opaca que contiene polvo granular fino de color blanco a blanquecino *	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Masa entregable	TM-086	> 95% *	Promedio: 99%; RSD: 0,4%	Promedio: 99%; RSD: 0,5%	Promedio: 100%; RSD: 0,3%	Promedio: 99%; RSD: 0,1%	Promedio: 99%; RSD: 0,6%
Ensayo	TM-085	Concentración de proteína diana $\pm 15\%$	91%	88%	92%	101%	88%
Identificación (HPLC)	TM-074	Comparable al cromatograma de referencia	Comparable	Comparable	Comparable	Comparable	Comparable
Pérdida por secado (@ 130°C durante 2 horas)	USP <731>	Área del informe % Ara h1 Área de informe % Ara h2 Área del informe % Ara h6 Informe la relación de Ara h2/h6	7,12 19,37 8,77 2,21	8,25 14,76 8,69 1,7	8,3 15,26 8,9 1,71	8 16,15 8,8 1,84	6,09 20,78 10,38 2,00
Límites microbianos/microorganismos específicos		Informe de resultados	3,83%	4,00%	4,50%	6,40%	5,40%
		Laboratorios químicos de calidad USP <61> y <62>	Recuento microbiano aeróbico total: No más de 1000 ufc/g; Recuento total combinado de levaduras y mohos: No más de 100 ufc/g; especies de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>Salmonella</i> están ausentes	Cumple con los criterios de aceptación	N/A	N/A	N/A

Tabla 12C

Condición de estabilidad: 25°C/60% HR; Cápsula de 0,5 mg						
Prueba	Método	Especificaciones	Intervalos de estabilidad			
			Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
Apariencia (n = 10)	Visual	Cápsula blanca opaca que contiene polvo granular fino de color blanco a blanquecino *	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Masa entregable	TM-086	> 95% *	Promedio: 99% RSD: 0,4%	Promedio: 100% RSD: 0,5%	Promedio: 99% RSD: 0,4%	Promedio: 100% RSD: 0,3%
Ensayo	TM-085	Concentración de proteína diana ±15%; (85-115% de declaración de etiqueta) Comparable al cromatograma de referencia	91%	90%	90%	98%
Identificación (HPLC)	TM-074	Área del informe % Ara h1	7,12	8,22	7,95	7,83
		Área de informe % Ara h2	19,37	9,49	16,3	16,28
		Área del informe % Ara h6	8,77	15	8,76	8,2
		Informe la relación de Ara h2/h6	2,21	1,58	1,86	1,99
Pérdida por secado (@ 130°C durante 2 horas)	USP <731>	Informe de resultados	3,83%	3,70%	4,20%	4,10%
Límites microbianos/microorganismos específicados	Laboratorios químicos de calidad USP	Recuento microbiano aeróbico total: No más de 1000 UFC/g; Recuento total combinado de levaduras y mohos: No más de 100 UFC/g; especies de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>Salmonella</i> están ausentes	Cumple con los criterios de aceptación	N/A	N/A	N/A

Tabla 12D

Condición de estabilidad: 5°C: Alérgeno de maní caracterizado, cápsula de 1,0 mg							
Especificaciones			Intervalos de estabilidad				
Prueba	Método	Criterios de aceptación	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses	
5	Apariencia (n = 10)	Visual	Cápsula blanca opaca que contiene polvo granular fino de color blanco a blanquecino *	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
10	Masa entregable	TM-086	> 95% *	Promedio: 100%; RSD: 0,3%	Promedio: 100%; RSD: 0,4%	Promedio: 99%; RSD: 0,6%	Promedio: 99%; RSD: 0,3%
15	Ensayo	TM-085	Proteína diana concentración $\pm 15\%$; (85-115% de declaración de etiqueta)	101%	90%	86%	94%
20	Identificación (HPLC)	TM-074	Comparable al cromatograma de referencia	Comparable	Comparable	Comparable	Comparable
25			Área del informe% Ara h1	7,35	7,43	8,54	7,65
30			Área de informe% Ara h2	16,11	14,39	12,31	12,94
35			Informe de área% Ara h6	7,14	6,56	5,77	6,36
40			Informe la relación de Ara h2/h6	2,26	2,19	2,13	2,03
45	Pérdida por secado (@ 130°C durante 2 horas)	USP <731>	Informe de resultados	5,02%	5,20%	5,70%	6,20%
50	Límites microbianos/ microorganismos especificados	Laboratorios químicos de calidad USP <61> y <62>	Recuento microbiano aeróbico total: No más de 1000 ufc/g; Recuento total combinado de levaduras y mohos: NMT 100 ufc/g; Las especies de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>Salmonella</i> están ausentes	Cumple con los criterios de aceptación	N/A	N/A	N/A
55							
60							
65							

Tabla 12E

Condición de estabilidad: 5°C: Alergeno de maní caracterizado, cápsula de 1,0 mg						
Prueba	Especificaciones		Inicial	Intervalos de estabilidad		
	Método	Criterios de aceptación		1 mes	3 meses	6 meses
Apariencia (n = 10)	Visual	Cápsula blanca opaca que contiene polvo granular fino de color blanco a blanquecino *	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Masa entregable	TM-086	> 95% *	Promedio: 100%; RSD: 0,3%	Promedio: 100%; RSD: 0,3%	Promedio: 99%; RSD: 0,2%	Promedio: 99%; RSD: 0,3%
Ensayo	TM-085	Proteína diana concentración $\pm 15\%$; (85-115% de declaración de etiqueta)	101%	90%	87%	94%
Identificación (HPLC)	TM-074	Comparable al cromatograma de referencia	Comparable	Comparable	Comparable	Comparable
		Área del informe% Ara h1	7,35	7,63	8,24	7,74
		Área de informe% Ara h2	16,11	12,59	12,97	12,89
		Informe de área% Ara h6	7,14	6,55	5,81	6,05
		Informe la relación de Ara h2/h6	2,26	1,92	2,23	2,13
Pérdida por secado (@ 130°C durante 2 horas)	USP <731>	Informe de resultados	5,02%	5,00%	5,80%	6,10%
Límites microbianos/microorganismos específicados		Recuento microbiano aeróbico total: No más de 1000 ufc/g; Recuento total combinado de levaduras y mohos: NMT 100 ufc/g; Las especies de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>Salmonella</i> están ausentes	Cumple con los criterios de aceptación			N/A
						N/A

Tabla 12F
Condición de estabilidad: 5°C: Alergeno de maní caracterizado, cápsula de 10 mg

