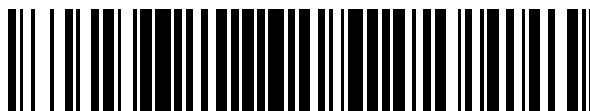


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 285**

51 Int. Cl.:
A61K 9/19 (2006.01)
A46B 11/00 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06828761 .4**
96 Fecha de presentación: **22.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1966611**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.09.2008**

54 Título: **Procedimiento para evaluar la disolución de productos farmacéuticos**

30 Prioridad:
23.12.2005 DK 200501828
23.12.2005 US 753714 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.11.2012

73 Titular/es:
ALK-ABELLÓ A/S (100.0%)
BÖGE ALLÉ 6-8
2970 HÖRSBOLM, DK

72 Inventor/es:
SOERENSEN, LISE SMITH;
SCHWARTZ, ANNE PIECHOWICZ y
SOENDERGAARD-ANDERSEN, JAN

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 390 285 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

Procedimiento para evaluar la disolución de productos farmacéuticos

Campo Técnico

- 5 La presente invención se refiere al campo de la medición de la disolución y, más particularmente, a los procedimientos para pruebas de disolución reproducibles de productos farmacéuticos, como vacunas alérgenas.

Antecedentes de la invención

10 Un producto farmacéutico sólido, como un comprimido o cápsula, generalmente se encuentra compuesto por una mezcla de ingrediente(s) activo(s) y excipiente(s) (es decir, ingredientes farmacológicamente inactivos). La absorción predecible y reproducible de fármacos a partir de una forma de dosificación sólida después de la administración oral depende de varios factores, como la liberación de la sustancia de fármaco desde el producto de fármaco y la disolución o solubilización del fármaco en condiciones fisiológicas. En el caso de los fármacos como vacunas alérgenas bucodispersables, es muy importante que la forma de dosificación se disperse instantáneamente tras el contacto con la saliva de la cavidad oral para asegurarse de que la mayor cantidad posible de ingrediente activo esté presente a la mucosa de la cavidad oral.

15 Debido a la naturaleza crítica de la liberación de la sustancia de fármaco desde el producto de fármaco y la disolución o solubilización del fármaco, la prueba de disolución habitualmente es relevante para la predicción del desempeño *in vivo* del fármaco. Debido a que los estudios *in vivo* tienden a ser costosos y consumen tiempo y a que las preocupaciones éticas pueden limitar la conveniencia de estos estudios en humanos, las pruebas de disolución *in vitro* son deseables como una alternativa económica y de bajo riesgo.

20 Las autoridades que aprueban los fármacos como la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) habitualmente solicitan a las empresas farmacéuticas que determinen las características de la liberación de fármaco de cualquier producto farmacéutico nuevo para obtener la aprobación y dicha prueba también puede requerirse como un parámetro de calidad constante.

25 Se han desarrollado diversos protocolos para llevar a cabo pruebas de disolución *in vitro* y se utilizan rutinariamente tanto para el desarrollo del producto como para la garantía de calidad. A menudo, la prueba de disolución de fármaco se lleva a cabo mediante el uso de procedimientos farmacopeicos y aparatos recomendados, como la Farmacopea de los Estados Unidos y la Farmacopea europea, por ejemplo, USP 28 <711> y EP 5.0, 2.9.3. Los perfiles de disolución se utilizan a menudo por las autoridades de aprobación como la FDA y EMA para aceptar productos, exonerar de requisitos de bioequivalencia y respaldar solicitudes de otros requisitos de bioequivalencia diferentes a los recomendados. Los medios de disolución utilizados típicamente en dichas pruebas son, por ejemplo, tampones, agua y tampones de citrato. Cuatro tipos diferentes de aparatos de disolución, basados en diferentes procedimientos de agitación se encuentran disponibles comercialmente y tienen un reconocimiento farmacopeico. Estos aparatos son conocidos como: paletas, cesta, de flujo continuo y cilindro oscilante. De los cuatro tipos de aparatos, el aparato de paletas es el que se utiliza más comúnmente. Se conocen varios aparatos de prueba de disolución tipo paletas estándar, como los fabricados por Varian Inc., Distek Inc. y otros. Aunque los protocolos y aparatos exactos varían, todos los procedimientos de prueba de disolución de fármacos implican colocar el producto farmacéutico en un medio de disolución acuoso (por ejemplo, agua y/o tampones) y aplicar alguna forma de agitación al medio de disolución para promover la desintegración y disolución del producto sometido a prueba.

30 35 40 Blanco-Prieto et al., Int. J. Pharm. 184 (2), 1999, 243-250, divulgan un medio de prueba para estudiar la cinética de la liberación de un análogo de somatostatina a partir de microesferas de poli(D,L-lactida-co-glicolida). El medio de prueba fue el tampón fosfato salino (PBS) a diferentes pH y molaridades y con o sin un 1, un 5 y un 10% de albúmina de suero bovino (BSA) o un 1, un 4 y un 10% de albúmina de suero humano (HSA). A continuación se determinó la concentración del análogo de somatostatina mediante HPLC.

45 Tacha et al. (*Journal of Histotechnology*, volumen 15, no. 2, 1992, páginas 127-132) divulgan que la caseína reduce la tinción de fondo no específica en las técnicas de inmunomarcación. La caseína resultó ser un agente de bloqueo superior en la reducción de tinción de fondo no específica.

50 Puede accederse al sistema inmune a través de, entre otros, la cavidad oral y la mucosa bucal, por ejemplo, administración sublingual de alérgenos como una vía de administración conocida. Al igual que para la mayoría de los productos farmacéuticos es muy importante administrar una dosis correcta de un alérgeno a un paciente. Las condiciones de prueba de disolución deben basarse en las características fisicoquímicas de la sustancia de fármaco y las condiciones medioambientales a las que la forma de dosificación pueda exponerse después de la administración oral. Muchos de los medios de disolución conocidos se desarrollan para formulaciones orales para ser

tragadas y absorbidas a través del tracto gastrointestinal y no son adecuadas para los productos farmacéuticos para dispersarse en la boca, como debajo de la lengua, y actuar en la cavidad oral.

Además, habitualmente las proteínas son inestables en solución, especialmente cuando se encuentran en una concentración baja y pueden desnaturalizarse con la adsorción en superficies como superficies de vidrio como resultado.

El ingrediente activo en un comprimido alérgico es una mezcla de proteínas algunas de las cuales pueden tener una estabilidad baja en solución, química así como física, y por consiguiente, las consideraciones de estabilidad son de gran importancia para la elección adecuada del medio de disolución. Los medios de disolución utilizados comúnmente no son adecuados para la disolución de formas de dosificación sólidas que contienen proteínas como los alérgicos en concentración baja debido a su inestabilidad física o desnaturalización en solución.

Por consiguiente, es muy deseable un medio de disolución que permita la disolución reproducible de productos que contienen proteínas, que sea farmacéuticamente relevante y que supere los problemas con la adsorción en la superficie.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para determinar la cantidad de ingrediente activo liberado de una forma de dosificación farmacéutica sólida en el cual el ingrediente activo es una o más proteínas, procedimiento que comprende las siguientes etapas:

(a) permitir que dicha forma de dosificación sólida libere el ingrediente activo en un medio de disolución que comprende de un 0,05 a un 2,0 % de caseína y de 0,005 a 1,0 M de tampón fosfato salino y que tiene un pH en el intervalo de 6 a 8,5; y

(b) determinar la cantidad de ingrediente activo en la solución.

Descripción detallada de la invención

Prueba de disolución

Se ha encontrado que mediante el uso del procedimiento de conformidad con la invención para determinar la cantidad de ingrediente activo liberada de una forma de dosificación sólida de un producto farmacéutico que contiene proteínas, especialmente formas de dosificación sólidas que contienen proteínas en dosis bajas como alérgicos y proteínas altamente poderosas, es posible obtener una prueba de disolución reproducible y fisiológicamente relevante de un producto farmacéutico sin los problemas mencionados anteriormente con, por ejemplo, la desnaturalización y adsorción.

