

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 969 298**

51 Int. Cl.:

|                   |           |                   |           |
|-------------------|-----------|-------------------|-----------|
| <b>A61K 9/00</b>  | (2006.01) | <b>A61P 31/14</b> | (2006.01) |
| <b>A61K 39/12</b> | (2006.01) |                   |           |
| <b>A61K 39/15</b> | (2006.01) |                   |           |
| <b>A61K 47/02</b> | (2006.01) |                   |           |
| <b>A61K 47/12</b> | (2006.01) |                   |           |
| <b>A61K 47/18</b> | (2007.01) |                   |           |
| <b>A61K 47/22</b> | (2006.01) |                   |           |
| <b>A61K 47/26</b> | (2006.01) |                   |           |
| <b>A61K 47/32</b> | (2006.01) |                   |           |
| <b>A61P 31/12</b> | (2006.01) |                   |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2020** **PCT/EP2020/057268**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2020** **WO20187903**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2020** **E 20712313 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2023** **EP 3941436**

54 Título: **Película delgada de disolución rápida termoestable**

30 Prioridad:

**19.03.2019 US 201962820432 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.05.2024**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (50.0%)**  
**Rue de l'Institut 89**  
**1330 Rixensart, BE y**  
**ARIDIS PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LOVALENTI, PHILLIP;**  
**NGUYEN, VAN;**  
**WUERFEL, AUSTIN;**  
**DEBACQ, CHRISTOPHE;**  
**PLAPIED, LAURENCE y**  
**STRODIOT, LAURENT BERNARD JEAN**

74 Agente/Representante:

**ARIZTI ACHA, Monica**

ES 2 969 298 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

Película delgada de disolución rápida termoestable

- 5 La presente invención se refiere a películas delgadas de disolución rápida termoestables que son adecuadas para la formulación de restos biológicos tales como vacunas virales.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 La sensibilidad a la temperatura de productos biológicos tales como las vacunas supone un desafío en lo que se refiere a la formulación y significa que generalmente es necesario que se almacenen y se transporten a temperaturas de refrigeración (de 2 °C a 8 °C) y se administren inmediatamente después de retirarlos de la refrigeración. Esto requiere un almacenamiento y transporte en cadena de frío estricta, lo cual es problemático particularmente en regiones en desarrollo y bajos ingresos donde la cadena de frío requerida es imperfecta, está sobrecargada o es inexistente.
- 15 Mejorar la termoestabilidad de la formulación de vacunas podría tener un impacto importante sobre la salud pública en tales regiones al permitir (i) aumentar la cobertura de vacunas al posibilitar el almacenamiento de vacunas en instalaciones que no tienen equipos de cadena de frío y al facilitar la difusión; (ii) mejorar la eficacia al disminuir la probabilidad de administrar vacunas cuya eficacia se vio afectada por la exposición al calor y/o la congelación y (iii) reducir los costes totales del sistema al disminuir el desperdicio de vacunas debido a las exposiciones detectadas al calor y la congelación, al disminuir la huella de la cadena de frío, y al reducir los requisitos generales para la cadena de suministro de administración de vacunas (Karp *et al.*, Vacuna 2015 33(30):3471-3479).
- 20

- Los rotavirus se han reconocido como una de las causas más importantes de diarrea grave en bebés y niños pequeños (Estes, M.K. Rotaviruses and Their Replication in Fields Virology, tercera edición, editado por Fields *et al.*, Raven Publishers, Filadelfia, 1996). Se estima que la enfermedad por rotavirus es responsable de más de 600.000 muertes al año. La enfermedad inducida por rotavirus afecta con mayor frecuencia a niños de entre 6 y 24 meses de edad, y la prevalencia máxima de la enfermedad generalmente se produce durante los meses más fríos en climas templados y durante todo el año en zonas tropicales. Los rotavirus normalmente se transmiten de una persona a otra por vía fecal-oral con un período de incubación de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3 días. A diferencia de la infección en el grupo de edad de 6 a 24 meses, los recién nacidos generalmente son asintomáticos o sólo presentan una enfermedad leve. En contraposición a la enfermedad grave que normalmente se presenta en niños pequeños, la mayoría de los adultos están protegidos como resultado de una infección previa por rotavirus, por lo que la mayoría de las infecciones en adultos son leves o asintomáticas. Offit, P.A. *et al.* Comp. Ther., 8(8):21-26, 1982).
- 25
- 30

- 35 Los ejemplos de vacunas contra rotavirus disponibles comercialmente incluyen ROTARIX y ROTATEQ. ROTARIX es una vacuna monovalente viva atenuada derivada de la cepa humana 89-12 que pertenece al tipo G1P[8], indicada para la prevención de la gastroenteritis por rotavirus producida por los tipos G1 y distinto de G1 (G3, G4 y G9) cuando se administra por vía oral en una serie de 2 dosis en bebés. ROTARIX está disponible en forma liofilizada y en forma líquida, y ambas deben almacenarse entre 2° y 8 °C. ROTATEQ es una vacuna reagrupada humana-bovina pentavalente viva, en forma líquida, administrada por vía oral como una serie de 3 dosis en bebés. ROTATEQ también debe almacenarse entre 2° y 8 °C.
- 40

- Se usan películas delgadas orales (OTF) para la administración oral de moléculas pequeñas y ofrecen la ventaja de reducir significativamente el espacio de almacenamiento, permitir una fácil administración y garantizar que se administre la dosis completa. En particular, los niños pequeños y los bebés pueden escupir parte de un fármaco administrado en forma líquida, en cuyo caso no se administra la dosis completa. El uso de una OTF evita ese riesgo. Las películas delgadas orales normalmente contienen polímeros solubles en agua que tienen buenas propiedades mucoadhesivas y hacen que la película delgada se adhiera fuertemente al tejido mucoso hasta su completa disolución. Los ejemplos incluyen enjuagues refrescantes del aliento como tales como Listerine y medicamentos con receta de molécula pequeña tales como Suboxone, Zuplenz, ONSOLIS o BUNAVAIL. Sin embargo, las películas delgadas orales no se usan habitualmente para productos biológicos más complejos, tales como las vacunas.
- 45
- 50

- El documento WO201721418 da a conocer métodos para preparar películas delgadas de disolución rápida que contienen un material bioactivo, y las formulaciones preferidas para una película delgada oral que contiene un virus y en particular un rotavirus, contienen fosfato de potasio, citrato, sacarosa, sorbitol, iones de calcio, iones de zinc y gelatina, en combinación con un polímero de matriz de PVA.
- 55

- La gelatina, que se usa en la industria farmacéutica como estabilizador, es un subproducto de la industria cárnica y conlleva el riesgo de transmitir enfermedades animales, por ejemplo la encefalopatía espongiforme bovina (EEB).
- 60

Un objetivo de la presente invención es proporcionar películas delgadas de disolución rápida termoestables para productos biológicos y más particularmente vacunas virales, que no es necesario refrigerar para su almacenamiento y que están libres de estabilizadores de origen animal tales como gelatina o albúmina.

