

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 506**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 39/145** (2006.01)

**A61K 47/36** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2011 PCT/US2011/055689**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2012 WO12048333**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2011 E 11779263 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2624815**

54 Título: **Forma de dosificación de disolución rápida de una vacuna oral usando almidón**

30 Prioridad:

**08.10.2010 US 391238 P**

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

**21.02.2017**

73 Titular/es:

**R.P. SCHERER TECHNOLOGIES, LLC (100.0%)  
2215 Renaissance Drive, Suite B  
Las Vegas, Nevada 89119, US**

72 Inventor/es:

**TIAN, WEI y  
MCLAUGHLIN, ROSIE**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 602 506 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**

Forma de dosificación de disolución rápida de una vacuna oral usando almidón

Campo técnico

5 La invención se refiere a una forma de dosificación de disolución rápida (FDDR) que comprende un almidón como un agente formador de matriz que potencia una respuesta inmunitaria para la administración de una vacuna. Más específicamente, la invención se refiere a una FDDR que contiene un almidón y, opcionalmente, manitol y gelatina como agentes formadores de matriz adicionales para la administración de una vacuna oral para estimular la inmunidad a una infección provocada por bacterias, virus tales como influenza, otros microorganismos o parásitos tales como protozoos o lombrices.

10 Antecedentes

Se conocen y están disponibles fácilmente una gran variedad de formas de dosificación para la ingestión oral en el campo médico. La más común de éstas es el comprimido. Las principales limitaciones de los comprimidos farmacéuticos incluyen un pobre cumplimiento del paciente debido a la dificultad en la deglución y la falta de biodisponibilidad del principio activo a través de la disolución ineficaz del comprimido.

15 Las formas de dosificación de disolución rápida (FDDR) son prácticas de usar y a menudo se usan para abordar problemas de cumplimiento del paciente. Existen muchas formas de FDDR, por ejemplo, comprimidos que se han comprimido "sin mucha rigidez" que comprenden una gran cantidad de agentes adsorbentes de la humedad/desintegrantes, comprimidos que comprenden una gran cantidad de agentes efervescentes, y comprimidos liofilizados. Más comúnmente, las formas de dosificación de disolución rápida, liofilizadas, que se  
20 diseñan para liberar el ingrediente activo en la cavidad oral, se formulan usando matrices basadas en gelatina rápidamente solubles. Estas formas de dosificación se conocen bien y pueden usarse para administrar una amplia gama de fármacos. La mayoría de las formas de dosificación de disolución rápida utilizan gelatina y manitol como vehículos o agentes formadores de matriz. (Seagar, H., "Drug-Delivery Products and Zydis Fast Dissolving Dosage Form," J. Pharm. Pharmaco, vol. 50, p. 375-382 (1998)).

25 A menudo se prefieren las FDDR fabricadas mediante el proceso de liofilización tales como la forma de dosificación Zydis®. Tienen las ventajas claras de un tiempo de desintegración más rápido (es decir, menos de 5 segundos, en lugar de 1 minuto para los comprimidos que se ha comprimido sin mucha rigidez), sensación más suave en la boca (es decir, sin la textura grumosa asociada con los agentes adsorbentes de la humedad fuertes en los comprimidos que se han comprimido), un potencial para una absorción pregástrica mejorada (de este modo, se reducen los  
30 efectos secundarios y se mejora la eficacia para ciertos medicamentos) y unas opciones de almacenamiento aumentadas.

Normalmente, la gelatina se usa para proporcionar una fuerza suficiente a la forma de dosificación para prevenir la rotura durante la retirada del paquete, pero una vez colocada en la boca, la gelatina permite la dispersión inmediata de la forma de dosificación. La gelatina de mamífero hidrolizada a menudo es el agente formador de matriz de  
35 elección en las FDDR debido a que se gelifica rápidamente tras el enfriamiento. También se puede usar la gelatina de pescado no gelificante. Durante el procesamiento, la solución/suspensión dosificada se congela preferentemente mediante el paso a través de un medio gaseoso. De este modo, la solución/suspensión se congela rápidamente, lo que mejora la eficacia de la fabricación.

40 Las vacunas, que son importantes en la profilaxis frente a una enfermedad, ejercen sus efectos provocando una respuesta inmunitaria, un efecto de los cuales es prevenir la infección por el organismo estimulante, o la aparición de los procesos de enfermedad que de otro modo se producirían cuando el antígeno frente al que se ha provocado la respuesta inmunitaria estimula de nuevo un tejido sensible. Las vacunas también pueden usarse terapéuticamente para modificar la naturaleza o el nivel de la respuesta inmunitaria a un antígeno para permitir a un huésped eliminar un patógeno al que ya se ha expuesto.

45 La mayoría de las vacunas que existen se administran mediante inyección, que es traumática, inapropiada, cara y puede fallar al inducir una respuesta inmunogénica apropiada en los tejidos de la mucosa. La mayoría de las infecciones afectan, o se inician, en las superficies de la mucosa. La inmunización activa frente a estos agentes infecciosos puede depender de la inducción competente de una respuesta inmunitaria de la mucosa. Las vacunas de la mucosa competentes pueden tanto proteger las superficies secretoras, es decir, la inmunidad de la mucosa, como  
50 también inducir una inmunidad sistémica mediante la inducción de los anticuerpos circulatorios. Las vacunas de la mucosa también son más fáciles de administrar a los pacientes y son menos caras de fabricar que las vacunas convencionales. La administración mediante inyección, por supuesto, no se dirige directamente a las superficies de la mucosa ni alcanza las ventajas asociadas con las vacunas orales.

La inducción de la inmunidad de la mucosa se evidencia por la aparición de inmunoglobulinas (Ig), de las que son particularmente significativos los anticuerpos IgA en la membrana mucosa que reviste la mucosa. La IgA ejerce múltiples efectos en la mucosa. Más especialmente, actúa para neutralizar los patógenos y componentes de patógenos, evitando su acceso y penetración en las capas epiteliales subyacentes, que es lo que provoca una infección. La estimulación de la inmunidad en un lugar de la mucosa se sabe que confiere protección a las membranas mucosas en otros lugares en el cuerpo. Potencialmente, las vacunas orales pueden usarse para inducir inmunidad frente a patógenos orales, gastrointestinales, respiratorios, urogenitales y oculares. Esta capacidad para generar inmunidad en lugares en el cuerpo lejos del punto de la estimulación antigénica original ha conducido al concepto de un sistema inmunitario común de la mucosa. Existen indicios adicionales de que la estimulación del sistema inmunitario de la mucosa puede inducir anticuerpos circulatorios protectores en el sistema inmunitario sistémico, particularmente anticuerpos IgG. Las vacunas de la mucosa óptimas también deberían inducir las respuestas de los linfocitos T, tales como la producción de las células T auxiliares que pueden apoyar la producción de un anticuerpo, y, para patógenos particulares, las células Th17, Th1, Th2 y linfocitos T citotóxicos (LTC) que actúan local y/o sistémicamente.

Las vacunas administradas vía oral pueden estimular el tejido linfoide asociado a la vía nasal en la boca y la región nasofaríngea, los ganglios linfáticos, las amígdalas y adenoides, y el tejido linfoide asociado al intestino en las placas de Peyer en el intestino delgado.

Las vacunas incorporan antígenos que pueden ser péptidos, proteínas, polisacáridos o fragmentos o extractos completos o parciales de bacterias, virus u otros microorganismos, a menudo atenuados para retirar los componentes tóxicos. Para que las vacunas produzcan el efecto protector deseado, la exposición al antígeno debe ser suficiente para provocar una respuesta inmunitaria en el receptor. Un problema principal en los procedimientos de vacunación es asegurar que estos antígenos o compuestos antigénicos alcanzan el lugar apropiado en cantidades suficientes para provocar la respuesta inmunitaria necesaria. Existen dos aspectos del sistema inmunitario que pueden proporcionar la respuesta inmunitaria necesaria cuando se estimula por un antígeno en un sistema de vacuna: el sistema inmunitario sistémico y el sistema inmunitario de la mucosa.

El sistema inmunitario de la mucosa consiste en áreas de tejidos linfoides inductoras y efectoras localizadas en el tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio, el tracto genitourinario y las membranas que rodean los órganos sensoriales. Los lugares inductores normalmente tienen una estructura linfoide organizada y la capacidad para detectar la presencia de antígenos en la mucosa. Las células presentadoras de antígeno en áreas localizadas del tejido linfoide tienen la capacidad de comenzar a absorber el antígeno y estimular las respuestas de las células T y B que dan como resultado la producción de células plasmáticas. Estas células plasmáticas pueden encontrarse localmente o en lugares efectoras a lo largo del cuerpo que secretan anticuerpos, tales como IgA. Las moléculas de IgA secretadas resisten la proteólisis y evitan la colonización y entrada de patógenos neutralizándolos o aglutinándolos. En otras situaciones, las moléculas de IgA activan la citotoxicidad mediada por células T dependientes de anticuerpos, en los casos donde un patógeno ha penetrado la barrera inicial. La estimulación del tejido de la mucosa también puede dar como resultado la producción de otros isotipos de anticuerpos, tales como IgG, IgM e IgE. Estos otros isotipos de anticuerpos pueden ejercer efectos de manera local en la mucosa, o tener efectos sistémicos, proporcionando de este modo una protección adicional si los patógenos logran penetrar la mucosa. Las respuestas de las células T inducidas en la mucosa también pueden presentarse en lugares de la mucosa o sistémicamente, lo que logra una protección de las superficies de la mucosa y una protección frente a los patógenos que penetran la mucosa.

La función principal de las células que forman el tejido linfoide es evitar la absorción de patógenos y toxinas o inactivar estos patógenos y toxinas tras la absorción por el tejido de la mucosa. En general, se requieren dosis considerablemente más altas de antígenos para la inmunización de la mucosa, especialmente cuando se destinan para la vía oral. Esto se debe a la existencia de barreras mecánicas y químicas eficaces y a la degradación y digestión de los antígenos por enzimas y ácidos. Además, existe una rápida eliminación del material de los tractos respiratorios y digestivos superiores al estómago mediante procesos mucociliares, peristálticos y secretores.

La mucosa ha evolucionado para evitar la inducción de respuestas inmunitarias efectoras frente a antígenos inofensivos tales como alimentos y partículas inhaladas. Por consiguiente, muchos antígenos que se introducen en las superficies de la mucosa inducen "tolerancia" en vez de respuestas de las células T y B productivas. Por lo tanto, existe una necesidad de superar estos procesos naturales para fabricar vacunas eficaces.

La dificultad se ha encontrado en preparar las formas de dosificación sólidas orales para administrar las vacunas a través de la vía mucosa y al mismo tiempo conservar la facilidad de administración y el confort del paciente. Ciertos pacientes que tienen dificultades para tragar normalmente son pobres candidatos para las vacunas orales sólidas con una residencia física aumentada en la cavidad oral de la forma de dosificación.

Las vacunas orales disponibles en el mercado son o bien vacunas atenuadas vivas (por ejemplo, polio, tifoidea, rotavirus) o vacunas inactivadas (por ejemplo, cólera) y son eficaces en provocar una respuesta inmunitaria de la mucosa apropiada debido a que su lugar natural de infección es la mucosa del intestino y la unidad de vacuna

desencadena los mecanismos de defensa inmunitarios naturales del cuerpo. Sin embargo, todavía no se han creado las vacunas orales eficaces y seguras de subunidades de vacunas (que contienen fragmentos antigénicos de microbios), vacunas toxoides o vacunas conjugadas. La administración oral de estas estrategias de vacunas basadas en péptidos se dificulta de manera significativa debido a su degradación en la exposición al ambiente ácido del estómago y a las enzimas proteolíticas que residen en el tracto gastrointestinal (TGI). También, el antígeno en general es demasiado grande para diseminarse a través de la mucosa del TGI en la circulación sistémica y no logra experimentar un transporte activo en la circulación sistémica. Por lo tanto, a menudo hay antígeno restante insuficiente para obtener o una respuesta inmunitaria sistémica o de la mucosa. Además, un pre-requisito de la respuesta de la mucosa en el TGI es la absorción de los antígenos por las células presentadoras de antígeno (CPA). La absorción de los antígenos solubles por las CPA es mucho menos eficaz que la de las micropartículas del antígeno. Por lo tanto, los antígenos solubles a menudo no logran alcanzar una respuesta inmunitaria adecuada, que puede, de hecho, conducir a la tolerancia al antígeno.

Se han empleado diversas estrategias para proteger los antígenos del duro ambiente del TGI y para facilitar una respuesta de la mucosa. Estas incluyen envolver el antígeno en liposomas, complejos inmunoestimuladores (ISCOM), proteosomas y micropartículas. Sin embargo, dichas estrategias todavía pueden requerir dosis muy altas de antígeno para administrarse, junto con la coadministración de adyuvantes de la mucosa para provocar una respuesta eficaz de anticuerpos humorales y mediada por células. Aún más, muchos de los adyuvantes en estudio, tales como la toxina del cólera, son altamente tóxicos en los seres humanos. Estos problemas existen sin tener en cuenta la fuente del antígeno (bacteriana, vírica, parasitaria, etc.).

Por lo tanto, existe una necesidad en el campo farmacéutico de formas de dosificación de vacunas orales mejoradas que administren eficazmente cantidades inmunogénicas de preparaciones antigénicas y resistan las barreras químicas y mecánicas a la absorción antigénica. Existe adicionalmente una necesidad de formas de dosificación orales sólidas que puedan inducir la respuesta inmunitaria tan eficazmente como una vacuna inyectable al tiempo que sean fáciles de fabricar y fáciles y confortables de administrar.

La Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º de Publicación 2008-0014260 divulga una forma de dosificación de dispersión rápida oral sólida para la administración de vacunas. Sin embargo, la publicación divulga una FDDR compuesta por manitol y gelatina como agentes formadores de matriz. La Patente de Estados Unidos n.º 6.509.040 muestra una composición farmacéutica para la administración oral en la forma de una forma de dosificación de dispersión rápida esencialmente libre de gelatina de mamífero y que comprende al menos un agente formador de matriz y un almidón. Ninguna de estas referencias muestra o sugiere los beneficios alcanzados por la presente invención, específicamente el efecto potenciador inmunológico del almidón.