		Especificaciones					
Prueba	Método	Criterios de aceptación	Intervalos de estabilidad				Comparable
			Inicial	1 mes	3 meses	6 meses	
Apariencia (n = 10)	Visual	Cápsula blanca opaca que contiene polvo granular fino de color blanco a blanquecino *	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	
Masa entregable	TM-086	> 95% *	Promedio: 100%; RSD: 0,2%	Promedio: 100%; RSD: 0,1%			
Ensayo	TM-085	Concentración de proteína diana $\pm 10\%$ (declaración de etiqueta de 90-110%)	95%	93%	96%	98%	
Identificación (HPLC)	TM-074	Comparable al chromatograma de referencia	Comparable	Comparable	Comparable	Comparable	Comparable
		Área del informe% Ara h1	6,66	7,71	9,36	7,11	
		Área de informe% Ara h2	10,95	9,75	9,54	10,16	
		Informe de área% Ara h6	5,93	5,8	5,55	5,51	
		Informe la relación de Ara h2/h6	1,85	1,68	1,72	1,84	
Pérdida por secado (@ 130°C durante 2 horas)	USP <731>	Informe de resultados	4,90%	5,60%	5,40%	5,50%	
Límites microbianos/microorganismos específicados	Laboratorios químicos de calidad USP <61> y <62>	Reuento microbiano aeróbico total: No más de 1000 ufc/g;	Cumple con los criterios de aceptación	N/A	N/A	N/A	

Tabla 12G

Condición de estabilidad: 5°C: Alergeno de maní caracterizado, cápsula de 10 mg					
Prueba	Método	Criterios de aceptación	Intervalos de estabilidad		
			Inicial	1 mes	3 meses
Apariencia (n = 10)	Visual	Cápsula blanca opaca que contiene polvo granular fino de color blanco a blanquecino *	Cumple	Cumple	Cumple
Masa entregable	TM-086	> 95% *	Promedio: 100%; RSD: 0,2%	Promedio: 100%; RSD: 0,2%	Promedio: 100%; RSD: 0,1%
Ensayo	TM-085	Concentración de proteína diana $\pm 10\%$ (declaración de etiqueta de 90-110%)	95%	93%	93%
Identificación (HPLC)	TM-074	Comparable al chromatograma de referencia	Comparable	Comparable	Comparable
		Área del informe% Ara h1	6,66	7,99	9,47
		Área de informe% Ara h2	10,95	10,77	10,23
		Informe de área% Ara h6	5,93	5,81	4,99
		Informe la relación de Ara h2/h6	1,85	1,85	2,05
Pérdida por secado (@ 130°C durante 2 horas)	USP <731>	Informe de resultados	4,90%	4,60%	5,20%
Límites microbianos/microorganismos específicos		Recuento microbiano aeróbico total: No más de 1000 ufc/g; Recuento total combinado de levaduras y mohos: NMT 100 ufc/g, Las especies de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>Salmonella</i> están ausentes	Cumple con los criterios de aceptación	N/A	N/A

Tabla 12H

Prueba	Método	Criterios de aceptación	Intervalos de estabilidad			
			Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
Apariencia (n = 10)	Visual	Cápsula blanca opaca que contiene polvo granular fino de color blanco a blanquecino *	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Masa entregable	TM-086	> 95% *	Promedio: 100%; RSD: 0,1%	Promedio: 100%; RSD: 0,2%	Promedio: 100%; RSD: 0,1%	Promedio: 100%; RSD: 0,1%
Ensayo	TM-085	Concentración de proteína diana ±10% (declaración de etiqueta de 90-110%)	99%	95%	98%	99%
Identificación (HPLC)	TM-074	Comparable al cromatograma de referencia	Comparable	Comparable	Comparable	Comparable
		Área del informe% Ara h1	7,97	10,33	10,51	9,64
		Área de informe% Ara h2	8,81	8,78	9,01	8
		Informe de área% Ara h6	4,17	3,92	4,27	3,61
		Informe la relación de Ara h2/h6	2,11	2,24	2,11	2,22
Pérdida por secado (@ 130°C durante 2 horas)	USP <731>	Informe de resultados	4,02%	3,70%	4,40%	4,40%
Límites microbianos/microorganismos específicados	Laboratorios químicos de calidad USP <61> y <62>	Recuento microbiano aeróbico total: No más de 1000 ufc/g;	Cumple con los criterios de aceptación	N/A	N/A	N/A
		Recuento total combinado de levaduras y mohos: NMT 100 ufc/g; Las especies de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>Salmonella</i> están ausentes				

Tabla 12!
Condición de estabilidad: 5°C: Alergeno de maní caracterizado, cápsula de 100 mg

Prueba	Especificaciones	Método	Criterios de aceptación	Inicial	Intervalos de estabilidad		
					1 mes	3 meses	6 meses
Apariencia (n = 10)	Visual		Cápsula blanca opaca que contiene polvo granular fino de color blanco a blanquecino *	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Masa entregable	TM-086		> 95% *	Promedio: 100%; RSD: 0,1%	Promedio: 100%; RSD: 0,1%	Promedio: 100%; RSD: 0,1%	Promedio: 100%; RSD: 0,4%
Ensayo	TM-085		Concentración de proteína diana $\pm 10\%$ (declaración de etiqueta de 90-110%)	99%	96%	98%	97%
Identificación (HPLC)	TM-074		Comparable al cromatograma de referencia	Comparable	Comparable	Comparable	Comparable
			Área del informe% Ara h1	7,97	9,92	10,42	9,75
			Área de informe% Ara h2	8,81	8,32	9,4	8,04
			Informe de área% Ara h6	4,17	4,18	4,28	3,6
			Informe la relación de Ara h2/h6	2,11	1,99	2,2	2,23
Pérdida por secado (@ 130°C durante 2 horas)	USP <73>		Informe de resultados	4,02%	4,00%	4,40%	4,80%
Límites microbianos/microorganismos específicos			Recuento microbiano aeróbico total: No más de 1000 ufc/g; Recuento total combinado de levaduras y mohos: NMVT 100 ufc/g; especies de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>Salmonella</i> están ausentes	Cumple con los criterios de aceptación	N/A	N/A	N/A

Tabla 12J

Condición de estabilidad: 5°C: Alergeno de maní caracterizado, cápsula de 100 mg		Intervalos de estabilidad			
Prueba	Especificaciones	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
Apariencia (n = 10)	Visual Cápsula blanca opaca que contiene polvo granular fino de color blanco a blanquecino *	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Masa entregable	TM-086 > 95% *	Promedio: 100%; RSD: 0,0%	Promedio: 100%; RSD: 0,1%	Promedio: 100%; RSD: 0,0%	Promedio: 100%; RSD: 0,1%
Ensayo	TM-085 Concentración de proteína diana $\pm 10\%$ (declaración de etiqueta de 90-110%)	90%	94%	94%	96%
Identificación (HPLC)	TM-074 Comparable al cromatograma de referencia	Comparable	Comparable	Comparable	Comparable
	Área del informe% Ara h1 Área de informe% Ara h2 Informe de área% Ara h6	10,18 9,48 5,89	8,5 9,89 5,16	9,67 10,88 5,32	9,31 8,93 4,21
	Informe la relación de Ara h2/h6	1,61	1,92	2,05	2,12
Pérdida por secado (@ 130°C durante 2 horas)	USP <731> Informe de resultados	4,00%	3,60%	3,70%	3,90%
Límites microbianos/microorganismos especificados	Laboratorios químicos de calidad USP <61> y <62>	Reuento microbiano aeróbico total: No más de 1000 ufc/g; Recuento total combinado de levaduras y mohos: NMT 100 ufc/g; especies de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>Salmonella</i> están ausentes	Cumple con los criterios de aceptación	N/A	N/A