## SUMARIO DE LA INVENCION

- En un primer aspecto, la presente invención proporciona una película delgada de disolución rápida que comprende un virus y una mezcla de excipientes, en la que dicha mezcla de excipientes comprende
- 5 - uno o más polímero(s) soluble(s) en agua,
- trehalosa,
- 10 - un ion metálico,
- un carboxilato, y
- un agente de tamponamiento,
- 15 en la que dicha película delgada de disolución rápida es termoestable,
- en la que dicha película delgada de disolución rápida no comprende ningún producto de origen animal ni gelatina, y en la que dicho virus se selecciona preferiblemente de un virus vivo, un virus vivo atenuado, un virus inactivado o un virus reagrupado.
- 20 En otro aspecto, la presente invención proporciona una película delgada de disolución rápida consiste en un virus, una mezcla de excipientes, y opcionalmente un antiácido, en la que dicha mezcla de excipientes consiste en
- 25 - uno o más polímero(s) soluble(s) en agua,
- trehalosa,
- un ion metálico,
- 30 - un carboxilato,
- un agente de tamponamiento, y
- 35 - opcionalmente uno o más aminoácidos,
- en la que dicha película delgada de disolución rápida es termoestable
- en la que dicha película delgada de disolución rápida no comprende ningún producto de origen animal ni gelatina, y en la que dicho virus se selecciona preferiblemente de un virus vivo, un virus vivo atenuado, un virus inactivado o un virus reagrupado.
- 40 En un aspecto, la presente invención proporciona una película delgada de disolución rápida de la invención para su uso en terapia.
- 45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una película delgada de disolución rápida de la invención para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad infecciosa en un sujeto.
- 50 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit que comprende la película delgada de disolución rápida de la invención en un envase estéril e instrucciones para el uso del kit.
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para preparar una película delgada de disolución rápida termoestable que comprende:
- 55 a) preparar una disolución acuosa que comprende o consiste en
- un virus,
- uno o más polímero(s) soluble(s) en agua,
- 60 trehalosa,
- un ion metálico,

un carboxilato, y

uno o más agentes de tamponamiento,

5 en el que dicha disolución acuosa no comprende ningún producto de origen animal ni gelatina,

b) ajustar el pH de la disolución acuosa a un valor comprendido entre 5 y 9,

10 c) aplicar la disolución acuosa sobre una superficie de secado,

d) secar la disolución acuosa para obtener una película delgada, y

e) retirar la película delgada seca de la superficie de secado,

15 obteniendo de ese modo dicha película delgada de disolución rápida termoestable.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una película delgada de disolución rápida termoestable de la invención que puede obtenerse mediante el método de la invención.

## 20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1 - Pruebas Baby Rossett-Rice

25 FIGURA 2 – Impacto de los iones divalentes sobre la termoestabilidad. Título viral ( $\log_{10}$  uff/ml, media y desviación estándar) en los puntos de tiempo T0 4 °C, T5 días 45 °C, T5 días 40 °C, T14 días 40 °C y T19 días 40 °C. De izquierda a derecha, formulaciones P n.º 44 (sin ion divalente), P n.º 45 (ZnCh), P n.º 46 (CaCh), P n.º 47 (ZnCl<sub>2</sub> / CaCl<sub>2</sub>), P n.º 48 (MgCl<sub>2</sub>), P n.º 49 (MnCl<sub>2</sub>), P n.º 50 (NaCl) y Rotarix Iyo.

30 FIGURA 3 – Tasa de degradación por temperatura para P n.º 51 expresada en  $\log_{10}$  uff/ml (FIGURA 3A) y como ln(tasa de degradación expresada en  $\log_{10}$  uff/ml por día) (FIGURA 3B).

35 FIGURA 4 - Impacto de los excipientes sobre la termoestabilidad. Título viral ( $\log_{10}$  uff/ml, media y desviación estándar) en los puntos de tiempo T0 4 °C, T5 días 40 °C, T14 días 40 °C, T20 días 40 °C y T14 días 45 °C. De izquierda a derecha, formulaciones P n.º 58 (ZnCl<sub>2</sub>), P n.º 59 (ZnCl<sub>2</sub> + histidina), P n.º 60 (ZnCl<sub>2</sub> + arginina); P n.º 61 (ZnCl<sub>2</sub> + metionina), P n.º 62 (ZnCl<sub>2</sub> + prolina), P n.º 63 (ZnCl<sub>2</sub> + hidroxiprolina), Rotarix Iyo, P n.º 64 (ZnCl<sub>2</sub>), P n.º 65 (ZnCl<sub>2</sub> + glicina), P n.º 66 (ZnCl<sub>2</sub> + ácido glutámico), P n.º 67 (ZnCl<sub>2</sub> + travasol), P n.º 68 (ZnCl<sub>2</sub> + alanina), P n.º 69 (ZnCl<sub>2</sub> + rHSA), P n.º 70 (ZnCl<sub>2</sub> + sorbitol) y Rotarix Iyo.

40 FIGURA 5 - Impacto de los excipientes sobre la termoestabilidad. Título viral ( $\log_{10}$  uff/ml, media y desviación estándar) en los puntos de tiempo T0 4 °C, T5 días 40 °C, T14 días 40 °C, T20 días 40 °C y T14 días 45 °C. De izquierda a derecha, formulaciones P n.º 71 (ZnCl<sub>2</sub>), P n.º 72 (ZnCl<sub>2</sub> + fenilalanina), P n.º 73 (ZnCl<sub>2</sub> + glicerol), P n.º 74 (ZnCl<sub>2</sub> + trehalosa), P n.º 75 (ZnCl<sub>2</sub> + TPGS), P n.º 76 (ZnCl<sub>2</sub> + polisorbato 20), P n.º 77 (ZnCl<sub>2</sub> + Pluronic F68) y Rotarix Iyo.

45 FIGURA 6 - Termoestabilidad de los lotes de OTF P n.º 84, P n.º 85, P n.º 86, P n.º 87, P n.º 88 y P n.º 89. Título viral ( $\log_{10}$  uff/ml, media y límites de confianza del 95 %) en los puntos de tiempo T0 4 °C, T2 semanas 40 °C, T3 semanas 40 °C y T5 semanas 40 °C.

50 FIGURA 7 - Impacto de los polímeros sobre la termoestabilidad. Título viral ( $\log_{10}$  uff/ml, media y desviación estándar) en los puntos de tiempo T0 4 °C, T2 semanas 40 °C, T3 semanas 40 °C, T5 semanas 40 °C y T6 semanas 40 °C. De izquierda a derecha, formulaciones P n.º 94 (90 % de PVA / 10 % de PEG400), P n.º 95 (90 % de PVA / 10 % de HPMC), P n.º 97 (100 % de PVA), P n.º 99 (80 % de PVP / 20 % de PEG) y Rotarix Iyo.

55 FIGURA 8 - Termoestabilidad de la forma 1 (histidina pH 7,0) y la forma 8 (histidina pH 7,5). Título viral ( $\log_{10}$  uff/ml, media y desviación estándar) en los puntos de tiempo T0 4 °C, T3 semanas 40 °C, T5 semanas 40 °C, T8 semanas 40 °C y T12 semanas 40 °C para las rondas 1, 2 y 3.

60 FIGURA 9 - Termoestabilidad de la forma 7 (formulación de base pH 7) y la forma 2 (trehalosa pH 7). Título viral ( $\log_{10}$  uff/ml, media y desviación estándar) en los puntos de tiempo T0 4 °C, T3 semanas 40 °C, T5 semanas 40 °C, T8 semanas 40 °C y T12 semanas 40 °C para las rondas 1, 2 y 3.

FIGURA 10 - Termoestabilidad de la forma 3 (arginina pH 7), la forma 4 (prolina pH 7), la forma 6 (glicina pH 7) y la forma 5 (travasol pH 7). Título viral ( $\log_{10}$  uff/ml, media y desviación estándar) en los puntos de tiempo T0 4 °C, T3 semanas 40 °C, T5 semanas 40 °C, T8 semanas 40 °C y T12 semanas 40 °C para las rondas 1, 2 y 3.

FIGURA 11 - Termoestabilidad de los lotes de OTF P n.º 165, P n.º 169, P n.º 173, P n.º 181, P n.º 186, P n.º 195, P n.º 198 y Rotarix Iyo. Título viral ( $\text{Log}_{10}$  uff/ml, media y límites de confianza del 95 %) en los puntos de tiempo T0 4 °C, T3 semanas 40 °C, T5 semanas 40 °C y T10 semanas 40 °C.

FIGURA 12 - Termoestabilidad de los lotes de OTF P n.º 168, P n.º 175, P n.º 184, P n.º 190, P n.º 193 y Rotarix Iyo. Título viral ( $\text{Log}_{10}$  uff/ml, media y límites de confianza del 95 %) en los puntos de tiempo T0 4 °C, T3 semanas 40 °C, T5 semanas 40 °C y T10 semanas 40 °C.

FIGURA 13 - Termoestabilidad de los lotes de OTF P n.º 171, P n.º 177, P n.º 179, P n.º 180, P n.º 183, P n.º 188 y Rotarix Iyo. Título viral ( $\text{Log}_{10}$  uff/ml, media y límites de confianza del 95 %) en los puntos de tiempo T0 4 °C, T3 semanas 40 °C, T5 semanas 40 °C y T10 semanas 40 °C.