El documento WO 2008/002663 se dirige a composiciones de polipéptidos que aumentan la inmunogenicidad, y los métodos de uso de las mismas. La respuesta inmunitaria de un huésped mamífero a un antígeno de interés se aumenta mediante la co-formulación del antígeno con una proteína inmunitaria bacteriana. En una realización de la invención, una proteína inmunitaria bacteriana se administra en una formulación con un compuesto antigénico, donde el compuesto antigénico y la proteína inmunitaria están presentes como moléculas separadas. La proteína inmunitaria actúa como un adyuvante para aumentar la respuesta inmunitaria al compuesto antigénico. En otra realización, una formulación antigénica, por ejemplo, una vacuna, comprende una proteína inmunitaria bacteriana presente en una proteína de fusión con un polipéptido antigénico. La proteína inmunitaria puede usarse como un conector para unir dos dominios de la proteína de fusión, o puede proporcionarse en el amino o carboxilo terminal en la proteína de fusión. En algunas realizaciones de la invención, se fusiona una hemaglutinina (HA) del virus influenza a una o más proteínas inmunoestimuladoras, por ejemplo, IL-1 (3, FECGM, etc.) a través de una proteína inmunitaria bacteriana.

El documento EP 1 579 851 A2 se dirige a agentes bioactivos encapsulados de liberación rápida para la inducción o potenciación de una respuesta inmunitaria y los métodos de uso de los mismos. El documento EP 1 579 851 divulga una composición para la inducción o potenciación de una respuesta inmunitaria, preferentemente una respuesta de CTI, célula T auxiliar, o de anticuerpos neutralizantes en un sujeto, que comprende un agente bioactivo antígeno y/o no antígeno capaz de inducir o potenciar dicha respuesta inmunitaria encapsulada en una composición polimérica, en la que la composición polimérica comprende una combinación de (a) un polímero presente en una cantidad suficiente para proporcionar integridad estructural a la composición polimérica, y (b) un componente rápidamente biodegradable, un componente que se disuelve rápidamente, un componente que se hincha rápidamente, o un componente que provoca una ruptura osmótica de la composición polimérica encapsulada.

El documento WO 2005/037190 A2 se refiere en general a complejos de antígeno útiles en la modulación de una respuesta inmunitaria. Más particularmente, el documento WO 2005/037190 se refiere a complejos de antígeno que comprenden 15 o más, en algunos casos de 15 a 100 o más, antígenos y/o composiciones diferentes que comprenden los complejos de antígeno donde la composición comprende 15 o más, en algunos casos de 15 a 100 o más, antígenos diferentes. El documento WO 2005/037190 también divulga métodos de modulación de las respuestas inmunitarias a través de la administración de los complejos a un individuo y métodos de identificación de los epítomos inmunodominantes con el uso de los complejos de antígeno.

5 El documento WO 2004/014322 se refiere a formulaciones inmunomoduladoras, métodos de fabricación de formulaciones inmunomoduladoras y métodos de uso de las mismas. El documento WO 2004/014322 se refiere en particular a formulaciones inmunomoduladoras que comprenden un agente de condensación catiónico, un compuesto inmunomodulador (CIM), y un agente estabilizante. También se refiere a la administración de las formulaciones inmunomoduladoras para modular al menos una respuesta inmunitaria.

El documento WO 94/20070 se dirige a aumentar las respuestas inmunitarias a inmunógenos administrados en las superficies de la mucosa. La respuesta inmunitaria tras la inmunización por vías oral y de otras mucosas se induce o aumenta incluyendo un adyuvante con el mucoadhesivo inmunógeno y polimérico. Se divulga la eficacia de los adyuvantes en la administración oral de un inmunógeno en combinación con un mucoadhesivo.

10 La presente invención es una formulación nueva de una FDDR usando un almidón como agente formador de matriz que potencia la respuesta inmunitaria, junto con agentes formadores de matriz adicionales opcionales tales como manitol y gelatina, para estimular la inmunidad a la infección provocada por bacterias, virus, u otros microorganismos y lograr una respuesta inmunitaria mejor que las formulaciones de las FDDR conocidas en la técnica. El efecto potenciador inmunitario del almidón descrito en la presente invención no se ha divulgado o sugerido previamente en la técnica. También, puede lograrse adicionalmente el efecto potenciador inmunitario mediante ciertos agentes o componentes formadores de matriz adicionales, que, también, no se han divulgado o sugerido previamente en la técnica. Este es un avance significativo en el estado de la técnica.

#### Sumario de la invención

20 La presente invención se dirige a una forma de dosificación de una vacuna sólida oral de disolución rápida que comprende: (a) una cantidad inmunogénica de una preparación antigénica; y (b) al menos un agente formador de matriz que potencia la respuesta inmunitaria, en la que el al menos un agente formador de matriz que potencia la respuesta inmunitaria es un almidón. La forma de dosificación facilita la absorción por la cavidad oral de un antígeno dentro de dicha preparación antigénica. En una realización preferida de la invención, la preparación antigénica comprende un virus influenza inactivado.

25 En ciertas realizaciones preferidas, el almidón se presenta en la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida en una cantidad de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 90 % en peso y/o se selecciona del grupo que consiste en almidón nativo, almidón modificado y combinaciones de los mismos. En una realización preferida de la invención, la forma de dosificación se desintegra en 60 segundos, más preferentemente en 30 segundos, aún más preferentemente en 10 segundos, y más preferentemente en cinco segundos, tras colocarse en la cavidad oral.

35 Las formas de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de la presente invención se preparan preferentemente mediante liofilización. Las formas de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida pueden comprender agentes formadores de matriz adicionales tales como manitol y/o gelatina. En realizaciones adicionales, las formas de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida pueden comprender adicionalmente al menos un agente formador de matriz adicional seleccionado del grupo que consiste en gomas, preferentemente, goma xantana, o un tensioactivo, preferentemente, Tween® 80 o poloxámero. Las formas de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida pueden comprender un adyuvante y/o un mucoadhesivo.

40 En realizaciones preferidas de la invención, una respuesta inmunitaria, por ejemplo, una respuesta de anticuerpos específicos de influenza, se induce cuando la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida se administra a un paciente mediante la colocación en la cavidad oral. Preferentemente, la colocación en la cavidad oral es una colocación sobre o bajo la lengua o en la región bucal o faríngea.

45 La presente invención también se dirige a un método de inducción de una respuesta inmunitaria, por ejemplo, una respuesta de anticuerpos específicos de influenza, en un paciente, comprendiendo dicho método la etapa de: colocar la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida que comprende: (a) una cantidad inmunogénica de una preparación antigénica; y (b) al menos un agente formador de matriz que potencia una respuesta inmunitaria, en la que el al menos un agente formador de matriz que potencia la respuesta inmunitaria es un almidón, en la cavidad oral de una persona que necesita la respuesta inmunitaria. La forma de dosificación usada en el método facilita la absorción en la cavidad oral de un antígeno en de dicha preparación antigénica. Preferentemente, la colocación en la cavidad oral es una colocación sobre o bajo la lengua o en la región bucal o faríngea.

#### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la media de los títulos a punto final (TPF) del grupo +/- EEM (n = 8 por grupo) en 14, 28 y 59 días para una forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de la presente invención comparado con formulaciones de los ejemplos comparativos y comparado con ratones no tratados.

La Figura 2 muestra los resultados del análisis de la intensidad de fluorescencia media (IFM) del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II de un estudio *in vitro* usando macrófagos esplénicos murinos en cultivo.

La Figura 3 muestra los resultados del análisis de la IFM de CD25 de un estudio *in vitro* usando macrófagos esplénicos murinos en cultivo.

5 La Figura 4 muestra los resultados del análisis de la IFM de CD86 de un estudio *in vitro* usando macrófagos esplénicos murinos en cultivo.

La Figura 5 muestra los resultados de un análisis del perfil de citoquinas de un estudio *in vitro* usando macrófagos esplénicos murinos en cultivo.

10 La Figura 6 muestra un cambio en el peso corporal que sigue a la inmunización e infección de ratones en el ensayo *in vivo*.

La Figura 7 muestra las puntuaciones de la enfermedad clínica que siguen a la inmunización e infección de ratones en el ensayo *in vivo*.

La Figura 8 muestra la tasa de supervivencia tras 7 días de los ratones infectados e inmunizados en el ensayo *in vivo*.

15 Las Figuras 9 a 11 muestran las respuestas de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2a a las formulaciones del Ejemplo 2.

La Figura 12 muestra las respuestas de los anticuerpos de la mucosa a través del análisis de lavados nasales.

#### Descripción detallada de la invención

20 La presente invención resuelve los problemas en la técnica desarrollando una FDDR que administra una vacuna oral para provocar una respuesta inmunogénica mejorada para la protección frente a infecciones provocadas por bacterias, virus u otros microorganismos. Los inventores han descubierto que una FDDR de la presente invención, que emplea un almidón como un agente formador de matriz que potencia la respuesta inmunitaria, opcionalmente, junto con al menos un agente formador de matriz adicional, para la administración de vacunas estimula mejor la inmunidad a las infecciones en el cuerpo humano. La invención proporciona los sorprendentes resultados alcanzados en la respuesta inmunitaria cuando se usa una formulación que contiene un almidón para fabricar una FDDR, en la que el almidón potencia una respuesta inmunitaria proporcionando tanto una respuesta de anticuerpos 25 humorales sistémicos como la mediada por células. Por lo tanto, puede ser eficaz frente a una gama de antígenos.

30 Un aspecto novedoso y sorprendente de la presente invención es que las formulaciones basadas en almidón evitan los obstáculos a la administración oral de los antígenos de la vacuna como se ha descrito anteriormente. La capacidad para superar los procesos naturales que actúan como una barrera para la generación de una respuesta inmunitaria eficaz que sigue a la administración de la vacuna oral dan como resultado los atributos únicos de las formulaciones divulgadas en el presente documento. Las formulaciones de disolución rápida basadas en almidón que son de una naturaleza de micropartículas facilitan la absorción del antígeno en la cavidad oral (preferentemente a través de la administración sublingual o bucal), evitando de este modo los mecanismos de degradación del TGI. Este mecanismo de absorción provoca tanto una respuesta de anticuerpos humorales como de la mucosa sin la 35 necesidad de potentes adyuvantes.

40 El perfil de la respuesta inmunitaria alcanzada muestra que la invención es aplicable a cualquier vacuna de subunidades, vacunas conjugadas de proteínas y de toxoides, volviéndola eficaz frente a todos los agentes infecciosos, es decir, preparaciones de antígenos a partir de una derivación de virus, bacteriana (fragmentos o extractos completos o parciales de células bacterianas o partículas víricas), o parasitaria, tal como un protozoo o una lombriz, que provocan la enfermedad, o combinaciones de los mismos.

La primera realización se dirige a una forma de dosificación de una vacuna sólida oral de disolución rápida que comprende: (a) una cantidad inmunogénica de una preparación antigénica; y (b) al menos un agente formador de matriz que potencia la respuesta inmunitaria, en la que el al menos un agente formador de matriz que potencia la respuesta inmunitaria es un almidón.

45 En el presente documento, las frases "disolución rápida", "dispersión rápida" y "desintegración rápidamente" pueden usarse de manera intercambiable. Para los fines de la presente invención, "disolución rápida" se refiere a la capacidad de la forma de dosificación sólida inventiva para desintegrarse preferentemente en 60 segundos (un minuto) de la colocación en la cavidad oral y/o contacto con la saliva. En realizaciones más preferidas, la forma de dosificación se desintegra en 30 segundos, en realizaciones adicionalmente preferidas, en 10 segundos, y en las 50 realizaciones más preferidas, en 5 segundos. Como se usa en el presente documento, "oral" y "forma de dosificación

oral” se refieren a una formulación farmacéutica que se administra mediante la colocación en la cavidad oral de un ser humano o animal. La “cavidad oral”, como se usa el presente documento, se refiere a todos los espacios dentro de la boca y garganta de un ser humano o animal, incluyendo sobre o bajo la lengua (sublingual) o en la región bucal o faríngea.

5 Una “preparación antigénica” como se usa en el presente documento es una formulación que incorpora antígenos solubles o en partículas, que pueden ser péptidos, proteínas, polisacáridos, fragmentos o extractos completos o  
 10 parciales de células bacterianas o partículas víricas, o pueden derivarse de un parásito, tal como un protozoo o una lombriz, que provocan una enfermedad, o combinaciones de los mismos. Cualquier antígeno conocido en la técnica es adecuado para su uso en la presente invención, incluyendo los disponibles en el mercado, o fabricados mediante la purificación de preparaciones de un patógeno, expresados de manera recombinante en vectores inocuos, o  
 15 producidos sintéticamente mediante fabricación convencional. Los métodos para la generación de antígenos y preparaciones de antígenos adecuados para la incorporación en una FDDR se conocen en la técnica, y puede usarse cualquiera de los métodos conocidos en la presente invención.

La preparación antigénica se incluye en la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de la presente invención en una cantidad, que es suficiente para volverla inmunogénica cuando se proporciona en la forma de la FDDR. La “cantidad inmunogénica” se define como la cantidad apropiada para ocasionar una respuesta inmunitaria deseada. Para influenza, la cantidad inmunogénica de la preparación antigénica es preferentemente de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1 mg. Un experto en la materia puede determinar fácilmente la cantidad inmunogénica para una enfermedad o infección dada en base a, entre otros factores, edad y peso del paciente al  
 20 que se administrará la FDDR.

La forma de dosificación de la vacuna oral sólida de disolución rápida de la presente invención puede usarse para administrar vacunas que previenen o reducen los síntomas (es decir, estimular la inmunidad induciendo la creación de anticuerpos y linfocitos T) de una amplia variedad de enfermedades. Para esta finalidad, la preparación antigénica de la presente invención puede contener antígenos útiles en proporcionar protección frente a la siguiente lista representativa de enfermedades que no es exhaustiva: influenza, tuberculosis, meningitis, hepatitis, tosferina, polio, tétanos, difteria, malaria, cólera, herpes, tifoidea, VIH, SIDA, sarampión, enfermedad de Lyme, diarrea del viajero, hepatitis A, B y C, otitis media, fiebre del dengue, rabia, parainfluenza, rubéola, fiebre amarilla, disentería, enfermedad de los legionarios, toxoplasmosis, fiebre Q, fiebre hemorrágica, fiebre hemorrágica de Argentina, caries, enfermedad de Chagas, infección del tracto urinario causada por *E. coli*, enfermedad por pneumococo, paperas, chikungunya, y combinaciones de las mismas. Además, la preparación antigénica de la presente invención puede contener antígenos útiles en proporcionar protección frente a una enfermedad causada por la siguiente lista, no exhaustiva, de organismos causantes: especies de *Vibrio*, especies de *Salmonella*, especies de *Bordetella*, especies de *Haemophilus*, *Toxoplasmosis gondii*, citomegalovirus, especies de *Chlamydia*, especies Estreptocócicas, virus Norwalk, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, Rotavirus, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, Adenovirus, virus Epstein Barr, virus de la encefalitis japonesa, *Pneumocystis carini*, Herpes simples, especies de Clostridia, virus respiratorio sincitial, especies de *Klebsiella*, especies de *Shigella*, *Pseudomonas aeruginosa*, Parvovirus, especies de *Campylobacter*, especies de *Rickettsia*, *Varicella zoster*, especies de *Yersinia*, virus del río Ross, virus JC, *Rhodococcus equi*, *Moraxella catarrhalis*, *Borrelia burgdorferi*, *Pasteurella haemolytica*, y combinaciones de los mismos.