De conformidad con la invención, el procedimiento para determinar la cantidad de ingrediente activo liberado de la forma de dosificación farmacéutica sólida en el cual el ingrediente activo es una o más proteínas, comprende las siguientes etapas:

(a) permitir que dicha forma de dosificación sólida libere el ingrediente activo en un medio de disolución que comprende de un 0,05 a un 2,0 % de caseína y de 0,005 a 1,0 M de tampón fosfato salino y que tiene un pH en el intervalo de 6 a 8,5; y

(b) determinar la cantidad de ingrediente activo en la solución.

En un aspecto de la invención, el medio de disolución tiene un pH en el intervalo de 6 a 8,5. En otro aspecto de la invención, el medio de disolución tiene un pH en el intervalo de 6 a 8. En otro aspecto de la invención, el medio de disolución tiene un pH en el intervalo de 6,2 a 7,6. En otro aspecto adicional de la invención, el medio de disolución tiene un pH en el intervalo de 6,4 a 7,4. En otro aspecto de la invención, el medio de disolución tiene un pH en el intervalo de 6,6 a 7,3. En otro aspecto de la invención, el medio de disolución tiene un pH en el intervalo de 6,7 a 7,2. En otro aspecto de la invención, el medio de disolución tiene un pH en el intervalo de 6,7 a 6,9.

En un aspecto de la invención, el medio de disolución comprende de un 0,1 a un 1,0 % de caseína. En un aspecto adicional de la invención, el medio de disolución comprende de un 0,3 a un 0,7% de caseína. En otro aspecto de la invención, el medio de disolución comprende aproximadamente un 0,5% de caseína.

Siempre que en la presente se proporcione el porcentaje de una sustancia (como por ejemplo, caseína) en un medio líquido, el porcentaje se indica como p/v %. El p/v % se calcula basado en gramos en 100 ml de líquido.

El tampón de fosfato salino (también abreviado como PBS) es una solución salina tamponada con fosfato utilizada comúnmente. El tampón ayuda a mantener el pH constante. En un aspecto de la invención, el tampón fosfato salino tiene una molaridad inferior a 1,0 M. En un aspecto adicional de la invención, el tampón fosfato salino tiene una molaridad inferior a 0,5 M. En aún otro aspecto de la invención, el tampón fosfato salino tiene una molaridad inferior a 0,1 M. En otro aspecto de la invención, el tampón fosfato salino tiene una molaridad superior a 0,005 M. En otro aspecto de la invención, el tampón fosfato salino es un tampón fosfato salino 0,005 a 1,0 M. En aún otro aspecto de la invención, el tampón fosfato salino es un tampón fosfato salino 0,005 a 0,5 M. En un aspecto adicional de la invención, el tampón fosfato salino es un tampón fosfato salino 0,005 a 0,1 M. En otro aspecto de la invención, el tampón fosfato salino es un tampón fosfato salino 0,005 a 0,05 M. En otro aspecto de la invención, el PBS comprende cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato de potasio monobásico y fosfato de sodio monobásico.

Siempre que en la presente se proporcione la molaridad del PBS, es la molaridad de los iones de fosfato en el PBS a que se hace referencia.

El medio de disolución comprende opcionalmente un detergente no iónico como un detergente no iónico seleccionado del grupo que consiste en Tween-20, Tween-80, Span 20 o Span 80.

En un aspecto de la invención, el medio de disolución es un tampón fosfato salino 0,01 M que comprende un 0,08% (p/v) de cloruro de sodio, un 0,02% (p/v) de cloruro de potasio, un 0,02% (p/v) de fosfato de potasio monobásico y un 0,144% de fosfato de sodio dibásico y un 0,5% de sal sódica de caseína (p/v) y agua desionizada.

El término "caseína" se refiere, como se utiliza en la presente, a la caseína o su sal como, por ejemplo, una sal sódica de caseína.

El medio de disolución puede prepararse mediante la mezcla del tampón fosfato salino (por ejemplo, 10 veces la concentración), la sal sódica de caseína y el agua desionizada y el ajuste del pH con cloruro de hidrógeno, como cloruro de hidrógeno 0,2M.

En un aspecto de la invención, el tampón de disolución comprende aproximadamente un 0,5% (p/v) de caseína, aproximadamente 0,01 M de PBS y tiene un pH de aproximadamente 6,8.

Las pruebas de disolución *in vitro* de una forma de dosificación sólida como una forma de dosificación sólida de dispersión rápida, pueden utilizarse para evaluar la calidad lote a lote de un producto de fármaco, guiar el desarrollo de nuevas formulaciones, asegurar la continuidad de la calidad del producto y su rendimiento después de los cambios, como cambios en la formulación, el proceso de fabricación, el sitio de fabricación, y el aumento de escala del proceso de fabricación, y la prueba de la vida útil del producto. En un aspecto de la invención, la prueba de disolución se utiliza para evaluar la calidad lote a lote de una forma de dosificación sólida. En otro aspecto de la invención, la prueba de disolución se utiliza para evaluar la vida útil de una forma de dosificación sólida.

Duración de la disolución

Se permite que la forma de dosificación sólida libere el ingrediente activo durante un periodo de tiempo, por lo cual se forma al menos una solución parcial de la forma de dosificación sólida antes de extraer una muestra. En función de la forma de dosificación sólida particular, y por ejemplo, el aparato y la agitación seleccionados, el tiempo previo a la extracción de la muestra para la determinación del ingrediente activo dependerá del producto particular para probarse y puede determinarse por el entendido en la técnica. En un aspecto de la invención, se deja que la forma de dosificación sólida libere el ingrediente activo durante un periodo de tiempo al menos lo suficientemente prolongado para obtener una solución homogénea que haga posible la obtención de resultados reproducibles de las muestras probadas. Después de un cierto tiempo, se liberan al menos algunos de los ingredientes activos y la muestra puede filtrarse antes de determinar la cantidad de ingrediente activo liberada en un periodo de tiempo dado.

En un aspecto de la invención, el muestreo se realiza en el curso de los 15 minutos de la colocación de la forma de dosificación sólida en el aparato de disolución. En un aspecto adicional de la invención, el muestreo se realiza en el curso de los 10 minutos de la colocación de la forma de dosificación sólida en el aparato de disolución. En aún otro aspecto de la invención, el muestreo se realiza en el curso de los 5 minutos de la colocación de la forma de dosificación sólida en el aparato de disolución. En aún otro aspecto de la invención, el muestreo se realiza en el curso de los 3 minutos o dentro de 1 minuto de la colocación de la forma de dosificación sólida en el aparato de disolución. En un aspecto de la invención, el muestreo se realiza en el curso de los 15 minutos de la colocación de la forma de dosificación sólida en el medio de disolución. En un aspecto adicional, el muestreo se realiza en el curso de los 10 minutos de la colocación de la forma de dosificación sólida en el medio de disolución. En un aspecto adicional, el muestreo se realiza en el curso de los 5 minutos de la colocación de la forma de dosificación sólida en el medio de disolución. En un aspecto adicional, el muestreo se realiza en el curso de los 3 minutos de la colocación de la forma de dosificación sólida en el medio de disolución. En un aspecto adicional, el muestreo se realiza en el curso de 1

minuto de la colocación de la forma de dosificación sólida en el medio de disolución.

Especificaciones de disolución

5 En función del producto de fármaco que se desde probar, pueden utilizarse especificaciones de un único punto, especificaciones de dos puntos o perfiles de disolución como se describe en, por ejemplo, la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) 28 <711> y la Farmacopea europea (EP) 5.0, 2.9.3. Generalmente, las especificaciones de un único punto se utilizan para pruebas de calidad de rutina para productos de fármaco altamente solubles y de disolución rápida. Las especificaciones de dos puntos se utilizan generalmente para caracterizar la calidad y como una prueba de control de calidad de rutina de las formas de dosificación de liberación controlada.

Aparato

10 Puede utilizarse cualquier aparato adecuado para la disolución de un producto de fármaco. Actualmente, los procedimientos de prueba de disolución empleados más comúnmente son (1) el procedimiento de cesta y (2) el procedimiento de paletas. Estos dos aparatos para los procedimientos de disolución *in vitro* se describen en USP 28 <711> y EP 5.0, 2.9.3. Otros procedimientos de disolución que también se describen en la Farmacopea de los Estados Unidos y Europea son el procedimiento de cilindro de doble acción y el procedimiento de sistema celular de
15 flujo continuo. En muchos casos puede ser deseable obtener una correlación *in vivo* adecuada con los datos de liberación *in vitro* y la elección final de cualquiera de estas metodologías actuales u otras alternativas/modificaciones dependerá del producto de fármaco particular para probarse. Las metodologías de disolución mencionadas anteriormente y los aparatos pueden utilizarse generalmente con muestreo manual o procedimientos automatizados. En un aspecto de la invención, el procedimiento de aparato de paletas se utiliza con muestreo manual o automático.