FIGURA 14 - Termoestabilidad de los lotes de OTF P n.º 166, P n.º 172, P n.º 189, P n.º 192, P n.º 196 y Rotarix Iyo. Título viral ( $\text{Log}_{10}$  uff/ml, media y límites de confianza del 95 %) en los puntos de tiempo T0 4 °C, T3 semanas 40 °C, T5 semanas 40 °C y T10 semanas 40 °C.

FIGURA 15 - Termoestabilidad de los lotes de OTF P n.º 167, P n.º 178, P n.º 185, P n.º 197 y Rotarix Iyo. Título viral ( $\text{Log}_{10}$  uff/ml, media y límites de confianza del 95 %) en los puntos de tiempo T0 4 °C, T3 semanas 40 °C, T5 semanas 40 °C y T10 semanas 40 °C.

FIGURA 16 - Termoestabilidad de los lotes de OTF P n.º 170, P n.º 174, P n.º 176, P n.º 182, P n.º 187, P n.º 191 y Rotarix Iyo. Título viral ( $\text{Log}_{10}$  uff/ml, media y límites de confianza del 95 %) en los puntos de tiempo T0 4 °C, T3 semanas 40 °C, T5 semanas 40 °C y T10 semanas 40 °C.

FIGURA 17 - Predicción de la tasa de degradación a 30 °C basado en el modelo de Arrhenius para la formulación de OTF P n.º 187.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una película delgada de disolución rápida que comprende un virus y una mezcla de excipientes, en la que la mezcla de excipientes comprende

- uno o más polímero(s) soluble(s) en agua,

- trehalosa,

- un ion metálico,

- un carboxilato, y

- un agente de tamponamiento,

en la que dicha película delgada de disolución rápida es termoestable,

en la que dicha película delgada de disolución rápida no comprende ningún producto de origen animal ni gelatina, y en la que dicho virus se selecciona preferiblemente de un virus vivo, un virus vivo atenuado, un virus inactivado o un virus reagrupado.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una película delgada de disolución rápida consiste en un virus, una mezcla de excipientes, y opcionalmente un antiácido, en la que dicha mezcla de excipientes consiste en

- uno o más polímero(s) soluble(s) en agua,

- trehalosa,

- un ion metálico,

- un carboxilato,

- un agente de tamponamiento,

- opcionalmente uno o más aminoácidos,

en la que dicha película delgada de disolución rápida es termoestable,

en la que dicha película delgada de disolución rápida no comprende ningún producto de origen animal ni gelatina, y en la que dicho virus se selecciona preferiblemente de un virus vivo, un virus vivo atenuado, un virus inactivado o un virus reagrupado.

Tal como se usa en el presente documento, una “**película delgada de disolución rápida**” es una película delgada que es adecuada para la administración a una superficie mucosa de un paciente y que se disuelve rápidamente tras el contacto con la superficie mucosa. Normalmente, una “película delgada de disolución rápida” comprende una matriz polimérica soluble en agua que se disuelve rápidamente en la superficie mucosa, por ejemplo, la lengua o la cavidad bucal, administrando el virus al tracto digestivo o a la circulación sistémica. Puede usarse una película delgada de disolución rápida de la invención para administrar el virus mediante absorción mucosa. En una realización preferida, la película delgada de disolución rápida es una película delgada oral (“OTF”) para administración en la boca (por vía yugal o sublingual). La disolución rápida y la mucoadhesión son propiedades clave importantes para el cumplimiento del paciente y una administración mejorada del virus. De manera adecuada, la película delgada de disolución rápida se disuelve rápidamente tras el contacto con el tejido mucoso, en particular tras el contacto con la saliva y el tejido bucal en el caso de una película delgada oral, liberando el virus. En una realización preferida, la película delgada de disolución rápida se disuelve en menos de un minuto, preferiblemente en menos de 50 segundos, tras el contacto con el tejido mucoso, en particular tras el contacto con la saliva y el tejido bucal en el caso de una película delgada oral.

La película delgada de disolución rápida de la invención comprende un **virus**. De manera adecuada, el virus se selecciona de un virus vivo, un virus vivo atenuado y un virus inactivado.

Un “virus vivo atenuado” es aquel que es viable (es decir, vivo) pero que o bien es menos virulento en comparación con la cepa de tipo natural o bien es avirulento. Los métodos de atenuación de virus se conocen en la técnica e incluyen pasar a cultivo celular, preparar virus reagrupados y usar una variante de una especie para vacunar a un sujeto de una especie diferente. Un “virus inactivado (o muerto)” es aquel que no es viable. Los métodos de inactivación de virus se conocen en la técnica y se basan en una etapa de inactivación después de la incubación de células infectadas (es decir, replicación y propagación del virus). Un “virus vivo” es aquel que es viable y cuya virulencia no se ha atenuado. La elección de un virus vivo, vivo atenuado o inactivado para el diseño de una vacuna dependerá de si el virus puede provocar una enfermedad en el paciente y de su nivel de virulencia, y de la inmunogenicidad de una forma atenuada, muerta o viva.

En una realización, el virus es un virus reagrupado. Un “virus reagrupado” es aquel que resulta de la mezcla del material genético de diferentes cepas virales. Por ejemplo, al menos un antígeno o al menos un segmento de una primera cepa viral se reemplaza por al menos un antígeno o al menos un segmento de una segunda cepa viral. Las técnicas para preparar virus reagrupados se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Foster, R. H. y Wagstaff, A. J. Tetravalent Rotavirus Vaccine, a review. ADIS drug evaluation, BioDrugs, Gev, 9 (2), 155-178, 1998 para rotavirus reagrupados).

En una realización, el virus es un virus vivo, vivo atenuado o inactivado que se ha modificado genéticamente para codificar uno o más antígenos derivados de un patógeno diferente que provoca una respuesta inmunitaria protectora contra ese patógeno.

El título de virus puede expresarse en ufc (unidades formadoras de focos) por ml o por dosis. Un método adecuado para medir el título de virus expresado en ufc por ml o por dosis es el siguiente. Se inoculan diluciones de muestra en un césped celular (por ejemplo, células MA-104 en el caso de un rotavirus) durante un tiempo y a una temperatura adecuados para permitir un ciclo de replicación viral (por ejemplo, 16-18 horas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) en el caso de un rotavirus). Se revelan las partículas virales mediante inmunotinción. Después de la incubación, se detectan las partículas virales mediante un anticuerpo monoclonal específico para un antígeno viral (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 9F6 contra VP4 en el caso de un rotavirus), que se revela además mediante un segundo anticuerpo (anti-ratón) acoplado con HRP (peroxidasa de rábano picante). Luego se añade el reactivo TrueBlue y se convierte en puntos azules.

Alternativamente, el título del virus puede expresarse en CCID<sub>50</sub> (dosis que infecta al 50 % del cultivo celular) por ml o por dosis. Un método adecuado para medir el título de virus expresado en CCID<sub>50</sub> por ml o por dosis es el siguiente. Se inoculan diluciones de muestra en un césped celular (por ejemplo, células MA-104 en el caso de un rotavirus) durante un tiempo y a una temperatura adecuados para permitir un ciclo de replicación viral (por ejemplo, 7 días  $\pm$  1 día a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  en el caso de un rotavirus). Se detectan las partículas virales mediante el método de inmunofluorescencia. Después de la incubación, las células infectadas entran en contacto con un anticuerpo monoclonal contra un antígeno viral (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 2C9 contra VP7 en el caso de un rotavirus), que se revela adicionalmente mediante un segundo anticuerpo (anti-ratón) acoplado a una molécula de fluorescencia (FITC = isotiocianato de fluoresceína). La observación de células fluorescentes al microscopio indica que el césped celular estaba bien infectado por el virus. El título viral se obtiene mediante el método de cálculo de Reed y Muench

(Reed y Muench (1938) The American Journal of Hygiene 27:493-497).