Tabla 12K
Condición de estabilidad: 5°C; Alergeno de maní caracterizado, cápsula de 100 mg

Prueba	Método	Criterios de aceptación	Inicial	Intervalos de estabilidad		
				1 mes	3 meses	6 meses
Apariencia (n = 10)	Visual	Cápsula blanca opaca que contiene polvo granular fino de color blanco a blanquecino *	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Masa entregable	TM-086	> 95% *	Promedio: 100%; RSD: 0,0%	Promedio: 100%; RSD: 0,1%	Promedio: 100%; RSD: 0,1%	Promedio: 100%; RSD: 0,1%
Ensayo	TM-085	Concentración de proteína diana ±10% (declaración de etiqueta de 90-110%)	90%	95%	96%	95%
Identificación (HPLC)	TM-074	Comparable al chromatograma de referencia	Comparable	Comparable	Comparable	Comparable
Pérdida por secado (@ 130°C durante 2 horas)	USP <731>	Informe de resultados	4,00%	3,80%	4,10%	4,50%
Límites microbianos/microorganismos específicos		Reuento microbiano aeróbico total: No más de 1000 ufc/g; Recuento total combinado de levaduras y mohos: NMT 100 ufc/g; Las especies de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>Salmonella</i> están ausentes	Cumple con los criterios de aceptación	N/A	N/A	N/A

Placebo

[0103] El placebo puede consistir en la mezcla definida de excipientes sin el PF. El placebo puede llenarse en cápsulas con el mismo código de color que la formulación activa.

5

Tabla 13: Especificación de liberación de placebo

	Atributo	Método	Criterios de aceptación
10	General	Apariencia Polvo/color	Visual TBD
		Integridad de la cápsula	Visual Cápsulas intactas sin signos visibles de agrietamiento. Las cápsulas se abren fácilmente sin romperse
		Uniformidad de contenido	USP <905> Cumple con los requisitos de USP <905>
		Masa entregable	% de peso entregado Resultados de informe
20		Humedad	Pérdida por secado (LOD) USP <921> Resultados de informe
25	Identidad	Ausencia de proteínas Ara h1, Ara h2 y Ara h6	HPLC de fase inversa No se detectaron picos en la región de elución de PF
30	Fuerza (ensayo)	Contenido de proteínas	Contenido de nitrógeno por el método de combustión AOCS para la determinación de proteína cruda (método oficial AOCS Ba 4e-93) No se detectó proteína
35	Seguridad	Biocarga	Límites microbiológicos USP <61> Enumeración microbiana USP <62> Microorganismos especificados Recuento total aeróbico microbiano: NMT 1000 UFC/g Recuento total de levaduras y moldes: NMT 100 UFC/g <i>E. coli</i> : Ausente <i>S. aureus</i> : Ausente <i>P. aeruginosa</i> : Ausente Especies de <i>Salmonella</i> : Ausente

Métodos de uso

[0104] Las composiciones farmacéuticas preparadas usando los métodos descritos en este documento pueden ser utilizadas para comparar varios lotes de proteínas de maní para la consistencia del producto.

[0105] El maní y la harina de maní son alimentos y aditivos comunes que se encuentran en muchos productos alimenticios. El uso clínico previsto para el alérgeno de maní caracterizado (CPA) se encuentra en cantidades relativamente pequeñas (0,5 a 4000 mg/dosis) en comparación con las cantidades contenidas en los alimentos y se administrará por la misma vía que los productos que contienen maní ingerido por vía oral.

[0106] En la actualidad, los estudios preclínicos que exploran modalidades de tratamiento en modelos animales de alergia a alimentos son limitados. El modelo principal para la inducción de la alergia al maní en ratones es exponer ratones por sonda oral a proteínas de maní en forma de mantequilla de maní, maní tostado molido o proteínas de maní purificadas, en combinación con la toxina del cólera. Después de 3 a 6 exposiciones semanales, se desafía a los ratones para que demuestren una respuesta alérgica. Los ratones pueden ser estimulados por inyección intraperitoneal con dosis subletales de una formulación descrita en el presente documento y puntuada según la gravedad de la reacción. La intención es demostrar que los principales desencadenantes de la anafilaxia son proteínas Ara h específicas, en lugar de una combinación de todas las proteínas del maní. En un protocolo de inmunoterapia, los ratones se tratan con extracto de maní entero, extracto desprovisto de proteínas Ara h o con proteínas Ara h purificadas solas. Tras la exposición posterior al tratamiento, se pueden evaluar los cambios en la temperatura corporal, la puntuación de los síntomas y los ratones liberados de proteasa I de mastocitos de ratón. Los ratones que están desensibilizados para una exposición adicional pueden tratarse con un extracto completo o la combinación de proteínas Ara h.

[0107] Los requisitos celulares que subyacen a la anafilaxia inducida por maní pueden determinarse y explorarse en ratones de tipo silvestre C57BL/6, con deficiencia de células B, con deficiencia de CD40L, con deficiencia de mastocitos o con deficiencia de cadena FcεRI ε sensibilizados a las proteínas de maní. Después de la exposición intraperitoneal con una formulación descrita en el presente documento, la anafilaxia se evalúa mediante la medición de inmunoglobulinas específicas de antígeno (Igs), puntuación general de síntomas, temperatura corporal,

5
permeabilidad vascular, liberación de mediadores de mastocitos y reacciones anafilácticas. Los ratones deficientes en células B, mastocitos y CD40L pueden sensibilizarse a las proteínas del maní, como lo demuestra la producción de IgE y citocinas asociadas a Th2. Los ratones deficientes en Fc_εRI ε pueden experimentar anafilaxia aunque algo menos grave que los animales de tipo silvestre.

10
[0108] En un modelo de esófago-gastro-enteropatía inducida por la alimentación a largo plazo del maní a ratones sensibilizados descrito por Mondoulet *et al.*, 2012, la inmunoterapia epicutánea con una formulación descrita en este documento puede disminuir la severidad de las lesiones gastrointestinales. (Mondoulet *et al.*, 2012).