También se contemplan las aplicaciones veterinarias de la presente invención. Por lo tanto, la preparación antigénica de la presente invención puede contener antígenos útiles en proporcionar protección frente a la siguiente lista representativa de enfermedades veterinarias: coccidiosis, enfermedad de Newcastle, neumonía enzoótica, leucemia felina, rinitis atrófica, erisipela, fiebre aftosa, neumonía porcina y otras afecciones de enfermedades y otras infecciones que afectan a los animales de compañía y de granja, y combinaciones de las mismas.

La forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de la primera realización de la invención comprende al menos un agente formador de matriz que potencia la respuesta inmunitaria, en la que el al menos un agente formador de matriz que potencia la respuesta inmunitaria es un almidón. Como se usa en el presente documento, el almidón se refiere no solo a almidones nativos sino también a una amplia variedad de productos relacionados con almidón y, más generalmente, a cualquier material que proporcione la misma funcionalidad que el almidón en la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de la presente invención. Preferentemente, el almidón se selecciona de almidón nativo, almidón modificado y combinaciones de los mismos. Preferentemente, el almidón modificado se selecciona de un grupo que consiste en almidón pre-gelatinizado, almidón sustituido, almidón reticulado, almidón degradado y combinaciones de los mismos. Los almidones nativos ejemplares incluyen, sin limitación, patata, trigo, maíz (choclo), mandioca (tapioca), cebada, arruruz, arroz, sagú, sorgo, avena, mijo y combinaciones de los mismos. Los almidones modificados ejemplares incluyen adicionalmente, sin limitación, almidones preparados de almidones nativos pero tratados físicamente, enzimáticamente, químicamente o de otra manera tales como hidroxialquil almidones (por ejemplo, hidroxipropil almidón), carboxialquil almidones (por ejemplo, carboximetil almidón), almidones catiónicos de amonio cuaternario (por ejemplo, betainato de almidón), ésteres de almidón (por ejemplo, fosfato de dialmidón acilado, octenilsuccinato sódico de almidón, adipato de dialmidón acetilado, nitrato de almidón, sulfato de almidón, fosfato de monoalmidón, fosfato de dialmidón,

carbonato de almidón, etc.). Los almidones degradados ejemplares, preparados mediante almidón tratado físicamente, térmicamente, químicamente, enzimáticamente o de otra manera, incluyen sin limitación, dextrina, maltodextrina, pululano, glucosa, ciclodextrina y combinaciones de los mismos.

5 La cantidad de almidón en una solución o suspensión congelada posteriormente para formar la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida varía preferentemente de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 12 %, más preferentemente de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 10 %, y más preferentemente de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 8 % en peso. La solución o suspensión del antígeno puede distribuirse en cualquier cantidad para congelarse y liofilizarse para proporcionar la cantidad final en el producto seco. Por ejemplo, si 30 mg de una solución al 2 % se distribuye y se seca entonces el comprimido secado  
10 contendrá 0,6 mg de almidón mientras que si 1 g de la misma solución se distribuye y se seca entonces el comprimido secado contendrá 20 mg de almidón. Esto proporciona la flexibilidad necesaria para la dosificación a diferentes poblaciones de pacientes. Preferentemente, la cantidad de almidón presente en la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida varía de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 90 %, más preferentemente de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 80 %, y más preferentemente de  
15 aproximadamente el 7 % a aproximadamente el 75 % en peso.

Sin quedar limitado a teoría alguna, se cree que debido a que el almidón está compuesto de múltiples partículas de estructura granular, esto potencia el muestreo, o absorción, de los antígenos en la superficie granular y cuando el almidón se absorbe en la corriente sanguínea, los antígenos se absorben con él. Por lo tanto, se cree que el almidón tiene una funcionalidad más allá de la de actuar como un agente formador de matriz en la presente invención, por  
20 ejemplo, actúa como un agente formador de matriz que potencia la respuesta inmunitaria. Además de mejorar la administración de antígenos al cuerpo humano, se cree que el almidón ayuda en y mejora la absorción de proteínas y péptidos en el cuerpo humano en general.

Como se usa en el presente documento, "que potencia la respuesta inmunitaria" significa que el agente formador de matriz es responsable, al menos en parte, del tipo o grado de la respuesta inmunitaria alcanzada por la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de la presente invención.  
25

En una realización preferida, la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida comprende adicionalmente al menos un agente formador de matriz adicional. Pueden incorporarse uno o más agentes formadores de matriz adicionales en la solución o suspensión antes de la congelación para formar la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida durante la fabricación. Cualquier agente formador de matriz convencional es adecuado para su uso en la presente invención como un agente formador de matriz adicional. Los agentes formadores de matriz adicionales adecuados incluyen, pero sin limitación, materiales derivados de proteínas animales o vegetales, tales como las gelatinas, dextrinas y soja, proteínas de semillas de trigo y psilio; gomas; polisacáridos; alginatos; carboximetilcelulosas; carragenanos; dextranos; pectinas; polímeros sintéticos tales como polivinilpirrolidona; complejos de polipéptidos/proteínas o polisacáridos tales como complejos gelatina-acacia; azúcares tales como manitol, dextrosa, lactosa, galactosa y trehalosa; azúcares cíclicos tales como ciclodextrina; sales inorgánicas tales como fosfato de sodio, cloruro de sodio y silicatos de aluminio; y aminoácidos que tienen de 2 a 12 átomos de carbono tales como una glicina, L-alanina, ácido L-aspártico, ácido L-glutámico, L-hidroxiprolina, L-isoleucina, L-leucina y L-fenilalanina, o combinaciones de los mismos. La cantidad del al menos un agente formador de matriz adicional presente en la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida puede variar preferentemente de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 98 %, más preferentemente de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 95 %, y lo más preferentemente de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 93 % en peso. La cantidad del al menos un agente formador de matriz adicional presente en una solución o suspensión congelada posteriormente para formar la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida varía preferentemente de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 45 %, más preferentemente de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 33 %, y lo más preferentemente de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 21 % en peso.  
30  
35  
40  
45

Además de formar la matriz, el agente formador de matriz puede ayudar en el mantenimiento de la dispersión de cualquier preparación antigénica con la solución o suspensión. Esto es especialmente útil en el caso de preparaciones antigénicas que no son suficientemente solubles en agua y deben, por lo tanto, suspenderse más que disolverse.  
50

En una realización preferida, el al menos un agente formador de matriz adicional es manitol. En otra realización preferida más, el al menos un agente formador de matriz adicional es gelatina. En aún otra realización preferida, el al menos un agente formador de matriz adicional comprende manitol y gelatina, en combinación con almidón como el al menos un agente formador de matriz que potencia la respuesta inmunitaria.

55 Cuando está presente, la cantidad de manitol en la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida varía preferentemente de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 90 %, más preferentemente de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 80 %, y lo más preferentemente de aproximadamente el 7 % a aproximadamente el 65 % en peso. Cuando está presente, la cantidad de manitol en una solución o suspensión

congelada posteriormente para formar la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida varía preferentemente de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 15 %, más preferentemente de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 10 %, y lo más preferentemente de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 5 % en peso. Cuando está presente, la cantidad de gelatina en la forma de dosificación de la  
 5 vacuna sólida oral de disolución rápida varía preferentemente de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 85 %, más preferentemente de aproximadamente el 2,5 % a aproximadamente el 65 %, y lo más preferentemente de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 55 % en peso. Cuando está presente, la cantidad de gelatina en una solución o suspensión congelada posteriormente para formar la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de  
 10 disolución rápida varía preferentemente de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 10 %, más preferentemente de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 7 %, y lo más preferentemente de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 4 % en peso.

En una realización preferida de la invención, en la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida, la gelatina está presente en una cantidad de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 55 %; el manitol está presente en una cantidad de aproximadamente el 7 % a aproximadamente el 65 %; y un almidón está presente  
 15 en una cantidad de aproximadamente el 7 % a aproximadamente el 75 % en peso. En una realización preferida de la invención, en una solución o suspensión congelada posteriormente para formar la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida, la gelatina está presente en una cantidad de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 4 %; el manitol está presente en una cantidad de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 5 %; y un almidón está presente en una cantidad de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 8% en peso.

En otra realización preferida, el al menos un agente formador de matriz adicional es una goma tal como, pero sin limitación, acacia, guar, agar, xantana, gellan, carragenano, curdlan, konjac, algarroba, welan, goma de tragacanto, goma arábiga, goma karaya, goma ghatti, pectinas, dextrano, glucomanano y alginatos, o combinaciones de las  
 20 mismas. Cuando está presente, la goma en la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida varía preferentemente en una cantidad de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 80 % en peso. Cuando está presente, la goma en una solución o suspensión congelada posteriormente para formar la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida varía preferentemente en una cantidad que varía de  
 25 aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 10 % en peso. Cuando la goma xantana se añade a la solución o suspensión, la respuesta de potenciación inmunitaria con respecto a la IL-6 y el TNF-alfa pueden incrementarse respecto a las soluciones o suspensiones que no contienen la goma xantana.

En una realización preferida, el al menos un agente formador de matriz adicional comprende manitol, gelatina y goma xantana. En una realización adicional preferida de la invención, en una forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida, la gelatina está presente en una cantidad de aproximadamente el 3 % a  
 30 aproximadamente el 55 %; el manitol está presente en una cantidad de aproximadamente el 7 % a aproximadamente el 65 %; un almidón está presente en una cantidad de aproximadamente el 7 % a aproximadamente el 75 %; y la goma xantana está presente en una cantidad de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 80 % en peso. En una realización preferida de la invención, en una solución o suspensión congelada posteriormente para formar una forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida, la  
 35 gelatina está presente en una cantidad de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 4 %; el manitol está presente en una cantidad de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 5 %; un almidón está presente en una cantidad de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 8 % en peso; y la goma xantana está presente en una cantidad de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 10 % en peso.

En otra realización de la presente invención, la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida comprende adicionalmente un tensioactivo. Cualquier tensioactivo conocido en la técnica es adecuado para su uso  
 45 en la presente invención, incluyendo tensioactivos no iónicos, aniónicos y catiónicos. Los ejemplos de tensioactivos no iónicos que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero sin limitación, éteres alquílicos de polietileno, éteres de alquílicos de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de polioxietileno sorbitano, (por ejemplo, Tweens®), estearatos de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de sorbitano (por ejemplo, Spans®), y copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno (por ejemplo, poloxámeros). Los ejemplos de tensioactivos aniónicos que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero sin limitación, lauril sulfato de sodio, docusato de sodio y monooleato  
 50 de glicerol. Los ejemplos de tensioactivos catiónicos que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero sin limitación, cloruro de benzalconio, cetrimidio y cloruro de cetilpiridinio. Preferentemente, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en Tween® 80, poloxámero y combinaciones de los mismos. Cuando está presente, el tensioactivo en la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida varía preferentemente en una cantidad de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 80 % en peso. Cuando está presente, el tensioactivo  
 55 en una solución o suspensión congelada posteriormente para formar la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida varía preferentemente en una cantidad de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 10 % en peso. Cuando se añade un tensioactivo a la solución o suspensión, la respuesta de potenciación inmunitaria puede incrementarse respecto a las soluciones o suspensiones que no contienen un tensioactivo.

En una realización preferida de la presente invención, el al menos un agente formador de matriz adicional comprende manitol y gelatina y la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida comprende

adicionalmente un tensioactivo. En una realización adicionalmente preferida de la invención, en la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida, la gelatina está presente en una cantidad de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 55 %; el manitol está presente en una cantidad de aproximadamente el 7 % a aproximadamente el 65 %; un almidón está presente en una cantidad de aproximadamente el 7 % a aproximadamente el 75 %; y un tensioactivo está presente en una cantidad de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 80 %. En una realización preferida de la invención, en una solución o suspensión congelada posteriormente para formar la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida, la gelatina está presente en una cantidad de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 4 %; el manitol está presente en una cantidad de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 5 %; un almidón está presente en una cantidad de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 8 % en peso; y un tensioactivo está presente en una cantidad de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 10 % en peso.

La forma de dosificación de la invención adicionalmente comprende de manera opcional un adyuvante, que es útil en la estimulación de una respuesta inmunitaria para vacunas muertas o inactivas, dando como resultado una producción aumentada de anticuerpos y una memoria inmunológica aumentada. Para ser más eficaz, la respuesta inmunitaria se asocia con la generación de una respuesta de memoria que proporciona una protección de larga duración de la enfermedad específica. Una vez expuesto, el sistema inmunitario "recuerda" el antígeno y la respuesta inmunitaria iniciada para inactivar el antígeno. La eficacia de un adyuvante para aumentar una respuesta inmunitaria puede ser independiente del antígeno con el que se combina. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero sin limitación: fragmentos bacterianos no tóxicos, toxina del cólera (y formas y fracciones detoxificadas de la misma), quitosano, toxina termolábil de *E. coli* (y formas y fracciones detoxificadas de la misma), homo. +/- y copolímeros de lactida/glicolida (PLA/GA), polianhídrido, por ejemplo, trimetilimidido-L-tirosina, DEAE-dextrano, saponinas complejadas a antígenos de proteínas de membrana (complejos inmunoestimulantes - ISCOMS), productos bacterianos tales como el lipopolisacárido (LPS) y el muramil dipéptido (MDP), liposomas, cocleatos, proteinoides, citoquinas, (interleuquinas, interferones), vectores microbianos vivos de ingeniería genética, toxina mutante pertussis no infecciosa, neuramidasa/galactosa oxidasa y toxinas bacterianas y víricas atenuadas derivadas de cepas mutantes, y combinaciones de los mismos. Una cantidad adecuada de un adyuvante puede determinarse fácilmente por un experto en la materia.

La forma de dosificación de la presente invención promueve la administración de una vacuna a un lugar diana, y, en ciertas realizaciones, puede diseñarse un sistema mucoadhesivo para mantener la vacuna en contacto con el tejido linfático de la mucosa diana en la cavidad oral y para aumentar el tiempo de residencia del elemento de la vacuna en estas superficies potenciales para su absorción. Como producto para la ingestión oral, desde que la vacuna se libera rápidamente una vez se toma el producto, las altas concentraciones de la vacuna pueden por lo tanto administrarse rápidamente a los lugares diana deseados.