De manera adecuada, el virus está presente en la película delgada de disolución rápida de la invención en un título que oscila entre aproximadamente  $1 \times 10^5$  y aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  uff por dosis (o entre aproximadamente  $1 \times 10^{5.5}$  y aproximadamente  $1 \times 10^{11.5}$  CCID50 por dosis), de manera más adecuada en un título que oscila entre aproximadamente  $10^5$  y aproximadamente  $10^{10}$  uff por dosis (o entre aproximadamente  $10^{5.5}$  y aproximadamente  $10^{10.5}$  CCID50 por dosis).

En una realización preferida, el virus es un **rotavirus**.

Los rotavirus son virus icosaédricos sin envoltura con 11 segmentos de ARN bicatenario que codifica para 6 proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6, VP7) y 5 no estructurales (NSP1-NSP5). Con un diámetro de aproximadamente 100 nm, el rotavirus es un sistema macromolecular complejo compuesto por tres capas concéntricas de proteínas que rodean su genoma. La capa más interna consiste en 60 dímeros de VP2 que rodean el genoma viral y 12 copias de cada una de las proteínas VP1 (ARN polimerasa) y VP3 (guanil transferasa). La capa intermedia está compuesta por 260 trímeros de VP6 con la superficie externa compuesta por 780 copias de la glicoproteína VP7 (260 trímeros) y 60 estructuras en forma de púas de VP4 (dímeros) que se extienden 12 nm desde la superficie. La proteína VP6 determina el antígeno de grupo y subgrupo, y las proteínas VP4 y VP7 son las determinantes de la especificidad del serotipo. La glicoproteína VP7 define los tipos G y la proteína VP4 sensible a proteasa define los tipos P. Las cepas generalmente se designan por sus especificidades de serotipo G (por ejemplo, serotipos G1 a G4 y G9), y el tipo P se indica mediante un número y una letra para el serotipo P y mediante un número entre corchetes para el genotipo P correspondiente. Hasta la fecha, se han identificado al menos 14 serotipos G de rotavirus y 11 serotipos P de rotavirus (Linhares A.C. y Bresse J.S., Pan. Soy. J. Publ. Health 2000, 9, 305-330). Entre estos, se han identificado 10 serotipos G y 6 serotipos P entre los rotavirus humanos (HRV).

En una realización, la película delgada de disolución rápida de la invención comprende un rotavirus vivo atenuado, preferiblemente un rotavirus humano (HRV) vivo atenuado, más preferiblemente un HRV vivo atenuado seleccionado del grupo que comprende los serotipos G1, G2, G3, G4, G9, P[1] o P[8]. En una realización preferida, el rotavirus es un rotavirus humano vivo atenuado de tipo G1P[8]. La película delgada de disolución rápida de la invención puede comprender más de 1 serotipo de HRV y en una realización particular de la invención la vacuna contra HRV comprende 5 o más serotipos de HRV (en particular G1, G2, G3, G4, G9, P1 o P8). En una realización, el rotavirus es un rotavirus humano vivo atenuado seleccionado de la cepa 89-12C2 depositada en la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852) con el número de registro VR 2272, su progenie, reagrupados y derivados inmunológicamente activos de los mismos, y la cepa P43 depositada en la ECACC (Colección Europea de Cultivos de Células Animales, Laboratorio de Investigación y Producción de Vacunas, Servicio de Laboratorio de Salud Pública, Centro de Investigación y Microbiología Aplicadas, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Reino Unido) el 13 de agosto de 1999 con el número de registro ECACC 99081301, su progenie, reagrupados y derivados inmunológicamente activos de los mismos. Los derivados de cepas depositadas pueden obtenerse sometiendo dichas cepas a procesamiento adicional tal como propagándolas mediante pases adicionales, clonación u otros procedimientos usando el virus vivo o modificando dichas cepas depositadas de cualquier manera, incluyendo mediante técnicas de ingeniería genética o técnicas de reagrupación. Tales etapas y técnicas se conocen bien en la técnica.

En otra realización, la película delgada de disolución rápida comprende un rotavirus reagrupado, por ejemplo un rotavirus reagrupado humano-humano, rotavirus reagrupado bovino-humano o un rotavirus reagrupado mono Rhesus-humano. Los rotavirus reagrupados y las técnicas para prepararlos se conocen bien (Foster, R. H. y Wagstaff, A. J. Tetravalent Rotavirus Vaccine, A review. ADIS drug evaluation, BioDrugs, Gev, 9 (2), 155-178, 1998).

Los rotavirus pueden producirse según técnicas de producción rutinarias. Normalmente, las preparaciones de rotavirus pueden derivarse de métodos de cultivo tisular usados para propagar el virus. Los sustratos celulares adecuados para hacer crecer el virus incluyen, por ejemplo, células renales de perro tales como MDCK o células de un clon de MDCK, células similares a MDCK, células renales de mono tales como células AGMK, incluyendo células Vero que son particularmente adecuadas, otras líneas celulares de origen de riñón de mono tales como BSC-1, LLC-MK2 y MA104, líneas celulares de cerdo adecuadas, o cualquier otro tipo de célula de mamífero adecuado para la producción de rotavirus con fines de vacuna. Los sustratos celulares adecuados también incluyen células humanas, por ejemplo, células MRC-5. Los sustratos celulares adecuados no se limitan a líneas celulares; por ejemplo, también se incluyen células primarias.

Un rotavirus para su inclusión en la película delgada de disolución rápida de la invención puede ser monovalente, es decir, que contiene una única cepa de rotavirus, o puede ser multivalente, es decir, que contiene al menos dos o más cepas de rotavirus.

De manera adecuada, el rotavirus está presente en la película delgada de disolución rápida de la invención en un título que oscila entre aproximadamente  $1 \times 10^5$  y aproximadamente  $1 \times 10^8$  uff por dosis (o entre aproximadamente  $1 \times 10^{5.5}$  y

aproximadamente  $1 \times 10^{8.5}$  CCID50 por dosis), de manera más adecuada en un título que oscila entre aproximadamente  $10^5$  y aproximadamente  $10^6$  uff por dosis (o entre aproximadamente  $10^{5.5}$  y aproximadamente  $10^{6.5}$  CCID50 por dosis).