20 Agitación

Después de haber sumergido el producto de fármaco en un recipiente de disolución adecuado, en general, deben mantenerse las condiciones de agitación moderada durante la prueba de disolución para evitar la desnaturalización o espumación y al mismo tiempo obtener una distribución homogénea en el recipiente. Con el uso del procedimiento de cesta, la agitación (o velocidad de agitación) generalmente es de 50 a 100 rpm y con el procedimiento de paletas,
25 generalmente es de 50 a 150 rpm. En un aspecto de la invención, el aparato de disolución es un aparato de paletas. El volumen del medio de disolución generalmente es de 500, 900 o 1000 mL. No obstante, puede seleccionarse cualquier volumen adecuado.

Determinación de la cantidad de ingrediente activo

30 Puede utilizarse cualquier procedimiento adecuado para determinar la cantidad de ingrediente activo, que sea adecuado con relación al ingrediente activo para medirse y el medio de disolución.

En un aspecto de la invención, el contenido de alérgeno de una forma de dosificación sólida puede determinarse mediante ensayos de inmunidad de rutina como ELISA, FIA, LIA y RID contra extractos de componentes tales como alérgenos fundamentales mediante el uso de una mezcla de anticuerpos estandarizada generada contra el extracto obtenido mediante el uso de procedimientos estándar, por ejemplo, anticuerpos producidos en ratones o conejos o
35 un conjunto de sueros de pacientes alérgicos.

En un aspecto de la invención, el ensayo es un ensayo ELISA.

Forma de dosificación sólida

40 El término "forma de dosificación sólida" se refiere en el presente contexto a una forma de dosificación unitaria que no es un líquido o un polvo cuando se administra en la cavidad oral, por lo que "formas de dosificación sólidas" se refiere, por ejemplo a comprimidos que contienen una dosis unitaria del ingrediente activo. La forma de dosificación sólida puede encontrarse en forma de comprimidos, cápsulas, lociones o comprimidos masticables. En un aspecto de la invención, la forma de dosificación sólida es un comprimido.

45 El término "forma de dosificación de dispersión rápida" se refiere en el presente contexto a las formas de dosificación que se dispersan en menos de aproximadamente 90 segundos, preferentemente en menos de aproximadamente 60 segundos, preferentemente en menos de aproximadamente 30 segundos, más preferentemente en menos de aproximadamente 20, aún más preferentemente en menos de aproximadamente 10 segundos en la cavidad oral, aún más preferentemente en menos de aproximadamente 5 segundos y más preferentemente en menos de aproximadamente 2 segundos después de ser recibida en la cavidad oral. En un aspecto de la invención, la forma de dosificación sólida es una forma de dosificación sólida de dispersión rápida. En un aspecto adicional de la invención,
50 la forma de dosificación sólida es una forma de dosificación sólida de dispersión rápida para la administración a la mucosa bucal.

El término "administración a la mucosa bucal" se refiere a una vía de administración en la cual la forma de dosificación se coloca en cualquier parte de la cavidad oral como, por ejemplo, debajo de la lengua para permitir que el ingrediente activo entre en contacto con la mucosa de la cavidad oral o la faringe del paciente para obtener un efecto local o sistémico del ingrediente activo. Un ejemplo de una vía de administración a la mucosa bucal es la administración sublingual.

El término "administración sublingual" se refiere a una vía de administración, en la cual la forma de dosificación se coloca debajo de la lengua para obtener un efecto local o sistémico del ingrediente activo.

El término "forma de dosificación farmacéutica sólida" como se utiliza en la presente, se refiere a una forma de dosificación sólida que comprende un ingrediente activo en una cantidad eficaz que sea capaz de curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una afección o enfermedad dada y sus complicaciones.

Las cantidades eficaces para cada propósito dependerán de la seriedad de la enfermedad o afección así como el peso y el estado general del individuo. Se entenderá que la determinación de una dosis adecuada puede lograrse mediante el uso de experimentación de rutina, mediante la construcción de una matriz de valores y la prueba de los diferentes puntos en la matriz, todo lo cual se encuentra dentro de las habilidades comunes del médico o veterinario capacitado.

Mediante el uso del procedimiento de conformidad con la invención es posible determinar la cantidad de ingrediente activo liberada de una forma de dosificación farmacéutica sólida, incluso cuando el ingrediente activo se encuentra presente en concentraciones muy bajas como en las formas de dosificación sólidas que comprenden alérgenos. En un aspecto de la invención, la cantidad de ingrediente activo (por ejemplo, alérgenos importantes) en la muestra de disolución es de 1 a 50 ng/ml.

El término "ingrediente activo" se refiere en el presente contexto a una o más proteínas.

El término "proteína" se refiere en el presente contexto a una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye cualquier proteína de origen natural, como proteína modificada, una proteína recombinante, una proteína mutante recombinante o cualquiera de sus fragmentos de proteína o mezclas de proteínas.

La siguiente lista de proteínas útiles se proporciona a los efectos ilustrativos y no pretende limitar en ninguna forma el alcance de las proteínas médicamente útiles que pueden determinarse mediante el uso del procedimiento de conformidad con la invención. alérgenos; proteínas de mamíferos, como, por ejemplo, hormona del crecimiento, que incluye la hormona del crecimiento humana y la hormona del crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona de estimulación tiroidea; lipoproteínas; α -1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona de estimulación de folículos; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación como el factor VIIIc, factor tisular y factor de von Willebrands; factores anticoagulantes como la Proteína C; factor natriurético atrial, tensioactivos pulmonares; un activador del plasminógeno, como uroquinasa o activador del plasminógeno tisular (t-PA); bombacina; trombina; factor- α y - β de necrosis tumoral; encefalinasa; RANTES (Regulador de la activación de las células T normalmente secretadas y expresadas); proteína inflamatoria de macrófagos humana (MIP-1- α); albúmina de suero, como albúmina de suero humano; sustancia inhibidora de Muller; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; DNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; una integrina; proteína A o D; factores reumatoideos; un factor neurotrófico como el factor neurotrófico derivado de los huesos (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso como NGF- β ; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) como TGF- α y TGF- β , incluido TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, o TGF- β 5; factor de crecimiento de insulina -I y -II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral); proteínas de unión al factor de crecimiento de insulina; proteínas CD como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina (EPO); trombopoyetina (TPO); factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética del hueso (BMP); un interferón como interferón - α , - β y - γ ; factores estimuladores de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-15; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de membrana; factor de aceleración de la descomposición (DAF); un antígeno viral como, por ejemplo, una porción de la envoltura del virus del SIDA; proteínas de transporte; receptores de búsqueda; adresinas; proteínas reguladoras; inmunoadhesinas; anticuerpos; oxitocina, vasopresina, hormona adrenocorticotropina y análogos, factor de crecimiento epidérmico, prolactina, somatostatina, "compuestos relacionados a GLP-1", gastrina, tetragastrina, pentagastrina, urogastrina, secretina, encefalinas, endorfinas, angiotensinas, hormona de liberación de tirotrópina, factor de estimulación de colonias de granulocitos, factor de estimulación de colonias de granulocitos macrófagos, factor de estimulación de colonias de macrófagos, renina, bradiquinina, bacitracinas, polimixinas, colistinas, tirocidina o gramidinas.

En el presente contexto el término "alérgeno" se refiere a cualquier proteína como una proteína de origen natural,

una proteína modificada, una proteína recombinante, una proteína mutante recombinante o cualquiera de sus fragmentos de proteína o mezclas de proteínas que se ha informado que inducen reacciones alérgicas, es decir, mediadas por IgE tras su exposición repetida a un individuo.