15
[0109] Los datos obtenidos a partir de estos modelos, que pueden demostrar una o más de las características distintivas de las reacciones alérgicas alimentarias humanas, y deben considerarse con respecto a la variabilidad de la alergia alimentaria humana.

20
[0110] En el presente documento se describe un método para identificar una composición para el tratamiento de la desensibilización de la alergia al maní en un sujeto, que comprende: (a) determinar las concentraciones de Ara h1, Ara h2 y Ara h6 en una composición de harina de maní mediante RP-HPLC ; (b) comparar las concentraciones con las concentraciones de un patrón de referencia; e (c) identificar una composición para la desensibilización de la alergia al maní en un sujeto, en donde la muestra contiene al menos las concentraciones de Ara h1, Ara h2 y Ara h6 del estándar de referencia.

25
[0111] El método puede, en algunos casos, comprender además la administración de una composición descrita en el presente documento a un sujeto, donde la composición comprende al menos las concentraciones de Ara h1, Ara h2 y Ara h6 del patrón de referencia.

30
[0112] El método puede ser utilizado para comparar las porciones de la harina de maní y, en algunos casos, excluir harina de maní de uso en una composición o método descrito en el presente documento en que la muestra no contiene al menos la cantidad de referencia estándar de Ara h1, Ara h2 y Ara h6.

35
[0113] Aunque las realizaciones preferidas se han mostrado y descrito en el presente documento, será obvio para los expertos en la técnica que tales realizaciones se proporcionan a modo de ejemplo. A los expertos en la técnica se les pueden ocurrir ahora numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin apartarse de las realizaciones. Debe entenderse que se pueden emplear varias alternativas a las realizaciones descritas en este documento al poner en práctica las realizaciones. Las siguientes reivindicaciones definen el alcance de las realizaciones y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes quedan cubiertos por las mismas.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 **1.** Un método para monitorear la consistencia y estabilidad de un lote a otro de los alérgenos del maní durante la producción de formulaciones encapsuladas de alérgenos caracterizados del maní (CPA), estando dichas formulaciones basadas en harina de maní y siendo adecuadas para la desensibilización oral, donde dicho método comprende:

- 10 - determinar mediante RP-HPLC la relación de concentración de cada una de las proteínas Ara h1, Ara h2 y Ara h6 con respecto al contenido total de proteína de maní y entre sí en dicha harina de maní;
- comparar dichas proporciones entre dichos lotes de harina de maní.

2. El método de la reivindicación 1, donde las proteínas Ara h1, Ara h2 y Ara h6 se caracterizan adicionalmente usando ELISA.

15 **3.** El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde las proteínas Ara h1, Ara h2 y Ara h6 se caracterizan adicionalmente utilizando análisis de gel.

4. Un método de fabricación de formulaciones de harina de maní con alérgenos caracterizados de maní, que comprende:

- 20 (a) mezclar harina de maní, diluyente, deslizante y/o lubricante,
(b) descargar el material mezclado,
(c) pasar el material mezclado a través de una pantalla de malla, y
(d) encapsular el polvo mezclado,

25 en donde la harina a mezclar en el paso (a) se selecciona de un lote que se evaluó mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

30 **5.** El método de la reivindicación 4, en donde el material mezclado del paso (d) se evalúa mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 una o más veces antes de la encapsulación.

6. El método de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde una cápsula contiene 0,5 mg, 1 mg, 10 mg, 100 mg o 1000 mg de proteína de maní.

35 **7.** El método de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde la dosis total de proteína de maní es de 10 mg o 100 mg.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde la formulación se encapsula en una cápsula de tamaño 3, 00 o 000.

40 **9.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en donde la formulación se encapsula en una cápsula que comprende hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

45 **10.** El método de seguimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el método de fabricación según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en donde la harina de maní comprende del 10% al 15% de harina de maní desgrasada molida a partir de maní ligeramente tostado.

50 **11.** El método de control o el método de fabricación según la reivindicación 10, en donde la harina de maní comprende un 12% de harina de maní desgrasada molida a partir de maní ligeramente tostado.