- 5 La película delgada de disolución rápida de la invención comprende una **mezcla de excipientes** que comprende un polímero soluble en agua, trehalosa, un ion metálico, un carboxilato y un agente de tamponamiento. Los inventores han demostrado que tales mezclas de excipientes son adecuadas para proporcionar termoeestabilidad a un virus en una película delgada de disolución rápida en ausencia de un estabilizador de origen animal tal como gelatina.
- 10 La mezcla de excipientes comprende uno o más **polímero(s) soluble(s) en agua**. Los polímeros solubles en agua adecuados incluyen poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), alginato, croscarmelosa sódica (también conocida como "carboximetilcelulosa de sodio" o "CMC de sodio") e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Los ejemplos de combinaciones de polímeros solubles en agua adecuadas incluyen PVA-PEG (90 %-10 % en peso) y PVA-HPMC (90 %-10 % en peso).
- 15 De manera adecuada, la cantidad del uno o más polímero(s) soluble(s) en agua representa desde aproximadamente el 30 % hasta aproximadamente el 90 % de la mezcla de excipientes en peso, preferiblemente desde aproximadamente el 40 % hasta aproximadamente el 85 % de la mezcla de excipientes en peso, por ejemplo aproximadamente el 40, el 45, el 50, el 55, el 60, el 65, el 70, el 75, el 80 o el 85 % de la mezcla de excipientes en peso.
- 20 En una realización preferida, el uno o más polímero(s) soluble(s) en agua comprenden PVA, de manera adecuada al menos el 80 % de PVA, de manera más adecuada al menos el 90 % de PVA.
- 25 En una realización más preferida, la mezcla de excipientes comprende un solo polímero soluble en agua que es PVA y la cantidad de PVA representa desde aproximadamente el 30 % hasta aproximadamente el 90 % de la mezcla de excipientes en peso, preferiblemente desde aproximadamente el 40 % hasta aproximadamente el 85 % de la mezcla de excipientes en peso, por ejemplo aproximadamente el 40, el 45, el 50, el 55, el 60, el 65, el 70, el 75, el 80 o el 85 % de la mezcla de excipientes en peso.
- 30 La mezcla de excipientes comprende a **trehalosa**. En una realización preferida, la trehalosa es trehalosa dihidratada.
- 35 De manera adecuada, la cantidad de la trehalosa representa desde aproximadamente el 10 % hasta aproximadamente el 60 % de la mezcla de excipientes en peso, preferiblemente desde aproximadamente el 14 % hasta aproximadamente el 45 % de la mezcla de excipientes en peso, por ejemplo aproximadamente el 14, el 15, el 20, el 25, el 30, el 35, el 40, el 42 o el 45 % de la mezcla de excipientes en peso. En una realización preferida, la cantidad de trehalosa (de manera adecuada trehalosa dihidratada) representa desde aproximadamente el 10 % hasta aproximadamente el 60 % de la mezcla de excipientes en peso, preferiblemente desde aproximadamente el 14 % hasta aproximadamente el 45 % de la mezcla de excipientes en peso, por ejemplo aproximadamente el 14, el 15, el 20, el 25, el 30, el 35, el 40, el 42 o el 45 % de la mezcla de excipientes en peso.
- 40 La mezcla de excipientes comprende un **ion metálico**. Los iones metálicos adecuados incluyen  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ .
- 45 En una realización, el ion metálico se selecciona de  $Zn^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ . En una realización preferida, el ion metálico es  $Zn^{2+}$ . De manera adecuada, el ion metálico está en forma de una sal, preferiblemente una sal de cloruro. En una realización, el ion metálico está en forma de una sal cloruro seleccionada de  $ZnCl_2$  y  $MnCl_2$ . En una realización preferida, el ion metálico está en forma de  $ZnCl_2$ .
- 50 De manera adecuada, la cantidad del ion metálico o la sal representa desde aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 1 % de la mezcla de excipientes en peso, preferiblemente desde aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 0,5 %, desde aproximadamente el 0,08 % hasta aproximadamente el 0,25 %, desde aproximadamente el 0,10 % hasta aproximadamente el 0,20 % de la mezcla de excipientes en peso, por ejemplo aproximadamente el 0,10, el 0,11, el 0,12, el 0,13, el 0,14, el 0,15, el 0,16, el 0,17, el 0,18, el 0,19 o el 0,20 % de la mezcla de excipientes en peso. En una realización preferida, el ion metálico está en forma de  $ZnCl_2$  y la cantidad de  $ZnCl_2$  representa desde aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 1 % de la mezcla de excipientes en peso, preferiblemente desde aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 0,5 %, desde aproximadamente el 0,08 % hasta aproximadamente el 0,25 %, desde aproximadamente el 0,10 % hasta aproximadamente el 0,20 % de la mezcla de excipientes en peso, por ejemplo aproximadamente el 0,10, el 0,11, el 0,12, el 0,13, el 0,14, el 0,15, el 0,16, el 0,17, el 0,18, el 0,19 o el 0,20 % de la mezcla de excipientes en peso.
- 60 La mezcla de excipientes comprende un carboxilato. Los carboxilatos adecuados incluyen succinato, citrato, fumarato, tartrato, maleato y lactato. En una realización preferida, el **carboxilato** es citrato, de manera adecuada en la forma de ácido cítrico.

De manera adecuada, la cantidad del carboxilato representa desde aproximadamente el 0,5 % hasta

- aproximadamente el 5 % de la mezcla de excipientes en peso, preferiblemente desde aproximadamente el 0,75 % hasta aproximadamente el 4 %, desde aproximadamente el 1 % hasta aproximadamente el 3 % de la mezcla de excipientes en peso, por ejemplo aproximadamente el 1, el 1,5, el 1,7, el 1,75, el 1,8, el 1,85, el 1,9, el 2, el 2,5 o el 3 % de la mezcla de excipientes en peso. En una realización preferida, el carboxilato es ácido cítrico y la cantidad de
- 5 ácido cítrico representa desde aproximadamente el 0,5 % hasta aproximadamente el 5 % de la mezcla de excipientes en peso, preferiblemente desde aproximadamente el 0,75 % hasta aproximadamente el 4 %, desde aproximadamente el 1 % hasta aproximadamente el 3 % de la mezcla de excipientes en peso, por ejemplo aproximadamente el 1, el 1,5, el 1,7, el 1,75, el 1,8, el 1,85, el 1,9, el 2, el 2,5 o el 3 % de la mezcla de excipientes en peso.
- 10 La mezcla de excipientes comprende un **agente de tamponamiento**. En una realización preferida, el agente de tamponamiento se selecciona de tampón fosfato ( $K_2HPO_4$ ) y base de histidina.
- De manera adecuada, la cantidad del agente de tamponamiento representa desde aproximadamente el 0,5 % hasta aproximadamente el 5 % de la mezcla de excipientes en peso, preferiblemente desde aproximadamente el 0,75 % hasta aproximadamente el 4 %, desde aproximadamente el 1 % hasta aproximadamente el 3 % de la mezcla de excipientes en peso, por ejemplo aproximadamente el 1, el 1,5, el 1,7, el 1,75, el 1,8, el 1,85, el 1,9, el 2, el 2,5 o el 3 % de la mezcla de excipientes en peso. En una realización preferida, el agente de tamponamiento se selecciona de
- 15 tampón fosfato y base de histidina y la cantidad de tampón fosfato o base de histidina representa desde aproximadamente el 0,5 % hasta aproximadamente el 5 % de la mezcla de excipientes en peso, preferiblemente desde aproximadamente el 0,75 % hasta aproximadamente el 4 %, desde aproximadamente el 1 % hasta aproximadamente el 3 % de la mezcla de excipientes en peso, por ejemplo aproximadamente el 1, el 1,5, el 1,7, el 1,75, el 1,8, el 1,85, el 1,9, el 2, el 2,5 o el 3 % de la mezcla de excipientes en peso.
- 20 En una realización, la mezcla de excipientes comprende además uno o más **aminoácidos**. En una realización preferida, el uno o más aminoácidos se seleccionan de glicina, arginina, prolina, y combinaciones de los mismos. En una realización más preferida, la mezcla de excipientes comprende glicina, arginina o ambos.
- 25 De manera adecuada, la cantidad de aminoácidos representa desde aproximadamente el 0 % hasta aproximadamente el 10 % de la mezcla de excipientes en peso, preferiblemente desde aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 8 %, desde aproximadamente el 0,10 % hasta aproximadamente el 7,5 %, desde aproximadamente el 0,15 % hasta aproximadamente el 7 % de la mezcla de excipientes en peso, por ejemplo aproximadamente el 0,15, el 0,20, el 0,25, el 0,50, el 0,75, el 1, el 2, el 3, el 4, el 5, el 6 o el 7 % de la mezcla de excipientes en peso. En una realización preferida, la mezcla de excipientes comprende glicina, arginina o ambas, la cantidad de glicina representa desde aproximadamente el 0 % hasta aproximadamente el 5 % de la mezcla de excipientes en peso, preferiblemente desde aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 4 %, desde aproximadamente el 0,08 % hasta aproximadamente el 3 % de la mezcla de excipientes en peso, por ejemplo aproximadamente el 0,08, el 0,10, el 0,15, el 0,20, el 0,25, el 0,5, el 0,75, el 1, el 1,5, el 2, el 2,5 o el 3 % de la mezcla de excipientes en peso, y la cantidad de arginina representa desde aproximadamente el 0 % hasta aproximadamente el 10 % de la mezcla de excipientes en peso, preferiblemente desde aproximadamente el 0,05 % hasta
- 30 aproximadamente el 8 %, desde aproximadamente el 0,10 % hasta aproximadamente el 7,5 %, desde aproximadamente el 0,15 % hasta aproximadamente el 7 % de la mezcla de excipientes en peso, por ejemplo aproximadamente el 0,15, el 0,20, el 0,25, el 0,50, el 0,75, el 1, el 2, el 3, el 4, el 5, el 6 o el 7 % de la mezcla de excipientes en peso.
- 35 En una realización de la película delgada de disolución rápida de la invención, el virus está presente en la película delgada de disolución rápida de la invención en un título que oscila entre aproximadamente  $1 \times 10^5$  y aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  ufc por dosis, y en la que la mezcla de excipientes comprende o consiste en
- 45 - entre el 30 % y el 90 %, preferiblemente entre el 40 % y el 85 %, por ejemplo aproximadamente el 40, el 45, el 50, el 55, el 60, el 65, el 70, el 75, el 80 o el 85 % en peso del uno o más polímeros solubles en agua,
- 50 - entre el 10 % y el 60 %, preferiblemente entre el 14 % y el 45 %, por ejemplo aproximadamente el 14, el 15, el 20, el 25, el 30, el 35, el 40, el 42 o el 45 % en peso de trehalosa,
- 55 - entre el 0,01 % y el 1 %, preferiblemente entre el 0,05 % y el 0,5 %, entre el 0,08 % y el 0,25 %, entre el 0,10 % y el 0,20 %, por ejemplo aproximadamente el 0,10, el 0,11, el 0,12, el 0,13, el 0,14, el 0,15, el 0,16, el 0,17, el 0,18, el 0,19 o el 0,20 % en peso del ion metálico o la sal,
- 60 - entre el 0,5 % y el 5 %, preferiblemente entre el 0,75 % y el 4 %, entre el 1 % y el 3 %, por ejemplo aproximadamente el 1, el 1,5, el 1,7, el 1,75, el 1,8, el 1,85, el 1,9, el 2, el 2,5 o el 3 % en peso del carboxilato,
- entre el 0,5 % y el 5 %, preferiblemente entre el 0,75 % y el 4 %, entre el 1 % y el 3 %, por ejemplo aproximadamente el 1, el 1,5, el 1,7, el 1,75, el 1,8, el 1,85, el 1,9, el 2, el 2,5 o el 3 % en peso del agente de tamponamiento, y