5 Los ejemplos de alérgenos de origen natural incluyen alérgenos de polen (árboles, malezas, hierbas y grama), alérgenos de ácaros (de, por ejemplo, ácaros del polvo doméstico y ácaros del almacenamiento), alérgenos de insectos (alérgenos de origen inhalante, de la saliva y del veneno), alérgenos de animales de, por ejemplo, saliva, pelo y caspa de, por ejemplo, perros, gatos, caballos, ratas, ratones, etc., alérgenos de hongos y alérgenos de alimentos.

10 Los alérgenos del polen importantes de árboles, gramas y malezas son aquellos que se originan de los órdenes taxonómicos de *Fagales*, *Coniferales*, *Lamiales*, *Pinales* y *Platanaceae* que incluyen, entre otros, abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*), olivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* y *Juniperus*), platano (*Platanus*), el orden de *Poales*, que incluyen, entre otros, gramas del género *Festuca*, *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale*, y *Sorghum* y de los órdenes de *Asterales* y *Urticales*, que incluyen, entre otros, malezas del género *Ambrosia*, *Artemisia* y *Parietaria*. Otros alérgenos de inhalación importantes son aquellos de los ácaros del polvo doméstico del género *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*, ácaros del almacenamiento, por ejemplo, *Lepidoglyphus*, *Glycyphagus* y *Tyrophagus*, aquellos de cucarachas, mosquitos y moscas, por ejemplo, *Blattella*, *Periplaneta*, *Chironomus* y *Ctenocephalides*, y aquellos de mamíferos como gatos, perros y caballos, alérgenos del veneno que incluyen aquellos que se originan por la picadura o mordida de insectos como los del orden taxonómico de *Hymenoptera* que incluyen abejas (superfamilia *Apidae*), avispas (superfamilia *Vespidae*), y hormigas (superfamilia *Formicoidea*). Los alérgenos de inhalación de hongos son, entre otros, los que se originan del género *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* y *Penicillium*.

15 Los ejemplos de alérgenos de alimentos son los alérgenos del trigo (por ejemplo, Tri a 18-19), alimentos crustáceos que incluyen camarones (por ejemplo, Met e 1, Pen a 1, Pen I 1, Pen m 1 y Pen m 2), gambas, cangrejos y langosta, pescado (por ejemplo, Gad c 1 y Sal s 1), huevos de gallina (por ejemplo, Gal d 1, Gal d 2), maní (por ejemplo, Ara h 1-8), soja (Gly m 1-4), leche de vaca (Bos d 4-8), nueces como almendras (Pru du 4), nueces de Brasil (Ber e 1, Ber e 2), castañas de cajú (Ana o 1-3), avellanas (por ejemplo Cor a 1.04, Cor a 2, Cor a 8) y nueces (por ejemplo Jug n 1-2, Jug r 1-3), apio (Api g 1, Api g 4, Api g 5), mostaza (Sin a 1 y Bra j 1) y semillas de sésamo (Ses i 1-6), como alérgenos del trigo (por ejemplo, Tri a 18-19), huevos de gallina (por ejemplo, Gal d 1, Gal d 2), maní (por ejemplo, Ara h 1-8), soja (Gly m 1-4), leche de vaca (Bos d 4-8).

20 Los ejemplos de alérgenos recombinantes incluyen a modo no taxativo proteínas/péptidos de polen de plantas, polen de gramas, polen de árboles, polen de malezas, veneno de insectos, proteínas de ácaros del polvo y del almacenamiento, caspa de animales, saliva, esporas fúngicas y alérgenos de alimentos (es decir, maní, leche, gluten y huevos) preparados mediante el uso de técnicas recombinantes. Los alérgenos recombinantes pueden obtenerse, por ejemplo, a gran escala, mediante el uso de sistemas de expresión microbiana que pueden cultivarse en fermentadores, producidos mediante técnicas de ADN recombinante o precursores químicos u otros químicos cuando se los sintetiza químicamente. En un aspecto de la invención, el alérgeno es rBet v 1, rAln g 1, rCor a 1, rCar b 1, rCry j 1, rCry j 2, rOle e 1, rAmb a 1, rArt v 1, rCyn d 1, rDac g 1, rDac g 5, rLol p 1, rLol p 5, rPhl p 1, rPhl p 5, rPoa p 1, rPoa p 5, rSor h 1, rDer f 1, rDer f 2, rDer p 1, rDer p 2, rEur m 1, rEur m 2, rGly d 2, rLep d 2, rTyr p 2, rBla g 1, rBla g 2, rFel d 1, rCan f 1, rCan f 2, rBos d 2, rEqu c 1, rEqu c 2, rMus m 1, rRat n 1, rApis m 1, rApi m 1, rApi m 2, rVes v 1, rVes v 2, rVes v 5, rDol a 5, rDol m 1, rDol m 2, rDol m 5, rPol a 1, rPol a 2, rPol a 5, rAlt a 1 o rCla h 1.

25 Los ejemplos de un alérgeno modificado incluyen alérgenos que se asocian de forma natural con afecciones de enfermedades alérgicas en individuos sensibles, en los cuales dicho alérgeno modificado recombinante se encuentra alterado en comparación con el alérgeno natural. Se incluyen las variantes de alérgenos que contienen pocos intercambios de aminoácidos, mutantes de alérgenos, oligómeros, fragmentos, variantes de eliminación, moléculas híbridas, alérgenos miristilados, glicosilados, palmitoilados y fosforilados y otras variantes. El alérgeno modificado puede producirse mediante cualquier procedimiento adecuado como el procedimiento de mutagénesis dirigida al sitio, procedimiento de PCR, síntesis química y mezcla de estos procedimientos.

30 Un alérgeno mutante recombinante difiere del tipo salvaje en que los genes para los alérgenos han sido modificados mediante procedimientos de manipulación genética de forma tal que los polipéptidos que codifican muestran sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de uno o varios aminoácidos en comparación con el tipo salvaje. Los ejemplos de un alérgeno mutante recombinante incluyen variantes de sustitución de alérgenos, variantes de adición, oligómeros, fragmentos, variantes de eliminación, moléculas híbridas y otras variantes.

35 En un aspecto de la invención, el procedimiento de conformidad con la invención se utiliza para medir la disolución de una forma de dosificación sólida que es una composición alérgica. En un aspecto adicional de la invención, la forma de dosificación sólida de alérgeno se encuentra en la forma de una forma de dosificación de dispersión rápida

para la administración oral pensada para dispersarse instantáneamente o rápidamente en la boca tras el contacto con la saliva para asegurar una máxima exposición del alérgeno al tejido inmunocompetente de la mucosa antes de tragarla.

- 5 En un aspecto de la invención, el ingrediente activo en la forma de dosificación sólida es uno o más alérgeno(s) seleccionados del grupo de Bet v 1, Aln g 1, Cor a 1 y Car b 1, Que a 1, Cry j 1, Cry j 2, Cup a 1, Cup s 1, Jun a 1, Jun a 2, Jun a 3, Ole e 1, Lig v 1, Syr v 1, Pla l 1, Pla a 1, Pla a 2, Amb a 1, Amb a 2, Amb t 5, Art v 1, Art v 2, Art v 3, Par j 1, Par j 2, Par j 3, Sal k 1, Ave e 1, Cyn d 1, Cyn d 7, Dac g 1, Fes p 1, Hol l 1, Lol p 1, Lol p 5, Pha a 1, Pas n 1, Phi p 1, Phi p 2, Phi p 3, Phi p 4, Phi p 5, Phi p 6, Poa p 1, Poa p 5, Sec c 1, Sec c 5, Sor h 1, Der. f 1, Der f 2, Der f 3, Der f 7, Der p 1, Der p 2, Der p 3, Der p 7, Der m 1, Eur m 1, Eur m 2, Gly d 1, Gly d 2, Lep d 1, Lep d 2, Blo t 1, Tyr p 2, Bla g 1, Bla g 2, Per a 1, Per a 3, Per a 7, Fel d 1, Fel d 2, Fel d 3, Fel d 4, Can f 1, Can f 2, Bos d 2, Equ c 1, Equ c 2, Equ c 3, Mus m 1, Rat n 1, Apis m 1, Api m 1, Api m 2, Ves v 1, Ves v 2, Ves v 5, Ves f 5, Ves g 5, Ves m 1, Ves m 2, Ves m 5, Ves p 5, Ves s 5, Ves vi 5, Dol m 1, Dol m 2, Dol m 5, Dol a 5, Pol a 1, Pol a 2, Pol a 5, Sol i 1, Sol i 2, Sol i 3 y Sol i 4, Alt a 1, Alt a 3, Alt a 4, Alt a 5, Alt a 6, Cla h 1, Cla h 2, Cla h 6, Asp f 1, Bos d 4, Mal d 1, Mal d 3, Gly m 1, Gly m 2, Gly m 3, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 5 o híbridos de cualquiera de estos.
- 10
- 15 En el presente contexto, los alérgenos Der p 2 y Der f 2 también se denominan alérgenos "Der gr. 2". Por consiguiente, la cuantificación de los alérgenos Der gr. significa la cuantificación total de la cantidad total de los alérgenos Der p 2 y Der f 2.