55

60

65

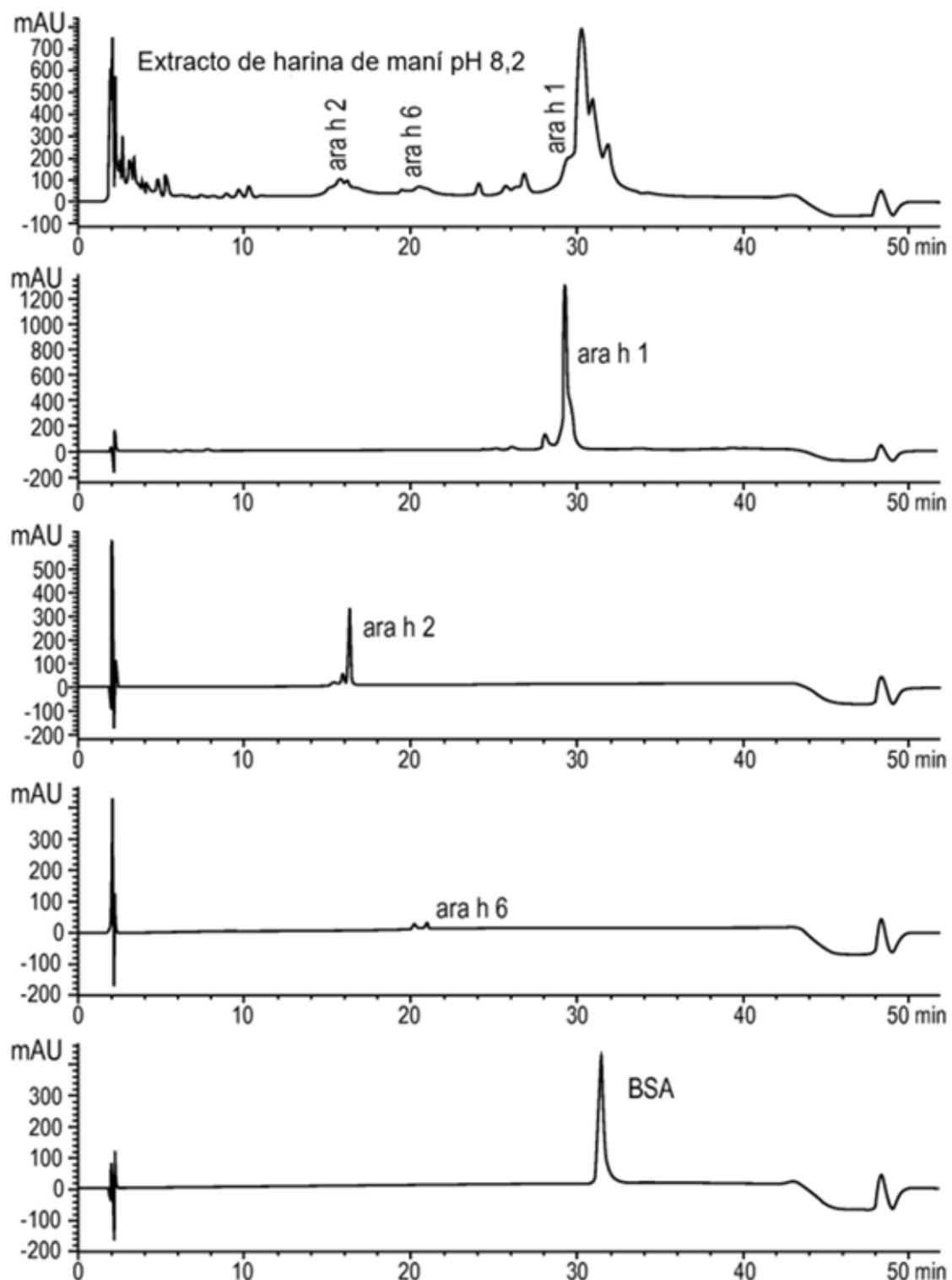
FIGURA 1

FIGURA 2

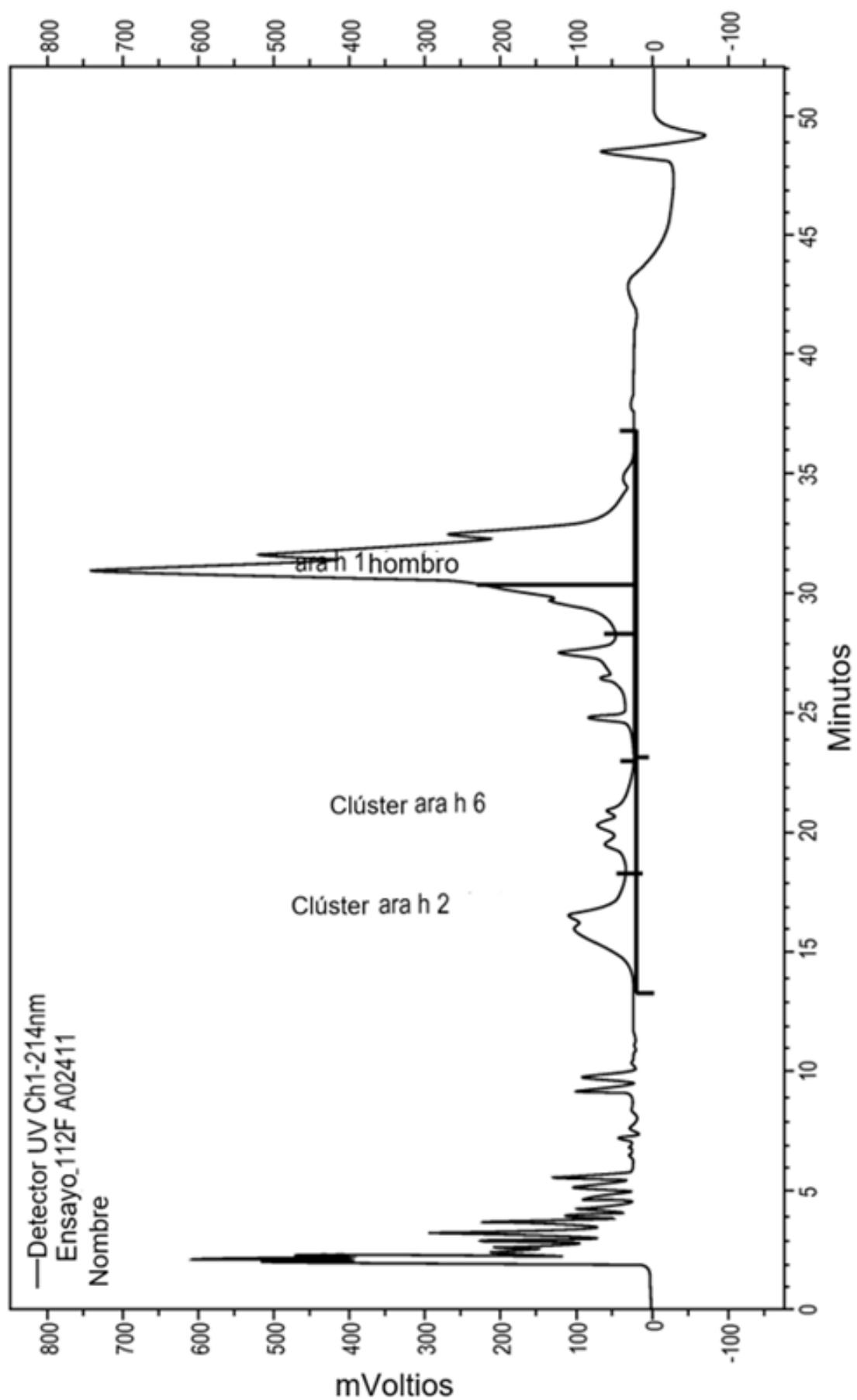


FIGURA 3

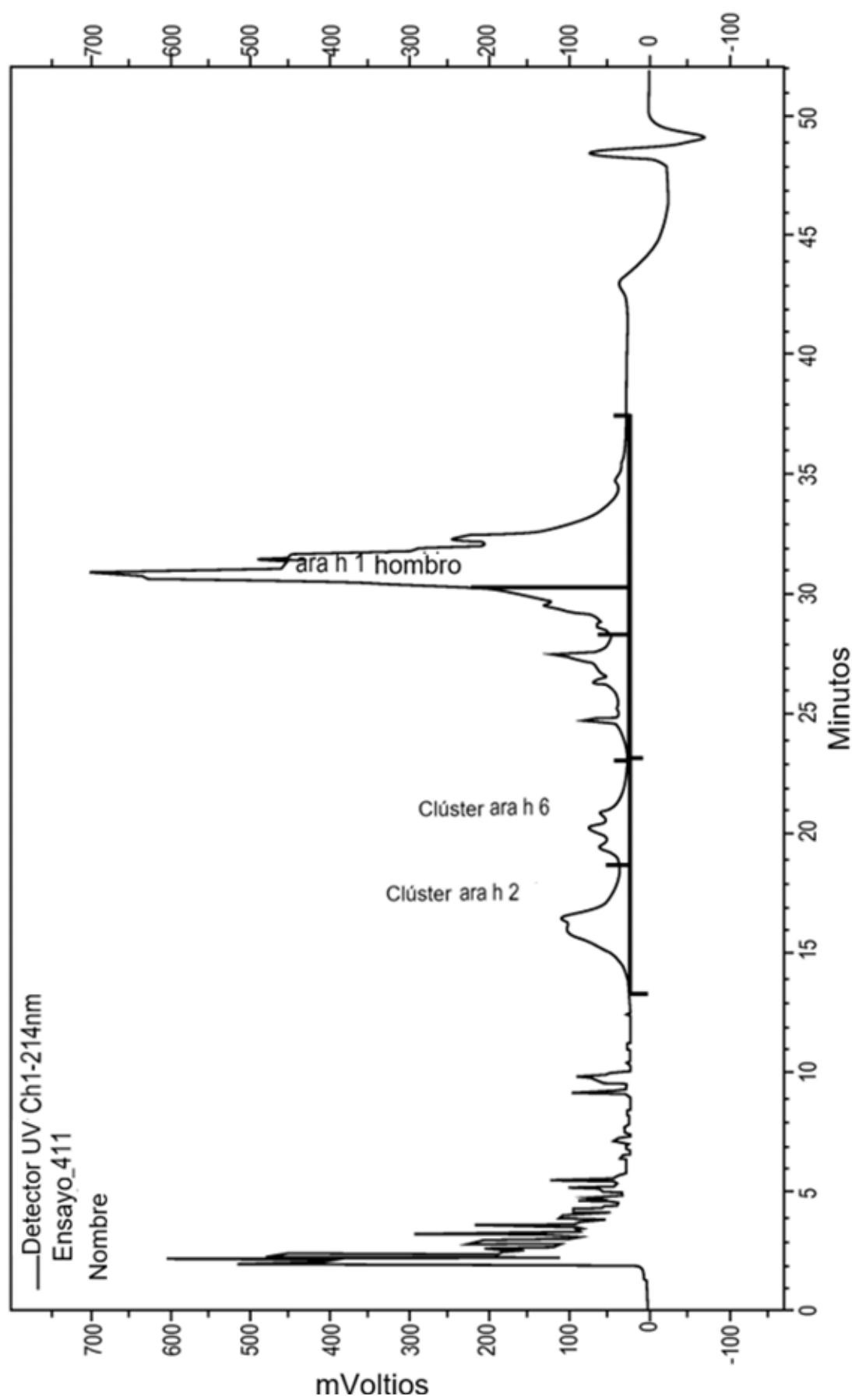


FIGURA 4

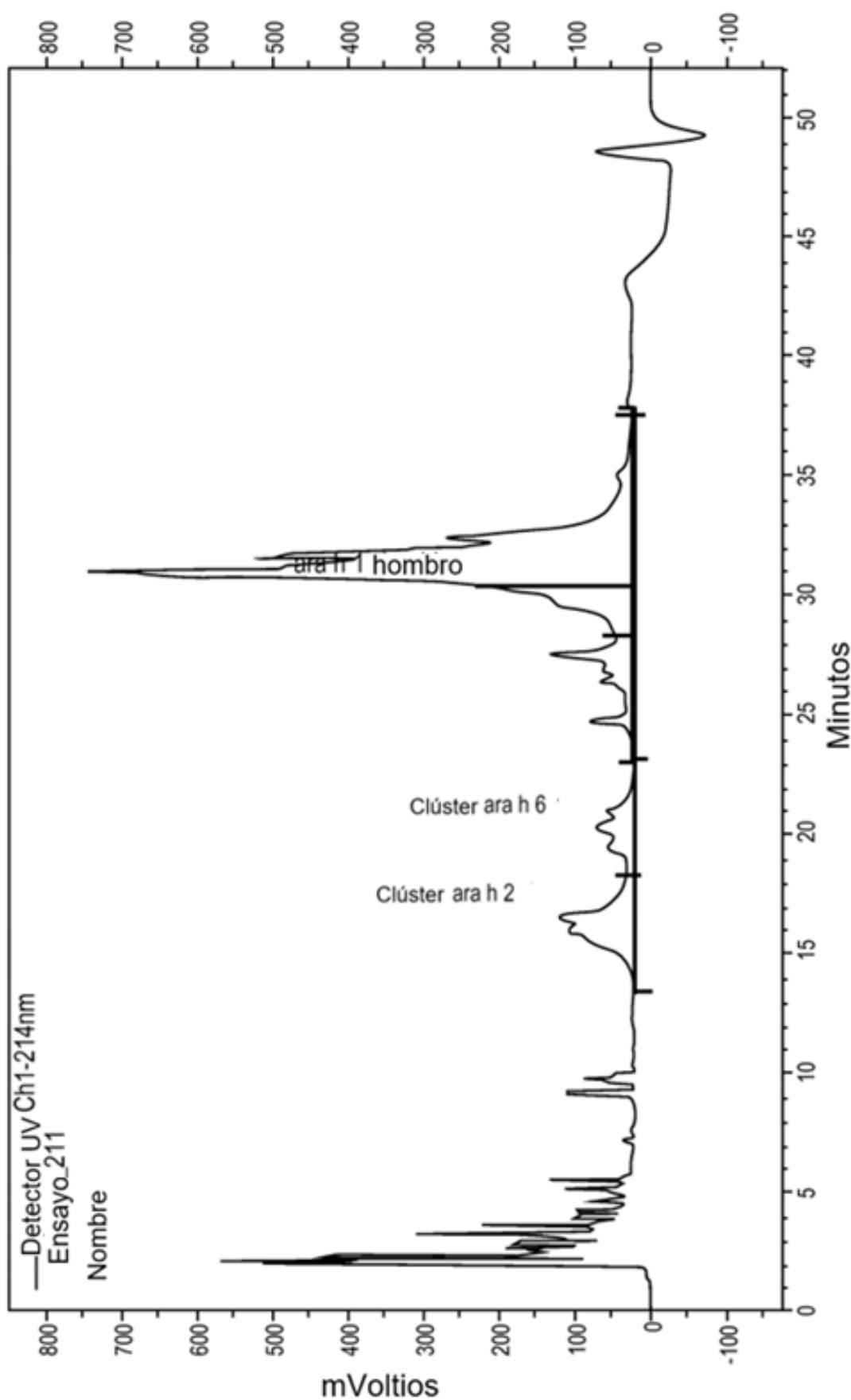