- entre el 0 % y el 20 %, preferiblemente entre el 0,05 % y el 15 %, entre el 0,05 % y el 12 %, entre el 0,05 % y el 10 %, por ejemplo aproximadamente el 0,05, el 0,10, el 0,15, el 0,20, el 0,25, el 0,50, el 0,75, el 1, el 2, el 3, el 4, el 5, el 6, el 7, el 8, el 9 o el 10 % en peso de uno o más aminoácidos.

- 5 En una realización preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, en la que en la mezcla de excipientes,

- el polímero soluble en agua es PVA,

- 10 - el ion metálico está en forma de  $ZnCl_2$ ,

- el carboxilato es ácido cítrico,

- 15 - el agente de tamponamiento se selecciona de  $K_2HPO_4$  y base de histidina, y

- el uno o más aminoácidos, si están presentes, se seleccionan de arginina y/o glicina.

En una realización más preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, la mezcla de excipientes comprende o consiste en

- 20 - entre el 30 % y el 90 %, preferiblemente entre el 40 % y el 85 %, por ejemplo aproximadamente el 40, el 45, el 50, el 55, el 60, el 65, el 70, el 75, el 80 o el 85 % en peso de PVA,

- 25 - entre el 10 % y el 60 %, preferiblemente entre el 14 % y el 45 %, por ejemplo aproximadamente el 14, el 15, el 20, el 25, el 30, el 35, el 40, el 42 o el 45 % en peso de trehalosa,

- entre el 0,01 % y el 1 %, preferiblemente entre el 0,05 % y el 0,5 %, entre el 0,08 % y el 0,25 %, entre el 0,10 % y el 0,20 %, por ejemplo aproximadamente el 0,10, el 0,11, el 0,12, el 0,13, el 0,14, el 0,15, el 0,16, el 0,17, el 0,18, el 0,19 o el 0,20 % en peso de  $ZnCl_2$ ,

- 30 - entre el 0,5 % y el 5 %, preferiblemente entre el 0,75 % y el 4 %, entre el 1 % y el 3 %, por ejemplo aproximadamente el 1, el 1,5, el 1,7, el 1,75, el 1,8, el 1,85, el 1,9, el 2, el 2,5 o el 3 % en peso de ácido cítrico,

- 35 - entre el 0,5 % y el 5 %, preferiblemente entre el 0,75 % y el 4 %, entre el 1 % y el 3 %, por ejemplo aproximadamente el 1, el 1,5, el 1,7, el 1,75, el 1,8, el 1,85, el 1,9, el 2, el 2,5 o el 3 % en peso de  $K_2HPO_4$  o base de histidina,

- entre el 0 % y el 10 %, preferiblemente entre el 0,05 % y el 8 %, entre el 0,10 % y el 7,5 %, entre el 0,15 % y el 7 %, por ejemplo aproximadamente el 0,15, el 0,20, el 0,25, el 0,50, el 0,75, el 1, el 2, el 3, el 4, el 5, el 6 o el 7 % en peso de arginina y,

- 40 - entre el 0 % y el 5 %, preferiblemente entre el 0,05 % y el 4 %, entre el 0,08 % y el 3 %, por ejemplo aproximadamente el 0,08, el 0,10, el 0,15, el 0,20, el 0,25, el 0,5, el 0,75, el 1, el 1,5, el 2, el 2,5 o el 3 % en peso de glicina.

- 45 Preferiblemente, el virus es un rotavirus. De manera adecuada, el rotavirus está presente en la película delgada de disolución rápida de la invención en un título que oscila entre aproximadamente  $1 \times 10^5$  y aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc por dosis.

- 50 En una realización preferida, la película delgada de disolución rápida comprende además un **antiácido**. De hecho, los fármacos administrados a través del tracto gastrointestinal (GI) están sometidos a un pH bajo (alta acidez) y a un entorno enzimático riguroso en la cavidad gástrica. Los virus pueden desnaturalizarse o degradarse en tales condiciones, lo que conduce a una pérdida significativa de su bioactividad. Pueden usarse antiácidos para prevenir tal desnaturalización y degradación cuando se administra el producto biológico por vía oral. En el presente documento, un "antiácido" es un compuesto que permite aumentar el pH del estómago durante un tiempo suficientemente largo para que el producto biológico pase a través del estómago sin verse afectado significativamente. La capacidad del antiácido puede medirse mediante la prueba Baby Rossett-Rice (BBR) tal como se describe más adelante en el ejemplo 1(2), figura 1. En una realización preferida, el antiácido permite que el pH permanezca por encima de 4 en la prueba BBR durante al menos 10 minutos, preferiblemente durante al menos 15 minutos.

- 60 Los antiácidos adecuados incluyen acetato alcalino, citrato, succinato, tartrato, maleato, lactato, bicarbonato de amonio, fosfato, óxido de magnesio, óxido de aluminio, hidróxido de aluminio con hidróxido de magnesio, gel de carbonato de aluminio, carbonato de calcio, bicarbonato de sodio, hidrotalcita, sucralfato, subsalicilato de bismuto, adipato tal como adipato de sodio y/o similares. En una realización preferida, el antiácido es carbonato de calcio ( $CaCO_3$ ).

En una realización preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida comprende además un antiácido que es carbonato de calcio.

5 En una realización, la película delgada de disolución rápida de la invención comprende además un antiácido y la razón mezcla de excipientes:antiácido (p/p) es de desde aproximadamente el 1:3 hasta aproximadamente 2:1, desde aproximadamente el 1:2 hasta 1,5:1, desde aproximadamente el 1:1,5 hasta 1:1, por ejemplo aproximadamente 1:1,5, 1:1,4, 1:1,3, 1:1,2, 1:1,1 o 1:1. En una realización preferida, la película delgada de disolución rápida de la invención comprende además un antiácido que es  $\text{CaCO}_3$ , y la razón mezcla de excipientes: $\text{CaCO}_3$  (p/p) es de desde aproximadamente 1:3 hasta aproximadamente 2:1, desde aproximadamente 1:2 hasta 1,5:1, desde aproximadamente 1:1,5 hasta 1:1, por ejemplo aproximadamente 1:1,5, 1:1,4, 1:1,3, 1:1,2, 1:1,1 o 1:1.