Algunas de las formas de dosificación sólidas de disolución rápida son inherentemente mucoadhesivas. Sin embargo, puede añadirse opcionalmente un mucoadhesivo a la forma de dosificación de disolución rápida de la presente invención, que puede aumentar la residencia del antígeno en contacto con el tejido de la mucosa en la cavidad oral. Los mucoadhesivos adecuados que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero sin limitación, los descritos en la Solicitud de Patente Europea n.º 92109080.9 e incluyen: polímeros poliacrílicos tales como carbómero y derivados de carbómero (por ejemplo, Polycarbophil™, Carbopol™, y similares); derivados de celulosa tales como hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxietilcelulosa (HEC), hidroxipropilcelulosa (HPC) y carboximetilcelulosa de sodio (CMCNa); y polímeros naturales tales como gelatina, alginato de sodio y pectina. Las fuentes comerciales adecuadas para los polímeros mucoadhesivos (bioadhesivos) representativos incluyen, pero sin limitación, copolímero acrílico Carbopol™ (disponible de BF Goodrich Chemical Co., Cleveland, Ohio); hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) (disponible de Dow Chemical, Midland, Mich.); HEC (Natrosol) (disponible de Hercules Inc., Wilmington, Del.); HPC (Klucel™) (disponible de Dow Chemical Co., Midland, Mich.); CMCNa (disponible de Hercules, Inc., Wilmington, Del.); gelatina (disponible de Deamo Chemical Corp., Elmford, N.Y.); alginato de sodio (disponible de Edward Mandell Co., Inc., Carmel, N.Y.); pectina (disponible de BDH Chemicals Ltd., Poole, Dorset, Reino Unido); Polycarbophil™ (disponible de BF Goodrich Chemical Co., Cleveland, Ohio). Una cantidad adecuada de un mucoadhesivo puede determinarse fácilmente por un experto en la materia.

La forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de la presente invención también puede contener otros componentes opcionales tales como conservantes, antioxidantes, aumentadores de la viscosidad, agentes colorantes, agentes saborizantes, modificadores del pH, edulcorantes, agentes de enmascaramiento del sabor y combinaciones de los mismos. Los agentes colorantes adecuados incluyen, sin limitación, óxidos de hierro rojo, negro y amarillo y colorantes FD&C tales como FD&C azul n.º 2 y FD&C rojo n.º 40 disponible de Ellis & Everard. Los agentes saborizantes adecuados incluyen, sin limitación, sabores de menta, frambuesa, regaliz, naranja, limón, pomelo, caramelo, vainilla, cereza y uva y combinaciones de éstos. Los modificadores de pH adecuados incluyen, sin limitación, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido maleico, hidróxido de sodio, carbonato de sodio y tampón tris. Los edulcorantes adecuados incluyen, sin limitación, aspartamo, sacarosa, sucralosa, acesulfamo K y taumatina. Los agentes de enmascaramiento del sabor adecuados incluyen, sin limitación, bicarbonato de sodio y compuesto de inclusión de ciclodextrinas. Un experto en la materia puede determinar fácilmente las cantidades adecuadas de estos ingredientes opcionales para su inclusión en la

forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de la presente invención.

5 En una cierta realización de la invención, la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida puede incluir opcionalmente microesferas que pueden ser biodegradables. El material de la microesfera por sí mismo puede funcionar como un adyuvante o puede usarse junto con otros adyuvantes. La preparación antigénica puede absorberse o incorporarse sobre o dentro de microesferas, formando de este modo un complejo microesfera-antígeno. Por lo tanto, la preparación antigénica está disponible para la absorción en el tejido linfóide de manera eficaz tan pronto como el tejido se ponga en contacto con el complejo de la preparación microesfera-antígeno.

10 Los materiales de la microesfera adecuados que pueden usarse con la invención incluyen materiales poliméricos biodegradables. Son particularmente adecuados los materiales hidrófobos tales como polímeros de poli(ácido láctico) y poli (lactida-co-glicida) y copolímeros de látex. Estos materiales poliméricos también confieren resistencia a la digestión enzimática e hidrolítica hasta su absorción en el tejido linfóide, donde el antígeno liberado puede ejercer su efecto inmunogénico. Los materiales poliméricos preferidos son los materiales hidrófobos que aumentan la absorción en los tejidos diana. En realizaciones preferidas, la microesfera es de alginato de sodio o de poli(lactida-co-glicida) (PLGA).

15 Cuando la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de la primera realización se administra a la cavidad oral de un paciente (ser humano o animal) que necesita protección frente a una enfermedad, se induce una respuesta inmunitaria. Una respuesta inmunitaria incluye la producción de anticuerpos específicos para el patógeno del que se ha derivado el antígeno en la forma de dosificación, la generación de un anticuerpo de células T adecuado y, en algunos casos, la producción de linfocitos T citotóxicos (LTC). La respuesta inmunitaria también puede incluir la generación de una respuesta de memoria que proporciona una protección de larga duración de la enfermedad específica.

20 En la presente invención, la colocación de la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida es preferentemente sobre o bajo la lengua (sublingual) o en la región bucal o faríngea.

25 Las formas de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de la presente invención pueden tomarse sin agua y dispersarse en volúmenes muy pequeños de saliva. Esto aumenta el recubrimiento de los tejidos de la mucosa que contienen el tejido linfóide asociado a la región de la amígdala y aumenta el tiempo de residencia de los antígenos en estos tejidos. Se sabe que las formas de dosificación sólidas orales de disolución rápida se dispersan y recubren rápidamente las superficies de la mucosa en la boca y faringe, donde se localizan los tejidos linfoides asociados a la mucosa. A este respecto, la referencia se dirige a un artículo de Wilson et al., International Journal of  
30 Pharmaceutics, 40 (1997), páginas 119-123. Por lo tanto, las formas de dosificación sólidas orales de disolución rápida mejoran la focalización de las vacunas a los tejidos linfoides susceptibles en la boca, particularmente bajo la lengua, y la faringe. Por consiguiente, la concentración de la vacuna que hace contacto con estos tejidos, por ejemplo, el tejido linfóide susceptible en las áreas bucofaríngea y sublingual, aumenta cuando se administra a través de una FDDR.

35 Puede usarse cualquier método conocido de fabricación de formas de dosificación de disolución rápida de acuerdo con esta invención. Preferentemente las formas de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de la presente invención se liofilizan. Una forma de dosificación de disolución rápida preferida para su uso con la invención es la descrita en la Patente de Reino Unido n.º 1.548.022, que se dirige a una forma de dosificación oral sólida de disolución rápida que comprende un sistema del ingrediente activo y un vehículo soluble en agua o dispersable en agua que es inerte para el ingrediente activo, habiéndose obtenido el sistema mediante la sublimación del disolvente de una composición que comprende el ingrediente activo y una solución del vehículo en un disolvente. La Patente de Reino Unido n.º 1.548.022 no logra divulgar el uso de un almidón en una FDDR liofilizada, pero el método en esta puede adaptarse fácilmente para fabricar las formas de dosificación de la vacuna  
40 sólida oral de disolución rápida de la presente invención.

45 La forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida normalmente es un comprimido blanco, redondo formulado para desintegrarse rápidamente en la boca. Sin embargo, el color puede variar dependiendo de los materiales usados en él o la adición de colorantes. El tamaño del comprimido es en general de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 25 mm y se forma de acuerdo al tamaño y la forma de la cavidad del blíster en la que se colocará durante la fabricación y/o almacenamiento. El comprimido comprende un sistema altamente poroso que ayuda a la desintegración normalmente en 60 segundos, más preferentemente en 30 segundos, aún más preferentemente en 10 segundos, y lo más preferentemente en 5 segundos, tras colocarse en la cavidad bucal. El comprimido físicamente es fuerte para resistir la manipulación y retirada del envase de blíster sin romperse.

50 En una realización, la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida comprende: (a) una cantidad inmunogénica de un virus influenza inactivado; y (b) al menos un agente formador de matriz que potencia la respuesta inmunitaria, en la que el al menos un agente formador de matriz que potencia la respuesta inmunitaria es un almidón.

Cualquier cepa del virus influenza es adecuada para su uso en la presente invención. En la fabricación de vacunas para influenza, las organizaciones internacionales, tales como la Organización Mundial de la Salud, monitorizan las cepas que causan enfermedad y anualmente proporcionan información específica de las cepas más importantes para las que se requiere vacunación. Debido a la mutación continua de los antígenos clave en la superficie del virus influenza, las cepas nuevas se monitorizan continuamente y se fabrican nuevas vacunas. Las muestras de las cepas de influenza identificadas se ponen a disposición de los fabricantes de vacunas que las usan para la preparación de vacunas. Los virus en general se preparan para su uso en una vacuna, es decir, una preparación antigénica, de acuerdo con los procedimientos convencionales conocidos. El virus influenza inactivado puede incluirse en la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de la invención en una cantidad inmunogénica. Normalmente, la cantidad de virus que se añade se define de estudios de inmunogenicidad en animales donde los niveles de anticuerpos funcionales como se define en los ensayos, tales como el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IHA), alcanzan un nivel deseado, según lo acordado por los reguladores de la vacuna.

Los detalles mencionados anteriormente en relación a la cantidad inmunogénica, almidón, agentes formadores de matriz, tensioactivos, microesferas, adyuvante, mucoadhesivo, etc., son los mismos para la segunda realización de la invención que para la primera realización de la invención.

Cuando la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de la segunda realización se administra a la cavidad oral de un paciente (ser humano o animal) que necesita protección para influenza, se induce una respuesta del anticuerpo específico de influenza. Esta respuesta de anticuerpos neutraliza la capacidad del virus para infectar células de mamífero, como se mide por la IHA o ensayo de neutralización vírica (ENV), que evalúa la capacidad funcional de la respuesta de los anticuerpos. Otros aspectos deseados de la respuesta inmunitaria anti-influenza incluyen la generación de las respuestas de las células T y B de memoria y la presencia de LTC, que es capaz de matar células infectadas por el virus. La mayoría de las vacunas actualmente se evalúan únicamente en su capacidad para estimular una respuesta de anticuerpos. Sin embargo, la capacidad para producir vacunas capaces de conferir inmunidad protectora a cepas cruzadas de influenza puede lograrse mediante la mejora de la capacidad de nuevas vacunas para generar LTC. La colocación de la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida es preferentemente sobre o bajo la lengua (sublingual) o en la región bucal o faríngea.

Una realización de la presente invención se dirige a un método de inducción de una respuesta inmunitaria en un paciente, comprendiendo dicho método la etapa de: colocar la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de la primera realización de la invención en la cavidad oral de una persona que necesita la respuesta inmunitaria. Preferentemente, la colocación en la cavidad oral es la colocación sobre o bajo la lengua (sublingual) o en la región bucal o faríngea.

La forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida se administra para inducir una respuesta inmunitaria mayor que un control negativo y mayor que la administración de una FDDR sin la inclusión de un almidón como agente formador de matriz que potencia la respuesta inmunitaria. El "control negativo" como se define en el presente documento es un animal usado en los experimentos que no se trata con el virus inactivado y no se infecta por el virus.

Una realización de la presente invención se dirige a un método de inducción de una respuesta de IgG específicas de influenza en un paciente, comprendiendo dicho método la etapa de: colocar la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de la segunda realización de la invención en la cavidad oral de una persona que necesita la respuesta inmunitaria. Preferentemente la colocación en la cavidad oral es una colocación sobre o bajo la lengua (sublingual) o en la región bucal o faríngea.

La presente invención no se limita a ninguna vacuna específica, sino a resolver los problemas de la administración oral de las vacunas. Los siguientes ejemplos ilustrarán la práctica de la presente invención en algunas de las realizaciones preferidas. Otras realizaciones dentro del alcance de las reivindicaciones serán evidentes para un experto en la materia.

### Ejemplo 1

Se preparó una FDDR del tipo conocido en la técnica como se describe en Seager, H., "Drug-Delivery Products and Zydis Fast Dissolving Dosage Form", J. Pharm. Pharmacol, vol. 50, p. 375-382 (1998), pero con gelatina, manitol y almidón. La nueva formulación de la matriz se preparó combinando gelatina de piel encalada de bovino al 1,5 % (375 mg), hidroxipropil almidón al 2,5 % (625 mg), manitol al 3,0 % (750 mg) y 25 ml de agua y calentando la mezcla a 75 °C durante 15 minutos. La solución se cubrió durante el calentamiento para minimizar la evaporación. La solución se enfrió posteriormente a temperatura ambiente, por ejemplo, 20-25 °C, en un baño de agua refrigerada. Se añadió una solución madre de 5,5 µl de influenza (A/Panama/2007/99 H3N2) a 24,5 µl de la nueva formulación de la matriz de manera que cada comprimido contenía 1 µg de influenza. Tras la adición de la influenza madre, las concentraciones finales de los agentes formadores de matriz en la formulación eran como sigue: almidón al 2 % (p/v), manitol al 2,4 % (p/v) y gelatina al 1,2 % (p/v). Después la formulación se dosificó en las bolsas del blíster

usando una bomba dosificadora Hamilton semi-automática dispensando 30 mg por dosis. Después las formulaciones dosificadas se congelaron rápidamente colocándose en una cámara de nitrógeno líquido durante 5 minutos. Las formulaciones congeladas posteriormente se liofilizaron usando un liofilizador Edwards, Modulyo 4K unido a una bomba Edwards RV5. Primero, el liofilizador se activó durante un periodo de 15 minutos para pre-enfriar el sistema a -45 °C. Después las formulaciones congeladas se transfirieron inmediatamente sobre la rejilla dentro de una cámara del liofilizador. La cubierta se colocó sobre la cámara, y la bomba de vacío se encendió para asegurar que la válvula de drenaje estaba cerrada. El liofilizador se dejó funcionar durante la noche para liofilizar las muestras completamente. Una vez secas, la bomba de vacío y el condensador se apagaron y la tapa de drenaje se abrió lentamente para dejar pasar aire al sistema. Después los paquetes de blíster rellenos completamente congelados se retiraron y colocaron en bolsitas de papel de aluminio y se sellaron en un frasco de vidrio que contenía un desecante y se almacenaron a 4° C hasta su uso.

Los comprimidos liofilizados se inspeccionaron visualmente; no se encontraron grandes defectos. Los comprimidos estaban todos intactos y parecían normales aparte de estar ligeramente elevados. Los comprimidos se desintegraron instantáneamente, en diez segundos, al colocarse en agua purificada a 37 °C.