En un aspecto de la invención, el ingrediente activo es uno o más extracto(s) de alérgenos.

- 20 En el presente contexto, la expresión "extracto de alérgeno" se refiere a cualquier extracto obtenido mediante la extracción de un material biológico de fuente alergénica como se describe de forma general en "Allergenic extracts", H. Ipsen et al, capítulo 20 en *Allergy, principle and practise* (Ed. S. Manning) 1993, Mosby-Year Book, St. Louis. Tal extracto puede obtenerse mediante extracción acuosa de un material soluble en agua seguido de etapas de purificación como filtración para obtener la solución, es decir, el extracto. A continuación el extracto puede someterse a purificación y/o procesamiento adicional como liofilización con lo cual se extrae sustancialmente toda el agua.
- 25 Generalmente, un extracto de alérgeno comprende una mezcla de proteínas y otras moléculas. Las proteínas alérgicas a menudo se clasifican como un alérgeno fundamental, un alérgeno intermedio, un alérgeno menor o sin clasificación. El extracto de alérgeno generalmente comprende alérgenos fundamentales y menores. Los alérgenos fundamentales generalmente constituyen de aproximadamente un 5 a un 15% de un extracto de alérgeno promedio, más habitualmente aproximadamente un 10%. La clasificación de un alérgeno se basa en una evaluación de la importancia clínica del alérgeno particular y se proporciona a continuación. Es decir, el extracto puede encontrarse en forma acuosa o en forma liofilizada.
- 30

- Los ejemplos de alérgenos fundamentales importantes encontrados en un extracto incluyen los alérgenos de grama del grupo 1, 5 y 6 (por ejemplo, Phi p 1, 5 y 6), alérgenos de ácaros del polvo del grupo 1 y 2 (por ejemplo, Der p 1, Der p 2), alérgenos del polen de árboles 1 y 2 (por ejemplo, Bet v 1, Cry j 1, Cry j 2), alérgenos del polen de ambrosía 1 y 2 (Amb a 1, Amb a 2), alérgenos de gatos 1 (es decir, Fel d 1). En un aspecto adicional, el extracto de alérgeno comprende uno o más alérgenos del grupo que consiste en alérgenos de gramas del grupo 1, 5 y 6, alérgenos de ácaros del polvo del grupo 1 y 2, alérgenos del polen de árboles 1 y 2, alérgenos del polen de ambrosía 1 y 2 y alérgenos de gatos 1.
- 35

- La expresión "material biológico de fuente alergénica" como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier material biológico que comprende uno o más alérgenos. Los ejemplos de dichos materiales son ácaros PMB (cuerpo de ácaro puro) o WMC (cultivo de ácaro completo) polen sin grasa o con grasa de, por ejemplo, gramas, hierbas, malezas y árboles, pelo y caspa animal, piel, micelios y esporas de hongos, cuerpos, veneno o saliva de insectos y alimentos.
- 40

- Los materiales biológicos de fuente alergénica pueden comprender materiales contaminantes, como, polen y plantas extraños y restos de flores de un material biológico de fuente alergénica. El nivel máximo de contaminación aceptado con polen de otras especies es de un 1%. También debe encontrarse desprovisto de restos de flores y plantas, con un límite de un 5% en peso.
- 45

- En un aspecto de la invención, el ingrediente activo en la forma de dosificación sólida es uno o más extracto(s) de alérgenos de un material biológico de fuente alergénica que se selecciona del grupo de *Phleum pratense*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Betula verrucosa*, *Corylus avellana*, *Alnus glutinosa*, *Cryptomeria japonica*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Ambrosia trifida*, *Artemisia vulgaris* y *Felis domesticus*.
- 50

- En otro aspecto de la invención, el ingrediente activo es un extracto de polen de la grama Timothy - *Phleum pratense* - que comprende una mezcla de proteínas que incluyen, a modo no taxativo, uno o más de los alérgenos Phi p 1, Phi p 2, Phi p 3, Phi p 4, Phi p 5, Phi p 6, Phi p 7, Phi p 11, Phi p 12, Phi p 13. En un aspecto adicional de la invención, el ingrediente activo es una mezcla de un extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus* y un extracto de
- 55

Dermatophagoides faringe, que comprende una mezcla de proteínas que incluye, a modo no taxativo, uno o más de los alérgenos Der p 2, Der f 2, Der p 1 y Der f 1.

5 En otro aspecto de la invención, el ingrediente activo es un extracto de polen de abedul - *Betula verrucosa* - que comprende una mezcla de proteínas que incluye, a modo no taxativo, uno o más de los alérgenos Bet v 1, Bet v 2, Bet v 3, Bet v 4, Bet v 6, Bet v 7.

En otro aspecto de la invención, el ingrediente activo es un extracto de polen de ambrosía baja -*Ambrosia artemisiifolia*- y/o ambrosía gigante -*Ambrosia trifida*- que comprende una mezcla de proteínas que incluye, a modo no taxativo, uno o más de los alérgenos Amb a 1, Amb a 2, Amb a 3, Amb a 5, Amb a 6, Amb a 7 y Amb t 5.

10 El término "vacuna alérgena" como se utiliza en este contexto, comprende al menos un alérgeno que se origine de la misma fuente alergénica o que se origine de fuentes alergénicas diferentes, por ejemplo, alérgenos de la grama del grupo 1 y de la grama del grupo 5 o alérgenos de ácaros del grupo 1 y grupo 2 de diferentes especies de ácaros y gramas respectivamente, antígenos de malezas como, alérgenos de la ambrosía baja y gigante, diferentes alérgenos de hongos como *alternaria* y *cladosporium*, alérgenos de árboles como alérgenos de abedul, avellano, carpe, roble, cedro japonés y aliso, alérgenos de alimentos como alérgenos de maní, soja y de la leche.

15 En un aspecto adicional de la invención, las formas de dosificación para ser medidas son comprimidos alérgenos en forma de formas de dosificación sólida como se describe en, por ejemplo, WO2004047794 (ALK-Abelló), WO2004075875 (ALK-Abelló), EP 278 877 (Medibrevex), WO 200061117 (Scherer), o WO2000057856 (medicamento de Pierre Fabre).