10 En una realización preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, el virus es un rotavirus, que está presente en la película delgada de disolución rápida de la invención en un título que oscila entre aproximadamente  $1 \times 10^5$  y aproximadamente  $1 \times 10^8$  uff por dosis, y la mezcla de excipientes comprende o consiste en

15 - entre el 40 % y el 85 %, por ejemplo aproximadamente el 40, el 45, el 50, el 55, el 60, el 65, el 70, el 75, el 80 o el 85 % en peso de PVA,

20 - entre el 14 % y el 45 %, por ejemplo aproximadamente el 14, el 15, el 20, el 25, el 30, el 35, el 40, el 42 o el 45 % en peso de trehalosa,

- entre el 0,10 % y el 0,20 %, por ejemplo aproximadamente el 0,10, el 0,11, el 0,12, el 0,13, el 0,14, el 0,15, el 0,16, el 0,17, el 0,18, el 0,19 o el 0,20 % en peso de  $\text{ZnCl}_2$ ,

25 - entre el 0,5 % y el 5 %, preferiblemente entre el 0,75 % y el 4 %, entre el 1 % y el 3 %, por ejemplo aproximadamente el 1, el 1,5, el 1,7, el 1,75, el 1,8, el 1,85, el 1,9, el 2, el 2,5 o el 3 % en peso del ácido cítrico,

30 - entre el 1 % y el 3 %, por ejemplo aproximadamente el 1, el 1,5, el 1,7, el 1,75, el 1,8, el 1,85, el 1,9, el 2, el 2,5 o el 3 % en peso de un agente de tamponamiento seleccionado de tampón fosfato ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) o base de histidina,

- entre el 3 % y el 7,5 %, por ejemplo aproximadamente el 3, el 3,5, el 4, el 4,5, el 5, el 5,5, el 6, el 6,5, el 7 o el 7,5 % en peso de arginina y,

35 - entre el 1 % y el 4 %, por ejemplo aproximadamente el 1, el 1,5, el 2, el 2,5, el 3, el 3,4 o el 4 % en peso de glicina,

y dicha película delgada de disolución rápida comprende un antiácido que es  $\text{CaCO}_3$ , y la razón mezcla de excipientes: $\text{CaCO}_3$  (p/p) es de desde aproximadamente 1:3 hasta aproximadamente 1:1, por ejemplo aproximadamente 1:3, 1:2, 1:1,5 o 1:1.

40 De manera adecuada, la película delgada de disolución rápida de la invención tiene un **pH de superficie** de entre 5 y 9. En el presente documento, "pH de superficie" se refiere al pH en la superficie de la película delgada de disolución rápida. El experto en la técnica reconocerá métodos para medir el pH de superficie. Por ejemplo, puede colocarse un pequeño volumen de disolución acuosa (por ejemplo 20 – 25  $\mu\text{l}$ ) sobre la superficie de la película delgada de disolución rápida y dejarse en remojo durante aproximadamente 5 minutos. Luego se coloca papel de pH (tornasol) sobre la superficie humedecida y se lee el pH según la indicación del papel de pH.

45 De manera adecuada, el pH de superficie de la película delgada de disolución rápida debe estar próximo al pH fisiológico con el fin de evitar la irritación de la mucosa. El pH de superficie también debe ser tal como para no desestabilizar el virus. De manera adecuada, la película delgada de disolución rápida tiene un pH de superficie de entre 5 y 9, preferiblemente entre 5,5 y 8, más preferiblemente entre 6,0 y 7,5, por ejemplo 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 o 7,5.

La película delgada de disolución rápida de la invención es termoestable.

55 La **termoestabilidad** de una película delgada de disolución rápida de la invención puede evaluarse midiendo el título de virus de la composición en T0, almacenando la película delgada de disolución rápida a una temperatura determinada durante un período de tiempo determinado y midiendo la pérdida de título de virus después del almacenamiento. en relación con el título de virus en T0. Por tanto, tal como se usa en el presente documento, la estabilidad de una película delgada de disolución rápida se refiere a su capacidad para resistir una disminución del título viral a lo largo del tiempo, y la termoestabilidad se refiere a la capacidad de resistir una disminución del título viral debido a la exposición a temperaturas por encima de 2-8 °C (temperaturas no refrigeradas).

60 De manera adecuada, la película delgada de disolución rápida de la invención es estable durante 2 años a 20 °C, preferiblemente durante 2 años a 25 °C, más preferiblemente durante 2 años a 30 °C.

En una realización de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 0,5, más preferiblemente 0,4, más preferiblemente todavía 0,3 log<sub>10</sub> uff por dosis, después del almacenamiento durante 2 años a 20 °C. En una realización preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 0,5, más preferiblemente 0,4, más preferiblemente todavía 0,3 log<sub>10</sub> uff por dosis, después del almacenamiento durante 2 años a 25 °C. En una realización todavía más preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 0,5, más preferiblemente 0,4, más preferiblemente todavía 0,3 log<sub>10</sub> uff por dosis, después del almacenamiento durante 2 años a 30 °C.

Puede usarse un modelo predictivo, por ejemplo un modelo derivado del modelo de Arrhenius (Egan, W. y Schofield, T. (2009). Basic principles of stability. Biologicals, 37(6), 379-386.) basado en un esquema de degradación acelerada, para estimar la estabilidad a largo plazo a una temperatura dada T (por ejemplo, 20 °C, 25 °C o 30 °C, dependiendo del área geográfica a la que se destina la película delgada termoestable). Tales modelos se conocen bien en la técnica y se basan en la extrapolación de los datos de estabilidad obtenidos durante un período de tiempo más corto a temperaturas más altas para predecir la estabilidad a largo plazo a la temperatura T.

En una realización preferida, la película delgada de disolución rápida de la invención es estable durante al menos 5 semanas a 40 °C. En una realización de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 0,5 log<sub>10</sub> uff por dosis después del almacenamiento durante 5 semanas a 40 °C. En una realización preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 0,4 log<sub>10</sub> uff por dosis después del almacenamiento durante 5 semanas a 40 °C. En una realización más preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 0,3 log<sub>10</sub> uff por dosis después del almacenamiento durante 5 semanas a 40 °C. En una realización aún más preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 0,2 log<sub>10</sub> uff por dosis después del almacenamiento durante 5 semanas a 40 °C.

En otra realización preferida, la película delgada de disolución rápida de la invención es estable durante al menos 10 semanas a 40 °C. En una realización de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 1, de manera más adecuada de 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5 o 0,4 log<sub>10</sub> uff por dosis después del almacenamiento durante 10 semanas a 40 °C. En una realización preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 0,6 log<sub>10</sub> uff por dosis después del almacenamiento durante 10 semanas a 40 °C. En una realización más preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 0,5 log<sub>10</sub> uff por dosis después del almacenamiento durante 10 semanas a 40 °C. En una realización aún más preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 0,4 log<sub>10</sub> uff por dosis después del almacenamiento durante 10 semanas a 40 °C.

En otra realización, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 0,5 CCID<sub>50</sub> por dosis después del almacenamiento durante 5 semanas a 40 °C. En una realización preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 0,4 CCID<sub>50</sub> por dosis después del almacenamiento durante 5 semanas a 40 °C. En una realización más preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 0,3 CCID<sub>50</sub> por dosis después del almacenamiento durante 5 semanas a 40 °C. En una realización aún más preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 0,2 CCID<sub>50</sub> por dosis después del almacenamiento durante 5 semanas a 40 °C.

En otra realización de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 1, de manera más adecuada de 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5 o 0,4 CCID<sub>50</sub> por dosis después del almacenamiento durante 10 semanas a 40 °C. En una realización preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 0,6 CCID<sub>50</sub> por dosis después del almacenamiento durante 10 semanas a 40 °C. En una realización más preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 0,5 CCID<sub>50</sub> por dosis después del almacenamiento durante 10 semanas a 40 °C. En una realización aún más preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 0,4 CCID<sub>50</sub> por dosis después del almacenamiento durante 10 semanas a 40 °C.

La película delgada de disolución rápida de la invención no comprende ningún producto de origen animal.

La película delgada de disolución rápida de la invención no comprende gelatina.

La película delgada de disolución rápida de la invención no comprende albúmina.

- 5 En una realización preferida, la película delgada de disolución rápida de la invención es adecuada para la administración a un paciente humano. De manera adecuada, el paciente humano se selecciona de un adulto, un niño y un bebé.