Los comprimidos resultantes se administraron vía sublingual a ratones, y se ensayaron posteriormente las muestras de sangre en los días 14, 28 y 59. Se llevaron a cabo subclases de ELISA para evaluar los niveles de IgG1 e IgG2a específicas de gripe en las muestras de suero recogidas de los animales tratados. Las muestras se diluyeron para proporcionar una concentración máxima de 1 en 40. Después, se llevó a cabo una doble dilución seriada de las muestras en fosfato salino tamponado con albúmina de suero bovina (ABS) (1 %) a lo largo de una placa de 96 pocillos. Los anticuerpos de detección conjugados con peroxidasa de rábano (HRP), el conjugado de IgG1 e IgG2a (Fc) anti-ratón de cabra:HRP (ambos de AbD Serotec) se diluyeron 1 en 1000 en PBS/ABS. El suero de los animales que no se trataron y no se infectaron se incluyó como control negativo. Los resultados se muestran en la Figura 1 a continuación como "Zydis + gripe s.l. (matriz nueva)".

#### Ejemplo comparativo 1

Se preparó una FDDR de acuerdo con la preparación conocida en general de un comprimido Zydis®. El comprimido Zydis® se preparó combinando 200 mg de gelatina con 3,3 ml de agua y calentando la mezcla a 60 °C durante 30 minutos. La solución se cubrió durante el calentamiento para minimizar la evaporación. La solución se enfrió posteriormente a aproximadamente 25 °C en un baño de agua refrigerada. A continuación de esto, se añadieron 150 mg de manitol mientras se agitaba. Se añadió una solución madre de antígeno de influenza A/Panama/2007/99 H3N2 para llevar el volumen a 5 ml de manera que cada comprimido contenía 1 µg de influenza. La concentración final de los agentes formadores de matriz tras la adición de influenza era gelatina al 4 % (p/v) y manitol al 3 % (p/v). La formulación se procesó en las mismas condiciones que en el Ejemplo 1, es decir, disolviendo, enfriando, congelando, liofilizando. Los comprimidos liofilizados se inspeccionaron de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los comprimidos liofilizados se inspeccionaron para sus defectos de superficie: no se encontraron grandes defectos y los comprimidos estaban intactos. Se llevó a cabo un ensayo de dispersión (colocando un comprimido en 100 µl de agua purificada a 37 °C) en los comprimidos Zydis® y se disolvieron en menos de 10 segundos.

Se fabricaron dos lotes de acuerdo con este proceso. Los comprimidos resultantes del primer lote se administraron vía sublingual a los ratones, mientras que 10 comprimidos del segundo lote se disolvieron en 2 ml de agua calentada a 37 °C y se administraron 200 µl por animal vía intragástrica (i.g.). Las muestras de sangre se ensayaron posteriormente de los ratones en cada grupo en los días 14, 28 y 59. Se llevaron a cabo subclases de ELISA para evaluar los niveles de IgG1 e IgG2a específicas de gripe en las muestras de suero recogidas de los animales tratados. Las muestras se diluyeron para proporcionar una concentración máxima de 1 en 40. Después, se llevó a cabo una doble dilución seriada de las muestras en PBS/ABS (1 %) a lo largo de una placa de 96 pocillos. Los anticuerpos de detección conjugados con HRP, el conjugado de IgG1 e IgG2a (Fc) anti-ratón de cabra:HRP (ambos de AbD Serotec) se diluyeron 1 en 1000 en PBS/ABS. El suero de los animales que no se trataron y no se infectaron se incluyó como control negativo. Los resultados se muestran en la Figura 1 a continuación como "Zydis + gripe s.l." y como "Zydis + gripe i.g.", respectivamente.

#### Ejemplo comparativo 2

Se preparó una FDDR de acuerdo con el Ejemplo Comparativo 1, excepto que antes de dosificarla en las bolsas del blíster, se añadió virus influenza A/Panama/2007/99 H3N2 microencapsulado con alginato de sodio a la formulación de manera que cada comprimido contenía 1 µg de influenza. Para alcanzar esa cantidad final, se añadieron 3 gotas de influenza microencapsulada por comprimido. La solución se procesó posteriormente en las mismas condiciones que en el Ejemplo 1, es decir, disolviendo, enfriando, congelando, liofilizando. Los comprimidos liofilizados se inspeccionaron de la misma manera que en el Ejemplo 1.

Los comprimidos liofilizados se inspeccionaron para los defectos de superficie: no se encontraron grandes defectos. Se llevó a cabo un ensayo de dispersión (colocando un comprimido en 100 µl de agua purificada a 37 °C) en los

comprimidos y se disolvieron en menos de 10 segundos.

Los comprimidos resultantes se administraron vía sublingual a los ratones, y las muestras de sangre se ensayaron posteriormente en los días 14, y 28. Se llevaron a cabo subclases de ELISA para evaluar los niveles de IgG1 e IgG2a específicas de gripe en las muestras de suero recogidas de los animales tratados. Las muestras se diluyeron para proporcionar una concentración máxima de 1 en 40. Después, se llevó a cabo una doble dilución seriada de las muestras en un PBS/ABS (1 %) a lo largo de una placa de 96 pocillos. Los anticuerpos de detección conjugados con peroxidasa de rábano (HRP), el conjugado de IgG1 e IgG2a (Fc) anti-ratón de cabra:HRP (ambos de AbD Serotec) se diluyeron 1 en 1000 en PBS/ABS. El suero de los animales que no se trataron y no se infectaron se incluyó como control negativo. Los resultados se muestran en la Figura 1 a continuación como "Zydis + gripe s.l. (gotas de alginato)".

### Ejemplo comparativo 3

Se preparó una FDDR de acuerdo con el Ejemplo Comparativo 1, excepto que antes de dosificarla en bolsas del blíster, se añadió virus influenza A/Panama/2007/99 H3N2 microencapsulado con PLGA a la formulación de manera que cada comprimido contenía 1 µg de influenza. Para alcanzar esa cantidad final, se añadieron un total de 10 µl de gotas de PLGA a 20 µl de la mezcla de la FDDR para alcanzar una cantidad de 10 µl de gotas de influenza microencapsulada por comprimido. La solución se procesó posteriormente en las mismas condiciones que en el Ejemplo 2, es decir, disolviendo, enfriando, congelando, liofilizando. Los comprimidos liofilizados se inspeccionaron de la misma manera que en el Ejemplo 1.

Los comprimidos liofilizados se inspeccionaron para los defectos de superficie: no se encontraron grandes defectos en los preparados de las FDDR. Se llevó a cabo un ensayo de dispersión (colocando un comprimido en 100 µl de agua purificada a 37 °C) en los comprimidos y se disolvieron en 10 segundos.

Los comprimidos resultantes se administraron vía sublingual a los ratones, y las muestras de sangre se ensayaron posteriormente en los días 14, 28 y 59. Se llevaron a cabo subclases de ELISA para evaluar los niveles de IgG1 e IgG2a específicas de gripe en las muestras de suero recogidas de los animales tratados. Las muestras se diluyeron para proporcionar una concentración máxima de 1 en 40. Después se llevó a cabo una doble dilución seriada de las muestras en PBS/ABS (1 %) a lo largo de una placa de 96 pocillos. Los anticuerpos de detección conjugados con HRP, el conjugado de IgG1 e IgG2a (Fc) anti-ratón de cabra:HRP (ambos de AbD Serotec) se diluyeron 1 en 1000 en PBS/ABS. El suero de los animales que no se trataron y no se infectaron se incluyó como control negativo. Los resultados se muestran en la Figura 1 a continuación como "Zydis + gripe s.l. (gotas de PLGA)".

### Ejemplo 2

Como se ha demostrado por los ejemplos anteriores, la formulación Zydis® es un medio eficaz de estimulación de las respuestas sistémicas de anticuerpos a los antígenos (Ag) que siguen a la administración sublingual. El perfil de la respuesta inmunitaria obtenida era dependiente de la formulación Zydis® e incluía una alta respuesta de los anticuerpos neutralizantes. Esto es importante en la neutralización de toxinas y antígenos víricos/bacterianos extracelulares presentes en la circulación sistémica. La formulación del Ejemplo 1 también era capaz de impulsar la expansión de células T citotóxicas (LTC) específicas del antígeno, que es una importante respuesta inmunitaria mediada por células para neutralizar la infección intracelular. Se llevó a cabo un trabajo adicional para mejorar además la respuesta mediada por células lograda por las formulaciones.

Tras estos primeros estudios, se llevaron a cabo estudios *in vitro* adicionales usando macrófagos esplénicos de murino en cultivo y citometría de flujo para determinar sus niveles de activación y expresión de moléculas que son críticas en la mediación de la activación de células T. Para los estudios *in vitro*, el lipopolisacárido (LPS), un potente estimulador conocido de muchos de estos factores, se usó como control positivo. Las formulaciones se prepararon para su uso en el estudio *in vitro* usando macrófagos esplénicos de murino como se muestra en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Formulación	Dosis de antígeno	Composición base de la matriz en la suspensión (% p/p)	Composición base de la matriz en el comprimido (mg/comprimido)	Composición base de la matriz en el comprimido (% p/p)	Fundamento
1	1 µg	Almidón 2,0 % Gelatina 1,2 % Manitol 2,4 %	Almidón 0,6 mg Gelatina 0,36 mg Manitol 0,72 mg	Almidón 35,7 Gelatina 21,4 Manitol 42,9	Control

ES 2 602 506 T3

Formulación	Dosis de antígeno	Composición base de la matriz en la suspensión (% p/p)	Composición base de la matriz en el comprimido (mg/comprimido)	Composición base de la matriz en el comprimido (% p/p)	Fundamento
2	15 µg	Almidón 2,0 % Gelatina 1,2 % Manitol 2,4 %	Almidón 0,6 mg Gelatina 0,36 mg Manitol 0,72 mg	Almidón 35,7 Gelatina 21,4 Manitol 42,9	Aumento de la dosis de antígeno
3	1 µg	Almidón 6,5 % Gelatina 1,2 % Manitol 2,4 %	Almidón 1,95 mg Gelatina 0,36 mg Manitol 0,72 mg	Almidón 64,4 Gelatina 11,9 Manitol 23,8	Aumento de la dosis de almidón
4	15 µg	Almidón 6,5 % Gelatina 1,2 % Manitol 2,4 %	Almidón 1,95 mg Gelatina 0,36 mg Manitol 0,72 mg	Almidón 64,4 Gelatina 11,9 Manitol 23,8	Aumento de la dosis de antígeno y almidón
5*	15 µg	Almidón 6,5 % Gelatina 1,2 % Manitol 2,4 %	Almidón 1,95 mg Gelatina 0,36 mg Manitol 0,72 mg	Almidón 64,4 Gelatina 11,9 Manitol 23,8	Impacto del procesamiento
6	15 µg	Almidón 6,5 % Gelatina 1,2 % Manitol 2,4 % Tween 80 0,2%	Almidón 1,95 mg Gelatina 0,36 mg Manitol 0,72 mg Tween 80 0,06 mg	Almidón 63,1 Gelatina 11,7 Manitol 23,3 Tween 80 1,9	Adición de tensioactivo; para la comparación con la Formulación 4
7	15 µg	Almidón 6,5 % Gelatina 1,2 % Manitol 2,4 % Poloxámero 188 0,2 %	Almidón 1,95 mg Gelatina 0,36 mg Manitol 0,72 mg P188 0,06 mg	Almidón 63,1 Gelatina 11,7 Manitol 23,3 P188 1,9	Adición de tensioactivo; para la comparación con la Formulación 4
8	15 µg	Almidón 6,5 % Gelatina 1,2 % Manitol 2,4 % Goma xantana 0,05%	Almidón 1,95 mg Gelatina 0,36 mg Manitol 0,72 mg Xantano 0,015mg	Almidón 64,0 Gelatina 11,8 Manitol 23,6 Xantano 0,5	Adición del carbohidrato complejo; para la comparación con la Formulación 4
9	15 µg	Almidón 6,5 % Gelatina 1,2 % Manitol 2,4 % Lecitina 0,2 %	Almidón 1,95 mg Gelatina 0,36 mg Manitol 0,72 mg Lecitina 0,06 mg	Almidón 63,1 Gelatina 11,7 Manitol 23,3 Lecitina 1,9	Adición del fosfolípido; para la comparación con la Formulación 4
10*	15 µg	Almidón de maíz 6,5 % Gelatina 1,2 % Manitol 2,4 %	Almidón de maíz 1,95 mg Gelatina 0,36 mg Manitol 0,72 mg	Almidón de maíz 64,4 Gelatina 11,9 Manitol 23,8	Contenido alto de amilosa
11*	15 µg	Almidón de maíz ceroso 6,5 % Gelatina 1,2 % Manitol 2,4 %	Almidón de MC 1,95 mg Gelatina 0,36 mg Manitol 0,72 mg	Almidón de MC 64,4 Gelatina 11,9 Manitol 23,8	Contenido alto de amilopectina
12*	15 µg	Almidón de arroz 6,5 % Gelatina 1,2 % Manitol 2,4 %	Almidón de arroz 1,95 mg Gelatina 0,36 mg Manitol 0,72 mg	Almidón de arroz 64,4 Gelatina 11,9 Manitol 23,8	Tamaño de granulo pequeño

\*Procesado a 50 °C. Todas las otras formulaciones procesadas a 70 °C.

Las formulaciones se prepararon como sigue. Se preparó una solución madre del antígeno de la gripe a una concentración de 3,94 mg/ml. De manera separada, se preparó un concentrado de la matriz para cada formulación

enumerada anteriormente. Después se combinó una cantidad apropiada de la solución madre del antígeno de la gripe y el concentrado de la matriz de la formulación para proporcionar un volumen final de 500 µl de una solución de la formulación final. A partir de esta solución de la formulación mezclada final, se distribuyeron alícuotas de 30 mg, congeladas y liofilizadas para producir comprimidos que contenían o bien 1 µg o 15 µg del antígeno de la gripe. La Tabla 2 resume esta preparación.

5

Tabla 2

Cantidad de concentrado de solución de la matriz (µl)	Cantidad de la solución madre de antígeno (µl)	Volumen total de la solución de la formulación final (µl)	Cantidad distribuida por comprimido (mg)	Cantidad de antígeno por comprimido (µg)
495,78	4,22	500	30	1
436	64	500	30	15

El concentrado de la matriz se preparó disolviendo la cantidad apropiada de cada componente en una cantidad de agua. Una cantidad apropiada del concentrado de la matriz, cuando se combinó con la cantidad requerida de la solución madre del antígeno, dio como resultado el nivel del componente de la matriz en la solución de la formulación mezclada final de acuerdo con los valores fijados anteriormente. Por ejemplo, para la Formulación 1, la Tabla 3 demuestra la relación entre el concentrado de la matriz y el porcentaje en peso en la formulación final.