20 En un aspecto adicional de la invención, la forma de dosificación sólida para utilizarse en el procedimiento de conformidad con la invención es una forma de dosificación sólida de dispersión rápida. Las formas de dosificación sólida especialmente útiles para la disolución mediante el procedimiento de conformidad con la invención, son, por ejemplo, como se describe en WO2004047794 que comprenden una red sólida del alérgeno y cualquier matriz soluble en agua o dispersable en agua. La red se obtiene mediante la sublimación del solvente de una composición en estado sólido, la composición comprende una solución del alérgeno y la matriz tal como la obtenida mediante
25 liofilización. Los excipientes farmacéuticamente aceptables que forman parte de la matriz en la forma de dosificación sólida de dispersión rápida son los agentes formadores de matrices y además otros excipientes adecuados como antiácidos, diluyentes, mejoradores, agentes mucoadhesivos, agentes saborizantes, agentes enmascarados del sabor, conservantes, antioxidantes, tensioactivos, mejoradores de la viscosidad, agentes colorantes, modificadores de pH, endulzantes, adyuvantes, desintegrantes, lubricantes etc. Todos estos excipientes se seleccionan de
30 conformidad con la práctica farmacéutica convencional en una forma comprendida por los entendidos en la técnica de la formulación de alérgenos terapéuticos. Los ejemplos de agentes formadores de matrices incluyen los excipientes derivados de proteínas animales o vegetales como gelatinas, dextrinas y soja, trigo y proteínas de semillas de psyllium; gomas como acacia, guar, agar y xantana; polisacáridos; almidón y almidón modificado, alignatos; carboximetilcelulosa; carrageninas; dextranos; pectinas; polímeros sintéticos como polivinilpirrolidona; y complejos de polipéptido/proteína o polisacáridos como complejos gelatina-acacia. Las gelatinas son una mezcla heterogénea de macromoléculas coloidales solubles en agua. Tales mezclas heterogéneas de distribución de pesos
35 moleculares promedio pueden obtenerse de la acción hidrolítica sobre el material rico en colágeno de origen animal como hueso, piel, tendones, ligamentos, etc. Las gelatinas pueden derivarse de mamíferos, por ejemplo, ganado, cerdos o no mamíferos, por ejemplo, peces acuáticos de sangre fría o caliente. Las gelatinas pueden ser hidrolizadas o no hidrolizadas, entrecruzadas o no entrecruzadas. Pueden ser además de tipo gelificante o no gelificante, el tipo no gelificante generalmente se deriva de los peces acuáticos de sangre fría. En otro aspecto particular de la invención se utiliza almidón. Los almidones son mezclas complejas de polímeros de carbohidratos. Como ejemplos de otros agentes formadores de matrices adecuados pueden mencionarse los azúcares como manitol, dextrosa, lactosa, galactosa y trehalosa; azúcares cíclicos como ciclodextrina; sales inorgánicas como
40 fosfato de sodio, cloruro de sodio y silicatos de aluminio; y aminoácidos que tienen de 2 a 12 átomos de carbono como una glicina, L-alanina, ácido L-aspartico, ácido L-glutámico, L-hidroxi prolina, L-isoleucina, L-leucina y L-fenilalanina.

En un aspecto de la invención, la forma de dosificación sólida comprende uno o más ingredientes que se seleccionan del grupo que consiste en manitol, celulosa, croscarmelosa de sodio, sílice y/o estearato de magnesio.

50 En un aspecto adicional de la invención, la forma de dosificación sólida comprende uno o más ingredientes que se seleccionan del grupo que consiste en manitol y gelatina de pescado.

En un aspecto de la invención, la forma de dosificación sólida es como se describe en WO2004047794 ejemplo 1, en el cual el ingrediente activo es un extracto de *Phleum pratense*.

55 En otro aspecto de la invención, la forma de dosificación sólida es como se describe en WO2004047794 en el cual el ingrediente activo es una mezcla de un extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus* y un extracto

Dermatophagoides farinae.

El término “aproximadamente” significa dentro de un intervalo aceptable para el valor particular como se determina por el entendido en la técnica, que dependerá en parte de cómo se mida o determine el valor, por ejemplo, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, “aproximadamente” puede significar un intervalo de hasta un 20%, preferentemente hasta un 10%, más preferentemente hasta un 5% y aún más preferentemente hasta un 1% de un valor dado.

Ejemplos

Materiales y procedimientos

Formas de dosificación sólida

10 Formas de dosificación sólida que contienen un extracto de *Phleum pratense*

Las formas de dosificación 1 y 2 que contienen *Phleum pratense* como el extracto de alérgeno se prepararon como se describe en el ejemplo 1 en WO2004047794 con los ingredientes como se describe en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Diferentes formas de dosificación sólida que contienen

Ingredientes	Forma de dosificación 1 % p/p	Forma de dosificación 2 % p/p	Forma de dosificación 3 % p/p
Gelatina de pescado	4,0 %	6,5 %	6,0 %
Manitol	3,0 %	5,5 %	5,08 %
Extracto de polen de hierba (<i>Phleum pratense</i>) SQ-T	125000 o 25000 o 2500	75000 o 25000 o 2500	75000 o 25000
NaOH	c.s.p. a pH 7,5	c.s.p. a pH 7,5	c.s.p. a pH 7,5
Agua purificada	c.s.p. a 250 mg	c.s.p. a 250 mg	c.s.p. a 250 mg
% total/ peso húmedo	100%	100%	100%
Peso unitario seco (valor teórico)	17,5 mg (excepto NaOH)	30,0 mg (excepto NaOH)	27,7 mg (excepto NaOH)

15 SQ-T: La unidad SQ-T se determina de conformidad con ALK-Abelló A/S's "SQ biopotency"- procedimiento de estandarización (<http://www.alk-abello.com>) y se asigna a los comprimidos. El procedimiento de estandarización comprende una evaluación de la calidad del extracto de alérgeno con relación a un estándar interno, cuantificación de los alérgenos fundamentales más importantes y comparación con el estándar interno, ajustes del contenido de alérgeno(s) fundamentales con relación a la referencia interna, proporcionamiento de nivel(es) constante(s) de alérgeno(s) fundamental(es) con relación a la unidad SQ-T y medición de la actividad alérgica total, es decir, concentración del extracto de alérgeno en términos de unión a IgE con relación al estándar interno.

Las formas de dosificación con diferentes cantidades de *Phleum pratense* pueden prepararse mediante el uso de los mismos ingredientes y procedimiento que se describe anteriormente.

Formas de dosificación que contienen el extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*.

25 La forma de dosificación 4 que contenía Der gr. 2, Der p 1 y Der f 1 como los alérgenos fundamentales se preparó de forma análoga a los procedimientos descritos en WO2004047794.

Procedimiento de disolución

30 En los siguientes ejemplos se utiliza el procedimiento de disolución descrito en EP 5.0, 2.9.3. La forma de dosificación sólida se sumerge en un aparato de paleta que contiene 500 ml 37°C de un medio de disolución. La velocidad de rotación y el tiempo en el cual se extraen las muestras se indican en cada ejemplo. Las muestras se filtran a través de un filtro de membrana de 0,22 µm antes del análisis mediante el procedimiento ELISA. En los

ejemplos 1 a 4, los experimentos se realizaron en tres o seis réplicas (n=3 o n=6), los resultados se proporcionan como una media de los tres o seis valores y se establece el número de réplicas (n) para cada ejemplo. El procedimiento de disolución descrito se valida. Para la forma de dosificación 3, 75000 SQ-T, y n = 6, la precisión intermedia (coeficiente de variación) CV_{ip} es $\leq 15,5\%$ y la repetibilidad (coeficiente de variación) CV_{rep} es $\leq 3,7\%$.

5 Preparación del medio de disolución 0,5% (p/v) de Caseína, PBS 0,01 M, pH 6,8.

El medio de disolución consiste en un tampón fosfato salino 0,01 M (las concentraciones en el tampón final son: un 0,08% (p/v) de cloruro de sodio, un 0,02% (p/v) de cloruro de potasio, un 0,02% (p/v) de fosfato de potasio monobásico y un 0,144% (p/v) de fosfato de sodio dibásico), un 0,5% de sal de sodio caseína (p/v) y agua desionizada. El medio de disolución se prepara mediante la mezcla del tampón fosfato salino (por ejemplo, 10 veces la concentración, Bie & Berntsen), la sal sódica de caseína (ICN Biomedicals) y el agua desionizada y el ajuste del pH a 6,8 con cloruro de hidrógeno 0,2 M.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para el alérgeno fundamental de *Phleum pratense* 5 (Phl p 5)

La prueba se realizó mediante el uso de la técnica ELISA basada en Obispo *et al*, Allergy, 1997,52, páginas 806-813.

15 El procedimiento ELISA mide la actividad del alérgeno fundamental de *Phleum pratense* 5 (Phl p 5). Dos anticuerpos monoclonales (ALK-Abello A/S, DK) que reaccionan con diferentes epítomos en la molécula de Phl p 5 se recubrieron en la placa de microtitulación durante la noche a 4°C. Después del lavado (4 veces con tampón de lavado, PBS 0,01 M, 0,05% Tween-20) y bloqueo de la placa con el agente de bloqueo (tampón de caseína al 2%), se aplicaron las muestras/referencias que después se unen a los anticuerpos. Después de otro lavado (4 veces con tampón de lavado) los anticuerpos policlonales de conejos biotinilados (ALK-Abello A/S, DK) contra antígenos de *Phleum pratense* se aplicaron a los pocillos y se dejaron reaccionar.