FIGURA 5

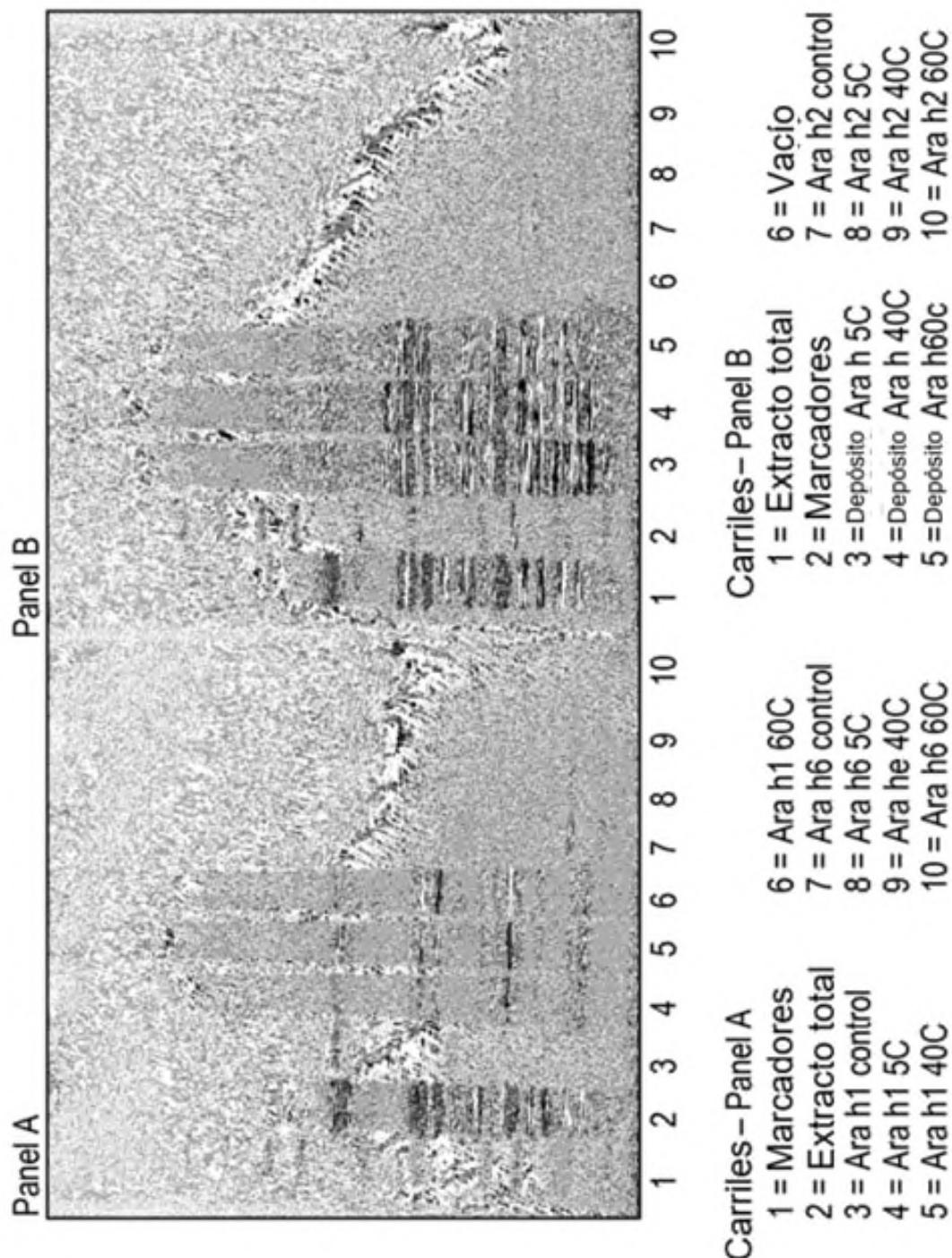
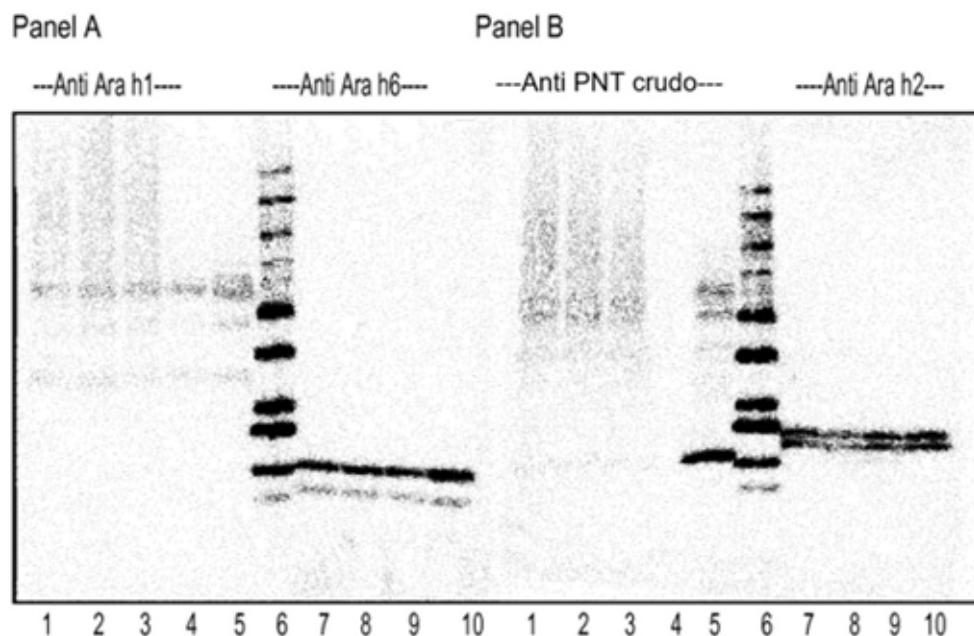


FIGURA 6



Carries – Panel A

1 = Ara h1 5C
2 = Ara h1 40C
3 = Ara h1 60C
4 = Ara h1 control
5 = Extracto total

Carries – Panel B

1 =Depósito Ara 5C 6 = Marcadores
 2 =Depósito Ara 40C 7 = Ara h2 5C
 3 =Depósito Ara 60C 8 = Ara h2 40C
 4 = Vacío 9 = Ara h2 60C
 5 = Extracto total 10 = Ara h2 control