10

Tabla 3

Componente	Peso distribuido para el concentrado de la matriz (g)	Cantidad de la solución de la matriz tomada (µl)	Cantidad de la solución del antígeno añadida (µl)	Volumen total de la solución de la formulación final (µl)	% p/p en la solución de la formulación final
Almidón	0,5	495,78	4,22	500	2
Gelatina	0,3				1,2
Manitol	0,6				2,4
Agua	23,29				

15 Las células del bazo se aislaron de ratones BALB/c adultos normales, se lavaron y después los macrófagos CD11b+ se purificaron mediante separación por MACS usando una columna LS contenida dentro del campo de un separador Midi/MACS 14™. Los macrófagos se lavaron y se cultivaron en un medio de cultivo de tejido. Estos se fijaron en el cultivo a  $1,8 \times 10^5$  células CD11b+ por pocillo de ensayo. Se añadió LPS a una concentración final de 100 ng/ml para actuar como control positivo. Se disolvió un comprimido Zydís® para cada una de las 12 formulaciones en los medios de cultivo de tejido y se separaron entre tres replicas. También, se preparó un control no estimulado que no contenía ni LPS ni ninguna de las formulaciones enumeradas. Tras 48 horas, los cultivos se recolectaron y los sobrenadantes se retiraron para el análisis de citoquinas. Las células se lavaron y se evaluó la activación de los macrófagos usando citometría de flujo seguida de la tinción con anticuerpos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II, CD25 y CD86.

20

25 **Ensayo**

A. Ensayo *in vitro*

La naturaleza de la respuesta de las células T y de anticuerpos a los cambios antigénicos se dicta por el estado de activación y las citoquinas que se producen por los monocitos/macrófagos/células dendríticas tras el contacto con el antígeno. Los adyuvantes y los vehículos de administración manipulan estas respuestas para impulsar las respuestas de las células T y B de tipos particulares. Por ejemplo, la estimulación de la IL-12 por estas células es un determinante mayor asociado con la promoción de las respuestas inmunitarias de los Th1 caracterizadas por los anticuerpos de fijación de complemento, la activación de fagocitos y la producción de LTC. La IL-4 es un impulso

30

mayor de las respuestas de los Th2 mientras que la IL-6 junto con el TGFbeta es un impulso mayor de las respuestas de las IgA de la mucosa.

5 Se midieron diversos marcadores como indicación del nivel y tipo de activación de los macrófagos. Además, se evaluó una valoración de las citoquinas clave que se producen como indicador de los tipos de reacción inmunitaria que pueden promoverse.

### 1. CMH de clase II

La regulación positiva del CMH de clase II es una etapa esencial en el aumento de la presentación del antígeno para impulsar la respuesta de las células T al antígeno. La regulación positiva es un proceso que activa o aumenta la tasa o la extensión de esa respuesta particular.

10 Una vez el macrófago ingiere el antígeno (Ag) mediante fagocitosis, endocitosis o macropinocitosis, el Ag se descompone en fracciones de péptidos más pequeñas. Después estas fracciones se unen al CMH, que migra a la superficie de la célula y “presenta” el antígeno a las células T. Esta presentación del antígeno es una etapa necesaria para impulsar la respuesta inmunitaria. Por lo tanto, la capacidad para aumentar los niveles del CMH de clase II en los macrófagos es predictivo de una capacidad aumentada de presentación del antígeno.

15 Los datos en la Figura 2 muestran que todas las formulaciones (excepto la F9) aumentan la expresión del CMH de clase II produciendo niveles significativamente más altos de intensidad de fluorescencia media que los controles no estimulados y los niveles favorables en comparación con los controles positivos (LPS).

### 2. CD25

20 El CD25 es una parte del receptor para la IL-2. La regulación positiva de esta molécula es una respuesta aguda a los estímulos de activación que es indicativa de un estado de activación elevado y una disposición para funcionar como células presentadoras de antígeno.

25 Una vez presentados a las células T nativas, ciertos factores co-estimuladores y citoquinas influyen la diferenciación y expansión de las células T. Como se muestra en la Figura 3, todas las formulaciones exhiben una respuesta mayor que el control no estimulado y una respuesta comparable a los controles positivos (LPS). La Formulación 6 (que contiene Tween® 80) y la Formulación 7 (que contiene Poloxamer® 188) muestran una respuesta aumentada respecto a los controles positivos.

### 3. CD86

30 El CD86 es un factor coestimulador que influye tanto a las células T auxiliares como a las células T citotóxicas (necesarias para la inmunidad mediada por células). El CD86 proporciona una segunda señal crítica requerida para activar tanto las respuestas de las células T auxiliares como citotóxicas. Normalmente se expresa a niveles muy bajos en las células presentadoras de antígeno en reposo y su regulación positiva es un evento crítico en la habilitación de dichas células a interactuar productivamente con las células T para generar una respuesta inmunitaria.

35 Como se muestra en la Figura 4, todas las formulaciones, excepto las procesadas a 50 °C (Formulaciones 5, 10, 11, 12) y la formulación que contenía lecitina (Formulación 9), eran capaces de estimular la expresión aumentada del CD86, proporcionando una buena respuesta comparada con los controles positivos.

### 4. Perfil de citoquinas

El perfil de citoquinas evalúa la respuesta de las citoquinas, que es crítica en la estimulación y afectación de la naturaleza de la respuesta de las células T.

40 Los datos demuestran la capacidad de potenciación inmunitaria de las formulaciones basadas en almidón y también la capacidad para impulsar las respuestas de las células T, es decir, la estimulación y expansión (población aumentada de) de las células T.

45 La presencia del TNFalfa y la IL12p40 (como una medida de la IL-12) son importantes en el impulso de las respuestas de las células Th1 y T citotóxicas, mientras que la IL-4 favorece la diferenciación de las células T en células Th2, cuyo primer rol es la estimulación de la producción de anticuerpos. La IL-6 está involucrada tanto en la generación de las respuestas de las Th17, que están involucradas en la promoción de la activación de neutrófilos, un aspecto que es importante en la mediación de la protección en ciertas enfermedades, como también en la promoción de la producción de anticuerpos por las células B. La IL-10 tiene la capacidad de regular negativamente otras

respuestas inmunitarias. La regulación negativa es un proceso que reduce la activación o la velocidad o el alcance de la activación de una respuesta.

5 Como se muestra en la Figura 5, todas las formulaciones exhiben un aumento significativo en la respuesta en IL-6, TNFalfa e IL-12p40 comparado con el control no estimulado. La Formulación 1, que contiene el nivel más bajo de Ag (1 µg) y almidón (2,0 %), exhibió la respuesta más baja en términos de IL-6 y TNFalfa, aunque los niveles de IL-12p40 eran comparables a o mayores que otras formulaciones.

El aumento solo del nivel de Ag mientras se mantiene un bajo nivel de almidón (2 %), como en la Formulación 2, da como resultado un aumento en IL-6 y TNFalfa, pero la respuesta de la IL-12p40 es relativamente baja.

10 El aumento del nivel de almidón con un bajo nivel de antígeno, como en la Formulación 3, aumenta la IL-6 y el TNFalfa y produce una respuesta de IL-12p40 comparable a la Formulación 1. Esto demuestra las propiedades de potenciación inmunitaria del almidón. Las Formulaciones 1 a 9 comprenden hidroxilpropil almidón mientras que la Formulación 10 comprende almidón de maíz, la Formulación 11 comprende almidón de maíz ceroso y la Formulación 12 comprende almidón de arroz. Los datos muestran que las diferentes fuentes de almidón pueden ejercer el mismo efecto de potenciación inmunitaria.

15 El aumento del nivel tanto del antígeno como del almidón, como en la Formulación 4, muestra una respuesta mejorada inesperadamente superior con respecto a la IL-6, TNFalfa e IL-12p40.

La Formulación 8 incluye goma xantana y exhibe respuestas mayores que las otras formulaciones con respecto a la IL-6 y el TNFalfa.

20 Todas las formulaciones exhiben bajos niveles de IL-4. La presencia de la IL-4 muy temprana en las respuestas inmunitarias predispone a las respuestas de Th1 y LTC. Por lo tanto, los niveles bajos de IL-4 son favorables en términos del establecimiento de la respuesta de las LTC. La IL-4 es importante en la proporción de un estímulo para la generación de células Th2, que son, de una en una, importantes para la promoción de las respuestas de anticuerpos. Los niveles bajos de IL-4 son suficientes para este fin y se conocen otros tipos celulares por contribuir en su producción.

25 Todas las formulaciones exhiben niveles más altos de IL-10 en relación con el control no estimulado. La IL-10 puede regular negativamente la respuesta de las LTC y favorecer la respuesta de los Th2. Sin embargo, el control positivo, el LPS, también exhibe altos niveles de IL-10 y además este se conoce por ser un potente activador de las células presentadoras del antígeno.

### B. Ensayo *in vivo*

#### 30 1. Ensayo del Ejemplo 1 y de los Ejemplos comparativos 1-3

Las muestras de sangre extraídas de los ratones en los días 14, 28 y 59 se investigaron para la presencia de IgG específica de la gripe en cada uno de los grupos de animales a los que se les proporcionó una de las cinco formulaciones y en un grupo de animales no tratados (control negativo). Los gráficos en la Figura 1 muestran los niveles de anticuerpos frente al virus influenza después de 1, 2 y 3 inmunizaciones con las diferentes formulaciones. 35 Todos los gráficos muestran la media de los títulos a punto final (TPF) del grupo +/- EEM (n = 8 por grupo).

Como se muestra en la Figura 1, la formulación Zydis<sup>®</sup> que tiene la nueva formulación de la matriz del Ejemplo 1 exhibe valores de TPF más altos en los días 14, 28 y 59 que todos los ejemplos comparativos y que los ratones no tratados. El grupo tratado con los comprimidos de la nueva matriz más 1 µg de gripe eran los únicos animales que exhibieron las respuestas de anticuerpos por encima nivel de base en los días 14 y 28. Además, el título a punto final (TPF) de esta respuesta aumentó desde del día 14 al día 28 al día 59, con inmunizaciones crecientes. 40

#### 2. Ensayo del Ejemplo 2

En base a los resultados del estudio *in vitro* mostrados en el Ejemplo 2 usando cultivos de macrófagos, se seleccionaron ciertas formulaciones para un estudio de estímulo *in vivo* en ratones. Las formulaciones seleccionadas eran: F8 (que contenía goma xantana); F7 (que contenía poloxámero 188); F10 (que contenía almidón de maíz); F4 45 (que contenía HP almidón); y F12 (que contenía almidón de arroz).

Se inmunizaron cinco grupos de ratones BALB/c hembra en los días 0, 10 y 20 con una formulación de ensayo como se muestra en la Tabla 1. En el día 27, a los animales se les extrajo sangre para un análisis de suero y después recibieron un estímulo intranasal (i.n.) de 50 µl con virus influenza a/Puerto Rico/8/34 (PR8) H1N1. Los animales se monitorizaron para los signos de infección durante 7 días y se puntuaron de acuerdo con un sistema de puntuación

validado. La Tabla 4 muestra el programa de administración para las formulaciones.

Tabla 4

Grupo de ratones	Formulación	Frecuencia de administración
1	F8	Una vez en los días 0, 10 y 20
2	F7	Una vez en los días 0, 10 y 20
3	F10	Una vez en los días 0, 10 y 20
4	F4	Una vez en los días 0, 10 y 20
5	F12	Una vez en los días 0, 10 y 20

Resultados

5 El peso corporal de cada grupo de ratones se monitorizó durante los 7 días siguientes a la estimulación. Los resultados se presentan en la Figura 6.

10 Los animales infectados con PR8 H1N1 sin inmunización (control infectado) pierden peso rápidamente desde el día 3 tras la infección, llegando a un punto final acordado con el Ministerio del Interior (MI) para la pérdida de peso del 20 % en el día 6. Todos los animales inmunizados con una de las formulaciones que contenían antígenos de influenza mostraron una pérdida de peso reducida. En particular, los animales que recibieron el antígeno en las Formulaciones 8, 7 y 4, mostraron una pérdida de peso significativamente reducida ( $P < 0,001$ ,  $P < 0,01$  y  $P < 0,05$ , respectivamente, de acuerdo con el ensayo ANOVA de una vía y el de comparación múltiple de Bonferroni).

15 Para comparar la extensión de la enfermedad, los animales se puntuaron como 0, 0,5 o 1 (sin signos clínicos, signos clínicos leves y signos clínicos moderados, respectivamente) para cada uno de los parámetros siguientes, proporcionando una puntuación máxima posible de 5;

- Pilo-erección
- Postura encorvada
- Respiración errática
- Movilidad afectada
- 20 • Ojos llorosos

25 Las puntuaciones se registraron mediante gráficos frente al tiempo de los días tras la infección y se muestran en la Figura 7. Al igual que con los datos de pérdida de peso, todas las formulaciones se comportaron mejor que en el control infectado, no inmunizado. Las puntuaciones de la enfermedad clínica también muestran una reducción significativa en la severidad entre los grupos que recibieron las formulaciones 8, 7 y 4 en comparación con el control solo infectado, hasta el día seis tras la infección ( $P < 0,01$  y  $P < 0,05$  respectivamente).

30 Debido a la pérdida de peso y a la aparición de la enfermedad clínica, varios animales alcanzaron el punto final humanitario del Ministerio del Interior (MI) antes del día 7 y requirieron sacrificio en el día 6. La Figura 8 muestra la tasa de supervivencia en el día 7 después de la inmunización con una de las 5 formulaciones y la infección con el virus H1N1. Puede observarse que el 50 % de los animales tratados con la Formulación 10, el 70 % de los tratados con la Formulación 4, y el 60 % de los animales tratados con la Formulación 12 sobrevivieron al día 7. Solo un animal tratado con la Formulación 8 tuvo que sacrificarse en el día 6 y ninguno de los que recibieron la Formulación 7 tuvo que sacrificarse en el día 6.

35 Las muestras de suero derivadas de la sangre extraída en el día 27 se analizaron mediante ELISA usando el virus influenza muerto como el antígeno de captura y o bien IgG, IgG1 o IgG2a de ratón como el anticuerpo de detección. Los resultados se muestran en las Figuras 9, 10 y 11. Los tratamientos con cada una de las formulaciones seleccionadas exhibían una respuesta de los anticuerpos IgG1 e IgG2a. El tratamiento de los animales con la Formulación 8 estimuló títulos significativamente más altos del anticuerpo anti-H1N1 comparado con otros grupos de tratamiento, las Formulaciones 7, 10, 4 y 12, dieron como resultado títulos altos de IgG ( $P < 0,01$ ), en particular el isotipo IgG2a ( $P < 0,001$ ) cuando se comparó mediante un ensayo ANOVA de una vía y de comparación múltiple de Bonferroni). Los datos apoyan los hallazgos clínicos presentados anteriormente (es decir, el peso corporal, las puntuaciones de la enfermedad clínica y la tasa de supervivencia) que demuestran que las formulaciones seleccionadas pueden provocar una respuesta inmunitaria apropiada y protectora.