20 Después de 4 lavados con tampón de lavado, la estreptavidina acoplada a HRP (peroxidasa del rábano picante) (DAKO, Dinamarca) se aplicó a los pocillos y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente (agitación). Después del lavado 4 veces con tampón de lavado, se aplicó sustrato (TMB, KEM EN TEC) para la enzima de HRP y se dejó reaccionar durante 20 minutos, y la reacción después se detuvo con ácido sulfúrico 0,5 N. El color desarrollado se midió a 450 nm en un espectrofotómetro, por ejemplo, un contador Multilabel Víctor 2.

25 Las muestras de los experimentos de disolución se diluyeron en tampón de dilución ELISA (0,5% de Caseína, PBS 0,01 M, 0,05% de Tween-20, pH 7,2) antes de los análisis de ELISA. Las muestras en el intervalo de 2,4 - 40 SQ-T/ml pueden analizarse con el Phl p 5 ELISA.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para Der gr. 2, Der p 1 y Der f 1

30 La cuantificación de los alérgenos fundamentales (Der gr. 2, Der p 1 y Der f 1) en las muestras de disolución se realizó mediante ELISA para Der gr. 2, Der p 1 y Der f 1 como se describe anteriormente para Phl p 5, excepto que el anticuerpo policlonal de conejo no era biotinilado y la estreptavidina acoplada a HRP se reemplazó por un anticuerpo policlonal acoplado a HRP cabra anti-conejo. Los valores medidos se compararon con un valor de referencia. Para cada configuración de ELISA se determinó el alérgeno fundamental de un comprimido de una concentración de dosis relevante como referencia para una disolución del 100%. También se realizó la comparación con una cantidad marcada cuando fue adecuado. Todos los análisis de ELISA se realizaron inmediatamente después de la realización de la prueba de disolución.

Ejemplo 1

40 La prueba de varios medios de disolución se realizó mediante el uso del procedimiento de disolución como se describe anteriormente con el uso de 50 rpm. Cada muestra extraída del recipiente de disolución se diluyó en un tampón de dilución ELISA que contenía un 0,5% de caseína, PBS 0,01 M, un 0,05% de Tween-20, y con un pH de 7,2 a una concentración de alérgeno fundamental dentro del intervalo de la curva estándar de ELISA. La disolución se midió a través del ensayo ELISA descrito anteriormente para *Phleum pratense*.

45 Se probaron los siguientes medios de disolución: PBS 0,01 M, pH 6,8 (H), tampón de acetato 0,3 M, 0,9 % de NaCl, pH 4,0 (I), 0,063 M de HCl, pH 1,2 (J), y 0,5 % de caseína, PBS 0,01 M, pH 6,8 (K). Las muestras se extrajeron a los 5, 15, 60, 120 minutos en el experimento H), I), J) y K). La caseína se precipitó inmediatamente en los experimentos A) a C). Para el medio en los experimentos D) a G) se realizó una curva estándar de ELISA para *Phleum pratense*.

Las formas de dosificación sólidas probadas se describieron anteriormente "Forma de dosificación 1 o 2" que contenían *Phleum pratense* como el extracto de alérgeno a una dosis de 75000 SQ-T en todos los experimentos.

Tabla 2. Prueba de varios medios de disolución.

Experimento	Medio	Resultado
A	tampón de acetato 0,1 M, 0,5 % de caseína, 0,05 % de Tween, pH 4,0	Precipitación de caseína/ sin uso adicional
B	tampón de acetato 0,3 M, 0,9 % de NaCl, 0,5% de caseína, 0,05 % de Tween, pH 4,0.	Precipitación de caseína/ sin uso adicional
C	tampón de citrato 0,3 M, 0,9 % de NaCl, 0,5% de caseína, 0,05 % de Tween, pH 4,0.	Precipitación de caseína/ sin uso adicional
D	0,5 % de caseína, PBS 0,01 M, 0,05 % de Tween, pH 7,2.	Probado como tampón de dilución de ELISA estándar. Fue posible obtener una curva estándar de ELISA.
E	0,5 % de caseína, PBS 0,01 M, 0,05 % de Tween, pH 6,8.	Probado como tampón de dilución de ELISA estándar. Fue posible obtener una curva estándar de ELISA.
F	0,5 % de caseína, PBS 0,01 M, pH 6,8.	Probado como tampón de dilución de ELISA estándar. Fue posible obtener una curva estándar de ELISA.
G	PBS 0,01 M, pH 6,8.	Probado como tampón de dilución de ELISA. Los valores de absorbancia fueron muy bajos, no se obtuvo ninguna curva estándar.
H	PBS 0,01 M, pH 6,8.	Probado como tampón de disolución. 50 a 60% de liberación a lo largo del periodo de disolución
I	tampón de acetato 0,3 M, 0,9% de NaCl, pH 4,0	Probado como tampón de disolución. Todas las muestras se precipitaron cuando se diluyeron en tampón de diluyente de ELISA debido a la precipitación de la caseína.
J	HCl 0,063 M, pH 1,2. (cont.)	Probado como tampón de disolución. Todas las muestras se precipitaron cuando se diluyeron en tampón de diluyente de ELISA debido a la precipitación de la caseína.
K	0,5 % de caseína, PBS 0,01 M, pH 6,8.	Probado como tampón de disolución. Liberación completa en 5 minutos.

Como se muestra en la tabla 2 anterior el medio con un 0,5% de caseína, PBS 0,01 M, a un pH de 6,8 presentó una

liberación completa dentro de los 5 minutos y fue adecuado como tampón diluyente de ELISA. Tanto el medio D como el E fueron adecuados como medio de disolución y tampón diluyente de ELISA.

Ejemplo 2

5 El procedimiento de disolución descrito anteriormente se realizó mediante el uso de 50 rpm y las muestras se extrajeron a los 5, 10 y 15 minutos. El medio de disolución utilizado fue el medio de disolución con un 0,5% de caseína, 0,01 M PBS, pH 6,8. Cada muestra extraída del recipiente de disolución se diluyó en un tampón de dilución de ELISA que contenía un 0,5% de caseína, PBS 0,01 M, un 0,05% de Tween-20, y con un pH de 7,2 a una concentración de alérgeno fundamental dentro del intervalo de la curva estándar de ELISA para *Phleum pratense*. La disolución se midió a través del ensayo ELISA descrito anteriormente para *Phleum pratense*.

10 Las formas de dosificación 1, 2 y 3 que contenían *Phleum pratense* como el extracto de alérgeno, preparadas como se describe anteriormente, se utilizaron con diferentes cantidades de ingrediente activo.

Tabla 3. Disolución de la forma de dosificación 1, 2 y 3 que contiene *Phleum pratense*.

Dosis	Forma de dosificación	% liberado de cantidad marcada		
		Media, n=6		
		5 min.	10 min.	15 min.
125000 SQ-T	1	95	99	101
75000 SQ-T	2	90	93	95
75000 SQ-T	2	89	91	93
75000 SQ-T	2	90	91	92
75000 SQ-T	3	83	84	84
75000 SQ-T	3	86	89	89
75000 SQ-T	3	88	92	92

15 La liberación completa se observa a los 5 minutos en todas las formas de dosificación. La variación en el porcentaje liberado de cantidad marcada puede explicarse por la variación del procedimiento inmunológico analítico utilizado y el contenido de ingrediente activo en la forma de dosificación que no es exactamente el 100%.

Ejemplo 3

20 El procedimiento de disolución descrito anteriormente se realizó mediante el uso de 50 rpm y las muestras se extrajeron en diferentes intervalos de tiempo (de 5 a 60 minutos). El medio de disolución utilizado fue el medio de disolución con un 0,5% de caseína, PBS 0,01 M, pH 6,8. Cada muestra extraída del recipiente de disolución se diluyó en un tampón de dilución de ELISA que contenía un 0,5% de caseína, PBS 0,01 M, un 0,05% de Tween-20, y con un pH de 7,2 a una actividad de alérgeno fundamental dentro del intervalo de la curva estándar de ELISA para *Phleum pratense*. La disolución se midió a través del ensayo ELISA descrito anteriormente para *Phleum pratense*.