FIGURA 7

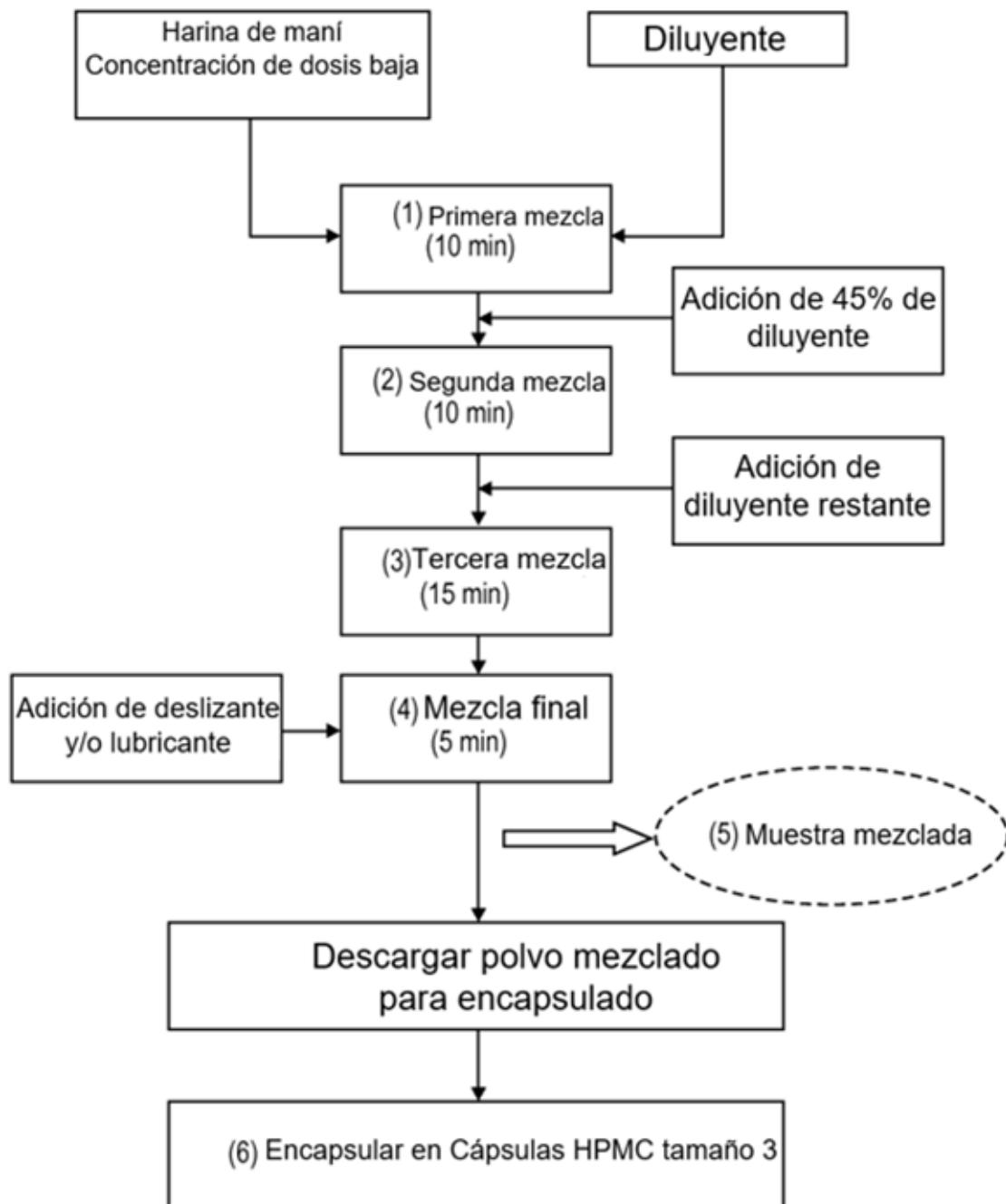


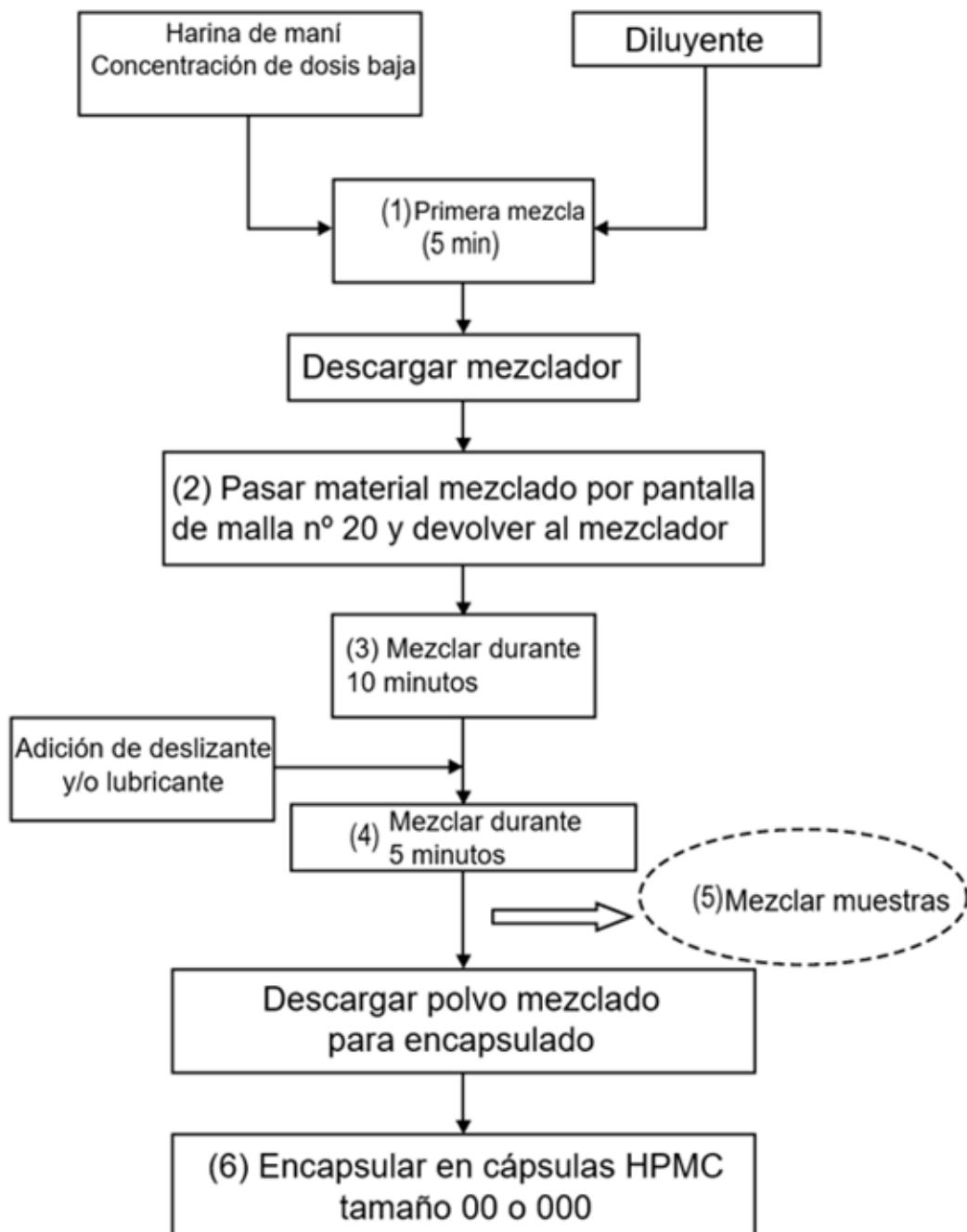
FIGURA 8

FIGURA 9