45 La Figura 12 muestra la respuesta de la IgA de los lavados nasales tomados al final del estudio de estimulación *in vivo*. En ese momento, se sacrificó a los ratones y se analizaron los lavados nasales para las IgA como indicador de la respuesta de anticuerpos de la mucosa. Los resultados demostraron que todas las formulaciones eran capaces de

estimular una respuesta de la mucosa, proporcionando con las formulaciones 8 y 12 los valores medios de los títulos más altos.

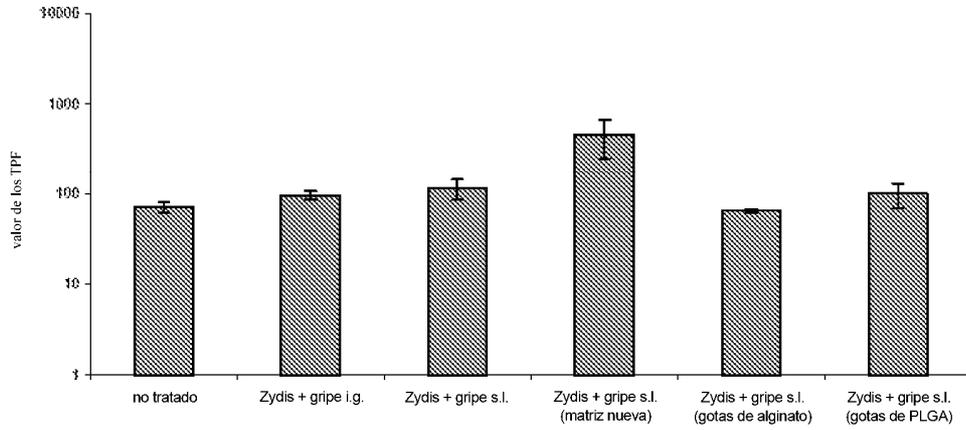
5 Por lo tanto, existen numerosas ventajas de la formulación que comprende un almidón como un agente formador de matriz que potencia la respuesta inmunitaria para la fabricación de las FDDR de las vacunas orales. Las FDDR resultantes tienen la ventaja técnica inesperada de una respuesta inmunitaria aumentada a la infección bacteriana y vírica, que no se conoce o sugiere en la técnica anterior.

**REIVINDICACIONES**

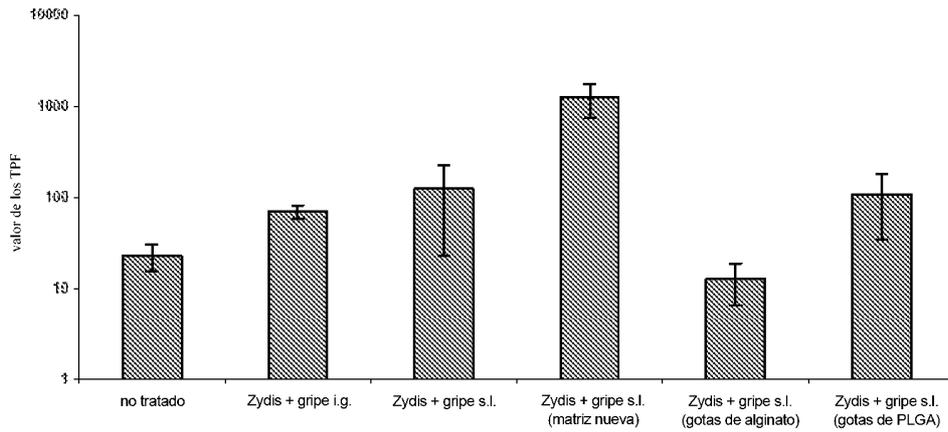
1. Una forma de dosificación de una vacuna sólida oral de disolución rápida que comprende:
- (a) una cantidad inmunogénica de una preparación antigénica; y
  - (b) al menos un agente formador de matriz que potencia la respuesta inmunitaria,
- 5 en la que el al menos un agente formador de matriz que potencia la respuesta inmunitaria es un almidón, y en la que la forma de dosificación facilita la absorción en la cavidad oral de un antígeno en dicha preparación antigénica.
2. La forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el almidón está presente en una cantidad del 2 % al 90 % en peso.
- 10 3. La forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la forma de dosificación se desintegra a los 10 segundos de colocarse en la cavidad oral.
4. La forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de acuerdo con la reivindicación 1, preparada mediante liofilización.
5. La forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente al menos un agente formador de matriz adicional.
- 15 6. La forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el al menos un agente formador de matriz adicional es manitol.
7. La forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el al menos un agente formador de matriz adicional comprende adicionalmente gelatina.
- 20 8. La forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la gelatina está presente en una cantidad del 2,5 % al 65 %; el manitol está presente en una cantidad del 5 % al 80 %; y el almidón está presente en una cantidad del 5 % al 80 % en peso.
9. La forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la gelatina está presente en una cantidad del 3 % al 55 %; el manitol está presente en una cantidad del 7 % al 65 %; y el almidón está presente en una cantidad del 7 % al 75 % en peso.
- 25 10. La forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente al menos un agente formador de matriz adicional seleccionado del grupo que consiste en gomas.
11. La forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un tensioactivo.
- 30 12. La forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de acuerdo con la reivindicación 1, configurada para inducir una respuesta inmunitaria cuando se administra a un paciente mediante la colocación en la cavidad oral.
13. Un método de inducción de una respuesta inmunitaria en un paciente, comprendiendo dicho método la etapa de:
- 35 colocar la forma de dosificación de la vacuna sólida oral de disolución rápida de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en la cavidad oral de una persona que necesita la respuesta inmunitaria.
14. El método de inducción de una respuesta inmunitaria en un paciente de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho método induce una respuesta de anticuerpos específicos de influenza.
- 40 15. El método de inducción de una respuesta de anticuerpos específicos de influenza en un paciente de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la colocación en la cavidad oral es una colocación sobre o bajo la lengua o en la región bucal o faríngea.