25 Los resultados de la forma de dosificación 1 que contenía *Phleum pratense* como el extracto de alérgeno, preparada como se describe anteriormente, se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Disolución de las formas de dosificación que contienen diferentes concentraciones de *Phleum pratense*.

Dosis	Forma de dosificación	% liberado de cantidad marcada		
		Media, n=3		
		5 min.	15 min.	60 min.
2500 SQ-T	1	122	126	138
25000 SQ-T	1	103	107	109

75000 SQ-T	1	90	94	94
------------	---	----	----	----

La liberación completa se observa a los 5 minutos para las tres concentraciones. La variación en el porcentaje liberado de cantidad marcada puede explicarse por la variación del procedimiento inmunológico analítico utilizado y el contenido de sustancia activa en la forma de dosificación que no es exactamente el 100%.

5 **Ejemplo 4**

El procedimiento de disolución descrito anteriormente se realizó mediante el uso de 150 rpm y las muestras se extrajeron en diferentes intervalos de tiempo (de 30 segundos a 5 minutos). El medio de disolución utilizado fue el medio de disolución con un 0,5% de caseína, PBS 0,01 M, pH 6,8. Cada muestra extraída del recipiente de disolución se diluyó en un tampón de dilución de ELISA que contenía un 0,5% de caseína, PBS 0,01 M, un 0,05% de Tween-20, y con un pH de 7,2 a una concentración de alérgeno fundamental esperada dentro del intervalo de la curva estándar de ELISA para *Phleum pratense*. La disolución se midió a través del ensayo ELISA descrito anteriormente para *Phleum pratense*.

Se utilizó la forma de dosificación 3 que contenía *Phleum pratense* como el extracto de alérgeno, preparada como se describe anteriormente.

15 Tabla 5. Disolución de las formas de dosificación que contienen *Phleum pratense* a 150 rpm.

Dosis	Forma de dosificación	% de disolución liberado de cantidad marcada			
		Media, n=6			
		30 seg.	1 min.	3 min.	5 min.
75000 SQ-T	3	90	93	94	
75000 SQ-T	3	99	100	101	
75000 SQ-T	3	96	97	99	
75000 SQ-T	3	95		95	95

Los resultados muestran que la sustancia de fármaco se libera completamente dentro del primer minuto, lo que implica que se espera que la sustancia de fármaco se encuentre totalmente disponible para la interacción con la mucosa oral dentro del primer minuto.

20 **Ejemplo 5**

La disolución de la forma de dosificación 2 que contenía *Phleum pratense* como el extracto de alérgeno, 75000 SQ-T, se realizó en un recipiente en diferentes días para analizar todas las muestras en el mismo ensayo ELISA como se describe anteriormente para *Phleum pratense*. Las muestras se almacenaron a 2 a 8°C durante 0, 1, 2, 3, 4 y 7 días. Cada muestra extraída del recipiente de disolución se diluyó en un tampón de dilución de ELISA que contenía un 0,5% de caseína, PBS 0,01 M, un 0,05% de Tween-20, y con un pH de 7,2 a una concentración de alérgeno fundamental dentro del intervalo de la curva estándar de ELISA para *Phleum pratense*. La disolución se midió a través del ensayo ELISA descrito anteriormente para *Phleum pratense* en el día 0.

Tabla 6. Estabilidad de las muestras de disolución.

Día	Liberación media de la cantidad marcada después de 15 minutos (%), n=1
Día - 7	101
Día - 4	98
Día - 3	93
Día - 2	99

ES 2 390 285 T3

Día - 1	101
Día - 0	99

No se encontró ninguna degradación de las muestras. Esto muestra que el medio de disolución es muy estable y que las muestras pueden almacenarse a 2 a 8°C durante al menos 7 días antes de análisis.

Ejemplo 6

5 El procedimiento de disolución descrito anteriormente se realizó mediante el uso de 150 rpm y las muestras se extrajeron a los 1 y 15 minutos. Cada muestra se probó en 3 o 6 réplicas (n=3 o n=6). El medio de disolución utilizado fue el medio de disolución con un 0,5% de caseína, PBS 0,01 M, pH 6,8. Cada muestra extraída del recipiente de disolución se diluyó en un tampón de dilución de ELISA que contenía un 0,5% de caseína, PBS 0,01 M, un 0,05% de Tween-20, y con un pH de 7,2 a una concentración de alérgeno fundamental dentro del intervalo de la curva estándar de ELISA (Der gr. 2, Der p 1 y Der f 1) (0,39-50,0 ng/ml).

La forma de dosificación 4 que contenía Der gr. 2, Der p 1 y Der f 1 como los alérgenos fundamentales, preparada como se describe anteriormente, se utilizó con diferentes cantidades de sustancia activa.

15 La cuantificación de los alérgenos fundamentales (Der gr. 2, Der p 1 y Der f 1) en las muestras de disolución se realizó mediante ELISA para Der gr. 2, Der p 1 y Der f como se describe anteriormente. Los valores medidos se compararon con un valor de referencia. Para cada configuración de ELISA se determinó el alérgeno fundamental de un comprimido de una concentración de dosis relevante como referencia para una disolución del 100%. También se realizó la comparación con una cantidad marcada cuando fue adecuado. Todos los análisis de ELISA se realizaron inmediatamente después de la realización de la prueba de disolución.

20 Tabla 7. Disolución de formas de dosificación que contienen diferentes concentraciones de Der gr. 2, Der p 1. y Der f 1 a 150 rpm.

		Resultados como el % del contenido de alérgenos fundamentales Der gr. 2 en comparación con un valor de referencia que corresponde al 100% de liberación					
Dosis		0,5 min.	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	15. min.
Baja	n=3	95	87	84	84	87	83
Media	n=6		76	77	74		
Alta	n=3	114	110	104	104	104	106
		Resultados como el % del contenido de alérgenos fundamentales Der f 1 en comparación con un valor de referencia que corresponde al 100% de liberación					
Dosis		0,5 min.	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	15. min.
Media	n=3		89	89	88		
Alta	n=3		94		93		89
		Resultados como el % del contenido de alérgenos fundamentales Der p 1 en comparación con un valor de referencia que corresponde al 100% de liberación					
Dosis		0,5 min.	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	15. min.
Media	n=3		98	100	99		
Alta	n=3		112		110		108

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar la cantidad de ingrediente activo liberado de la forma de dosificación farmacéutica sólida en el cual el ingrediente activo es una o más proteínas, procedimiento que comprende las siguientes etapas:
- 5 (a) permitir que dicha forma de dosificación sólida libere el ingrediente activo en un medio de disolución que comprende de un 0,05 a un 2,0 % de caseína y tampón fosfato salino de 0,005 a 1,0 M y que tiene un pH en el intervalo de 6 a 8,5; en el cual la cantidad de ingrediente activo en una muestra de disolución es de 1 a 50 ng/ml; y
(b) determinar la cantidad de ingrediente activo en la solución.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el cual la forma de dosificación sólida es una forma de dosificación sólida de dispersión rápida.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el cual la forma de dosificación sólida es una forma de dosificación sólida de dispersión rápida para administración a la mucosa bucal.
4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual el ingrediente activo en la forma de dosificación sólida es uno o más extracto(s) de alérgenos.
- 15 5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el ingrediente activo en la forma de dosificación sólida es un extracto de *Phleum pratense*.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual el ingrediente activo en la forma de dosificación sólida es un extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*.
- 20 7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la liberación del ingrediente activo se lleva a cabo en un aparato de disolución, preferentemente un aparato de paletas.
8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el cual las rpm en el aparato de disolución son de 50 a 150 rpm.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se utiliza en la prueba de disolución para evaluar la calidad lote a lote de una forma de dosificación sólida.
- 25 10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se utiliza en la prueba de disolución para probar la vida en almacén de una forma de dosificación sólida.
11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual se deja que la forma de dosificación sólida libere el ingrediente activo en el medio de disolución durante un periodo de tiempo por medio de lo cual se forma al menos una solución parcial antes de extraer una muestra.
- 30 12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el cual el muestreo se realiza en el curso de los 15 minutos de la colocación de la forma de dosificación sólida en el medio de disolución.
13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la forma de dosificación sólida es un comprimido.