FIGURA 1

ELISA de las IgG el día 14



ELISA de las IgG el día 28



ELISA de las IgG el día 59

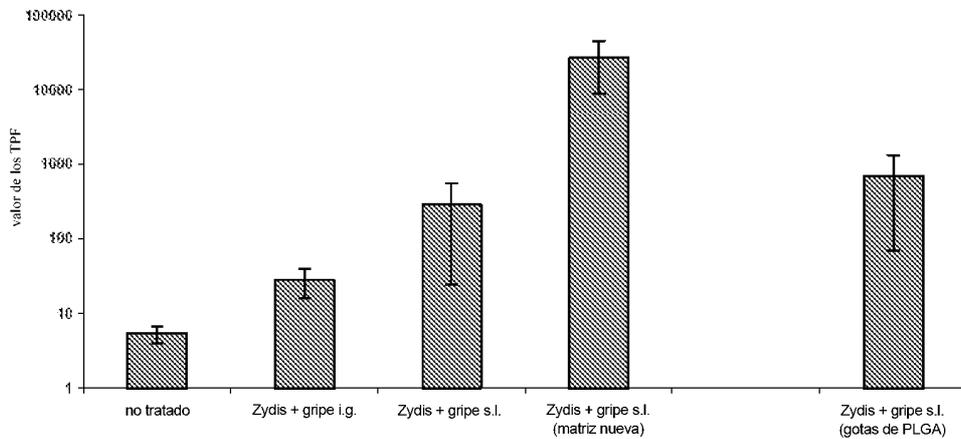


FIGURA 2

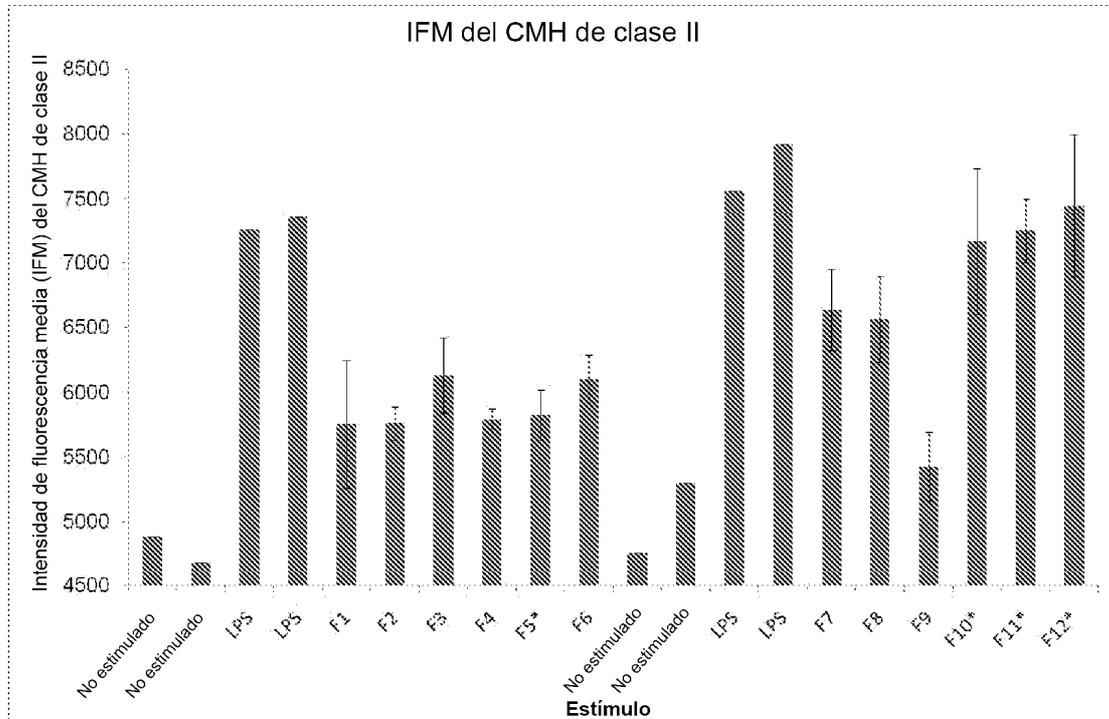


FIGURA 3

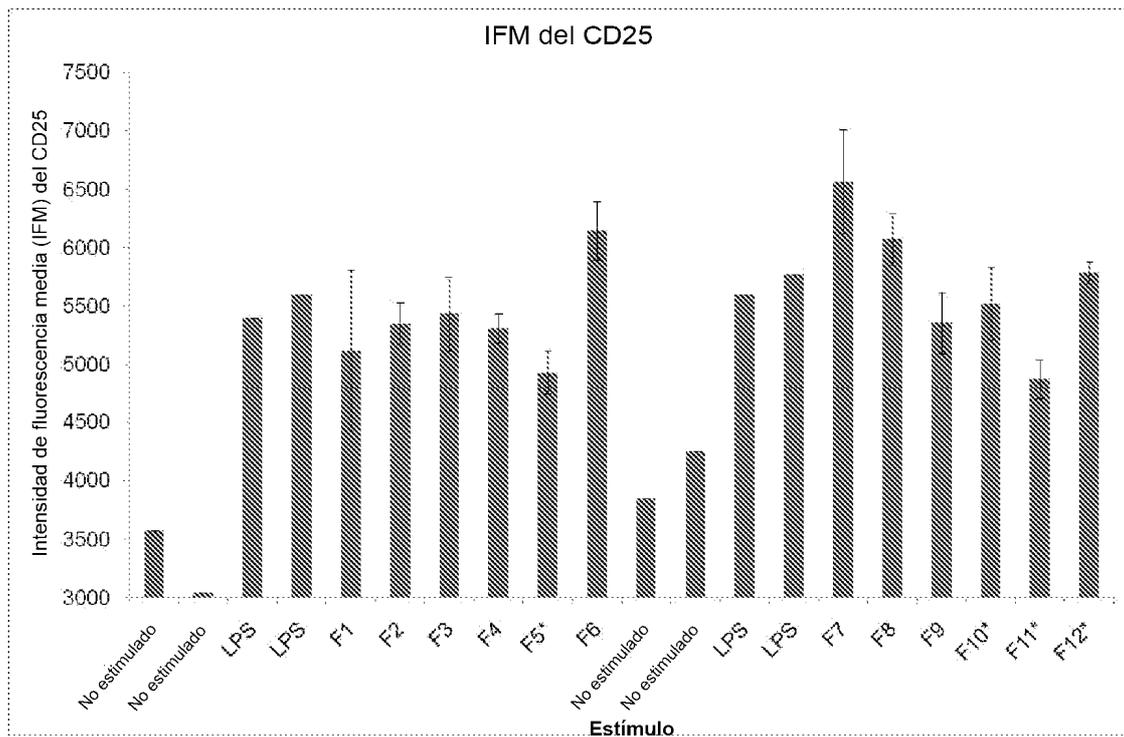


FIGURA 4

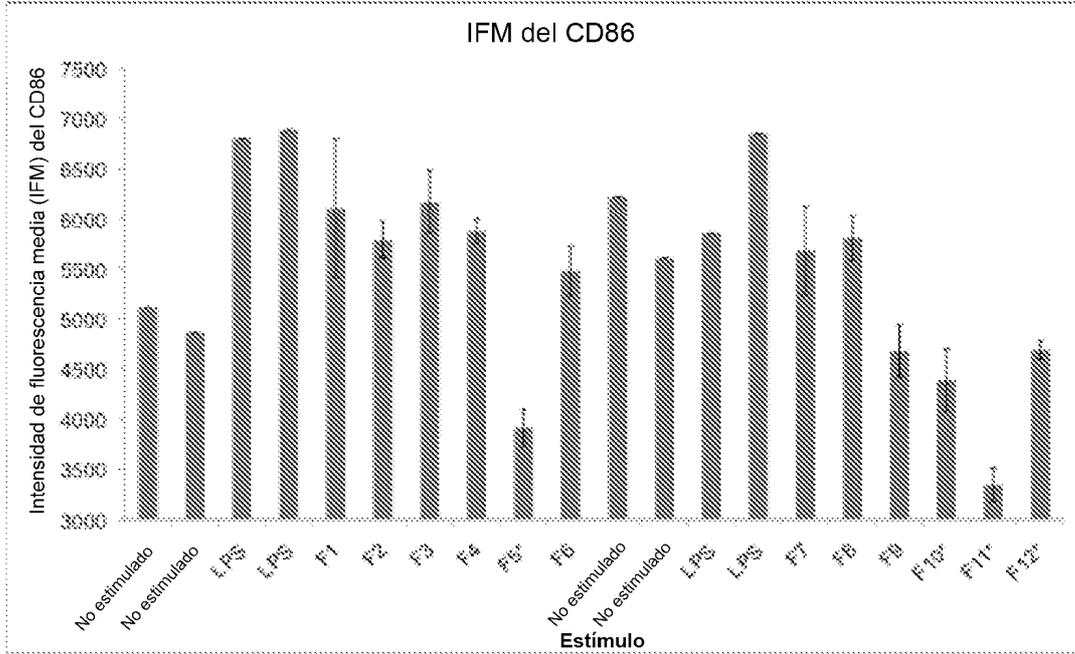


FIGURA 5

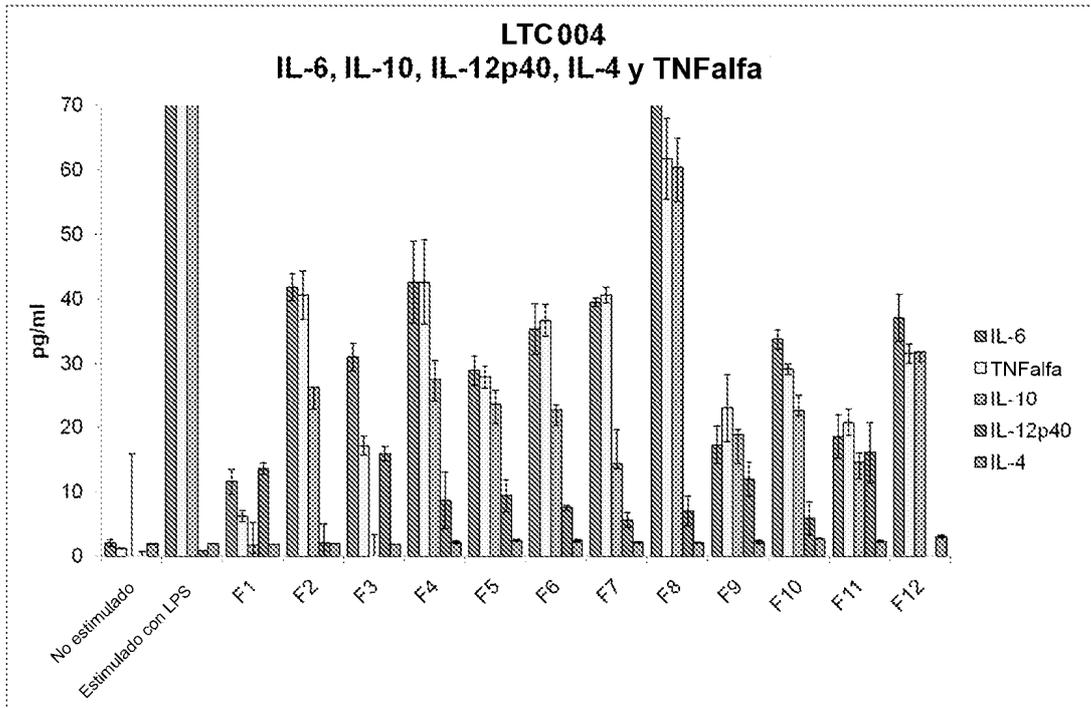


FIGURA 6

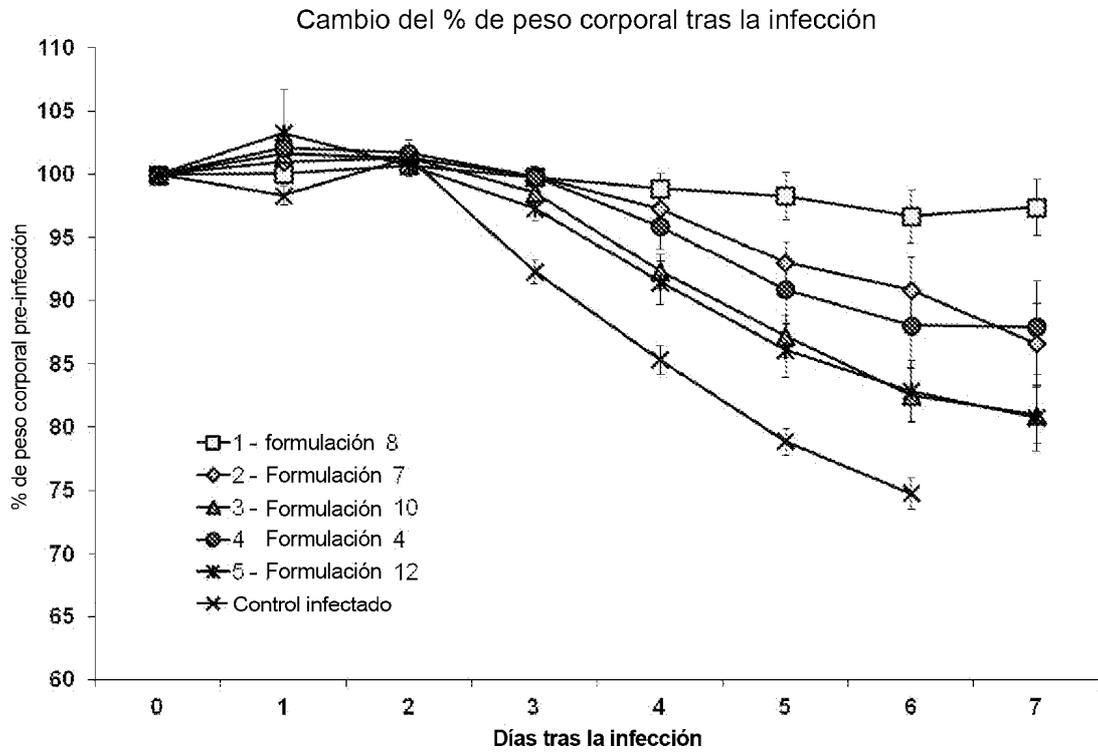


FIGURA 7

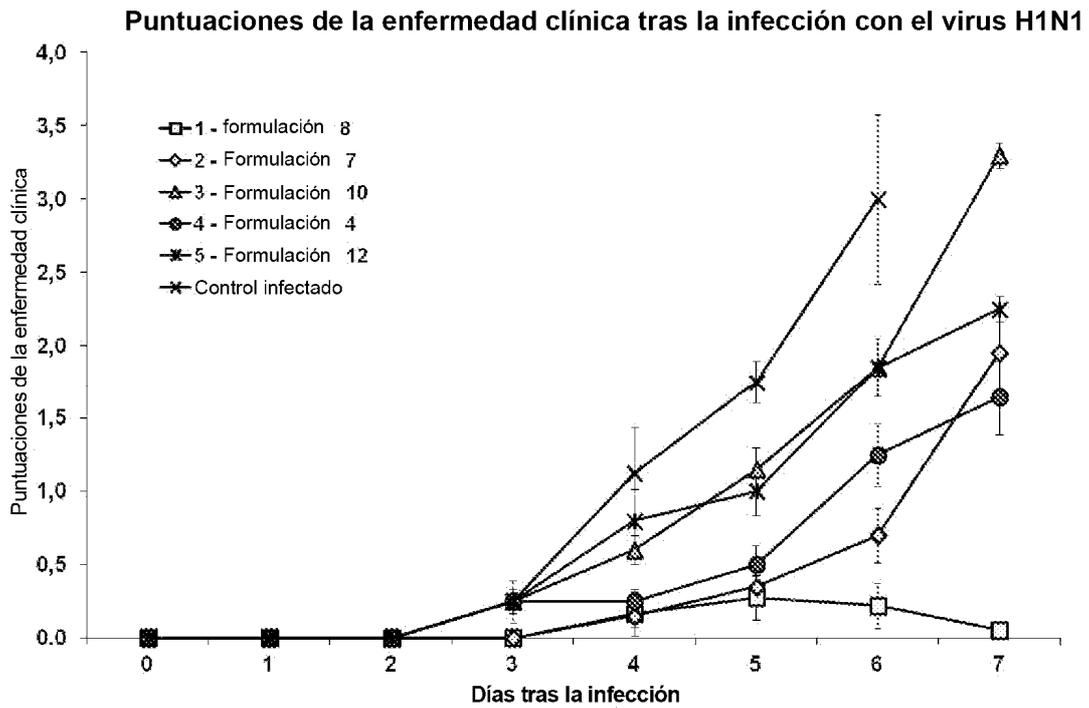


FIGURA 8

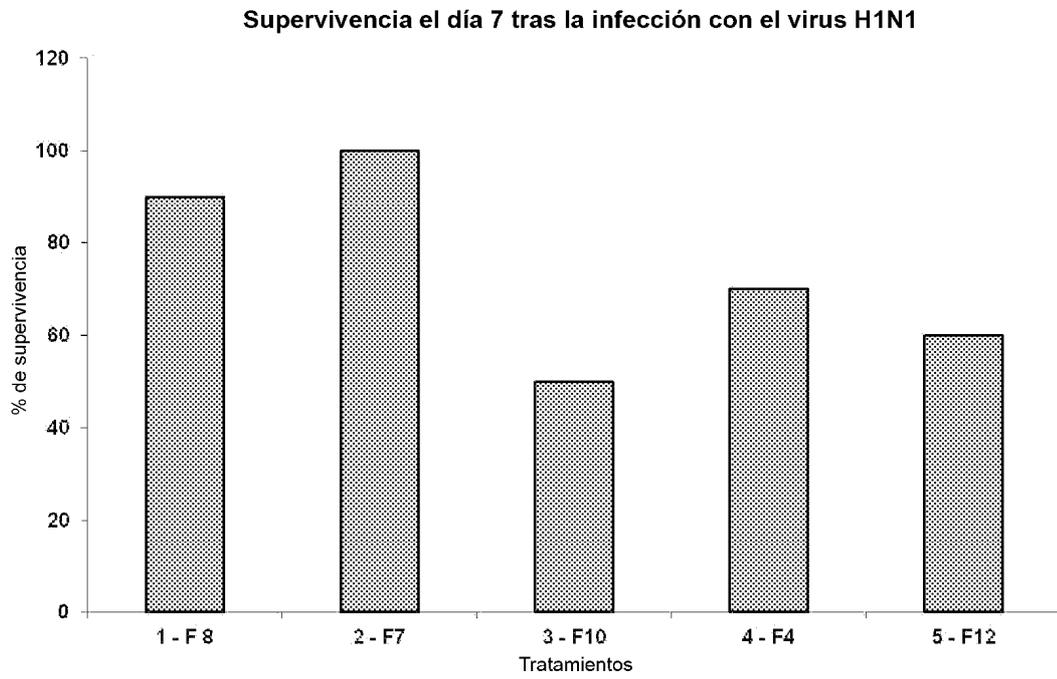


FIGURA 9

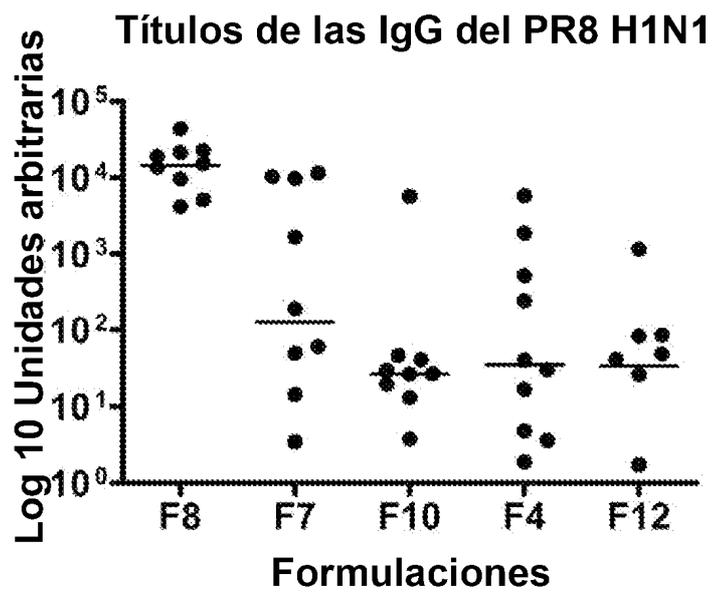


FIGURA 10

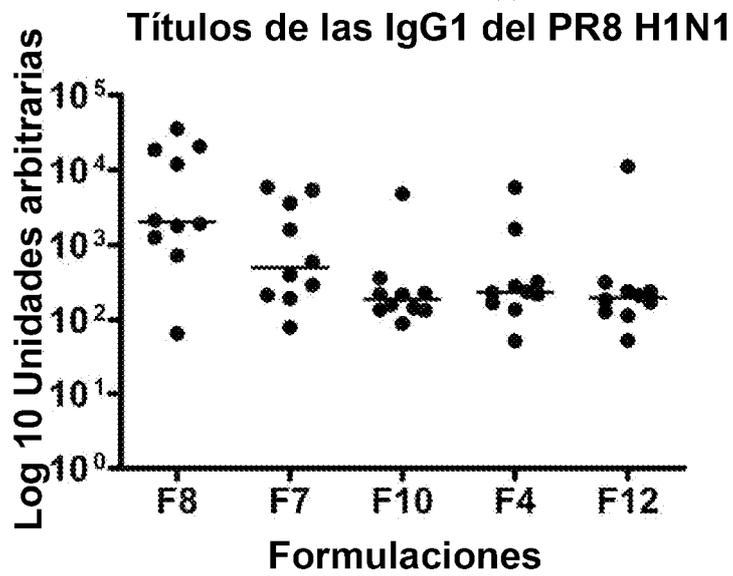


FIGURA 11

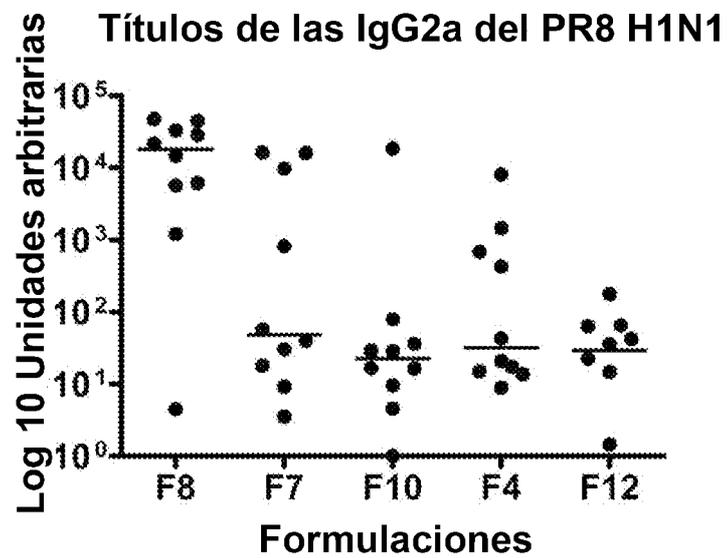


FIGURA 12