- 10 En una realización preferida, la película delgada de disolución rápida de la invención es adecuada para la administración oral a un paciente humano. De manera adecuada, el paciente humano se selecciona de un adulto, un niño y un bebé.

- 15 En una realización preferida, la película delgada de disolución rápida de la invención tiene un **tiempo de disolución** de menos de 1 minuto, preferiblemente menos de 50 segundos. Tal como se usa en el presente documento, "tiempo de disolución" se refiere al tiempo requerido a una temperatura dada, de manera adecuada a 37 °C, para la película delgada se disuelva completamente cuando se pone en contacto con una superficie húmeda tal como agua o saliva. Se conocen en la técnica métodos para medir el tiempo de disolución. Por ejemplo, el tiempo de disolución de una película delgada de disolución rápida de la invención puede evaluarse usando el método explicado a continuación en el ejemplo 1(5).

- 20 En una realización preferida, la película delgada de disolución rápida de la invención tiene un **grosor** de menos de 500 µm, preferiblemente menos de 400 µm, más preferiblemente menos de 300 µm, más preferiblemente todavía, menos de 250 µm.

- 25 En una realización preferida, la película delgada de disolución rápida de la invención tiene una **superficie** de entre 300 y 600 mm<sup>2</sup>, preferiblemente entre 400 y 500 mm<sup>2</sup>.

- 30 Se prefieren películas delgadas de disolución rápida que sean flexibles, o parcialmente flexibles (flex./frag.) con respecto a películas delgadas de disolución rápida frágiles. La flexibilidad/fragilidad de una película delgada de disolución rápida puede evaluarse tal como se describe en el ejemplo 1(7) a continuación.

- 35 El **contenido de humedad** (o humedad residual) de una película delgada de disolución rápida puede medirse tal como se describe en el ejemplo 1(3) a continuación. Se cree que un menor contenido de humedad (humedad residual) está asociado con una mayor termoestabilidad de la película delgada de disolución rápida. Sin embargo, un contenido de humedad muy bajo puede hacer que la película delgada de disolución rápida sea más frágil. Se plantea la hipótesis de que excipientes tales como la trehalosa y los aminoácidos, en particular la glicina o la arginina, mejoran la termoestabilidad, permitiendo de ese modo un mayor contenido de humedad.

- 40 En una realización preferida, la película delgada de disolución rápida de la invención tiene un contenido de humedad de entre el 2 y el 10 % en peso, de manera más adecuada entre el 3 y el 8 %, por ejemplo, aproximadamente el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 % o el 8 % en peso. En una realización preferida, el contenido de humedad es menor de aproximadamente el 9, el 8, el 7, el 6 o el 5 % en peso.

- 45 De manera adecuada, cuando la película delgada de disolución rápida comprende un antiácido, la película delgada de disolución rápida de la invención tiene un contenido de humedad de entre el 2 y el 10 % en peso en un modo libre de antiácido, de manera más adecuada entre el 3 y el 8 %, por ejemplo, aproximadamente el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 % o el 8 % en peso en un modo libre de antiácido. En una realización preferida, el contenido de humedad es menor de aproximadamente el 9, el 8, el 7, el 6 o el 5 % en peso en un modo libre de antiácido.

- 50 Las películas delgadas de disolución rápida de la presente invención son adecuadas para su uso en terapia y en particular para su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades en un mamífero o un ave, y en particular en un ser humano.

- 55 En una realización preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, el virus es inmunogénico. Más preferiblemente, la película delgada de disolución rápida es adecuada para su uso como vacuna. Tal como se usa en el presente documento, una vacuna se refiere a una composición inmunogénica capaz, después de un régimen de dosificación adecuado en un sujeto, de provocar una respuesta inmune en ese sujeto específica para un antígeno contenido en la vacuna. Una vacuna reducirá la aparición o incidencia de infecciones y/o enfermedades (específicas del patógeno objetivo de la vacuna) en una población tratada de manera apropiada.

- 60 En un aspecto, la presente invención proporciona una película delgada de disolución rápida de la invención para su uso en terapia.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una película delgada de disolución rápida de la invención

para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad infecciosa en un sujeto.

De manera adecuada, en los usos terapéuticos de la invención, el sujeto es un mamífero o un ave. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano, por ejemplo un bebé, un niño o un adulto.

De manera adecuada, en los usos terapéuticos de la invención, la película delgada de disolución rápida es una película delgada oral para la administración oral a un ser humano, por ejemplo un bebé, un niño o un adulto.

De manera adecuada, en los usos terapéuticos de la invención, la película delgada de disolución rápida puede administrarse varias veces al sujeto a lo largo de un periodo de tiempo, por ejemplo dos veces o tres veces a lo largo de un periodo de uno a seis meses. Normalmente, cada dosis se administrará al sujeto en un intervalo de uno o dos meses.

De manera adecuada, en los usos terapéuticos de la invención, la enfermedad infecciosa está provocada por un rotavirus y la película delgada de disolución rápida comprende un rotavirus. En particular, la película delgada de disolución rápida de rotavirus puede usarse para prevenir y/o tratar la gastroenteritis asociada con rotavirus. En una realización preferida, la película delgada de disolución rápida de rotavirus es para administración a bebés humanos en riesgo de padecer una infección por un rotavirus. Más preferiblemente, la película delgada de disolución rápida de rotavirus es una película delgada oral para la administración oral a bebés humanos en riesgo de padecer una infección por un rotavirus.

De manera adecuada, el rotavirus está presente en la película delgada de disolución rápida de la invención en un título que oscila entre aproximadamente  $1 \times 10^5$  y aproximadamente  $1 \times 10^8$  uff por dosis (o entre aproximadamente  $1 \times 10^{5.5}$  y aproximadamente  $1 \times 10^{8.5}$  CCID50 por dosis), de manera más adecuada en un título que oscila entre aproximadamente  $10^5$  y aproximadamente  $10^6$  uff por dosis (o entre aproximadamente  $10^{5.5}$  y aproximadamente  $10^{6.5}$  CCID50 por dosis).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un **kit** que comprende la película delgada de disolución rápida de la invención en un envase estéril e instrucciones para el uso del kit.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método **para preparar una película delgada de disolución rápida termoestable que comprende un virus**, que comprende las etapas de:

a) preparar una disolución acuosa que comprende o consiste en

un virus,

uno o más polímero(s) soluble(s) en agua,

trehalosa,

un ion metálico,

un carboxilato, y

uno o más agentes de tamponamiento,

en el que dicha disolución acuosa no comprende ningún producto de origen animal ni gelatina,

b) ajustar el pH de la disolución acuosa a un valor comprendido entre 5 y 9,

c) aplicar la disolución acuosa sobre una superficie de secado,

d) secar la disolución acuosa para obtener una película delgada, y

e) retirar la película delgada seca de la superficie de secado,

obteniendo de ese modo dicha película delgada de disolución rápida termoestable.

La superficie de secado en la etapa c) normalmente es una superficie plana. La disolución acuosa puede aplicarse y dejar que se extienda buscando el nivel más bajo por gravedad sobre una superficie de secado horizontal nivelada. La disolución acuosa puede pulverizarse, pintarse o extenderse uniformemente con una cuchilla de fundición, por ejemplo, uniformemente sobre la superficie de secado. Alternativamente, la superficie de secado puede ser no plana y/u horizontal. Por ejemplo, la superficie de secado puede ser un tambor, o la mezcla húmeda puede extruirse verticalmente para secarse, por ejemplo, como una cinta. En cualquier caso, habitualmente se desea presentar una

- superficie grande en relación con el volumen, para acelerar el secado o permitir condiciones de secado menos estresantes. En una realización, la disolución acuosa se aplica a una superficie plana amplia y se expone al calor desde arriba (por ejemplo, corriente de gas caliente y/o luz IR) y/o desde abajo, calentándose la propia superficie de secado.
- 5 En la etapa d), después de la exposición al secado con calor, puede eliminarse la humedad adicional de la disolución acuosa mediante secado al vacío.
- 10 De manera adecuada, la duración y la temperatura de la etapa de secado d) se seleccionan de manera que se obtenga una película delgada de disolución rápida que tiene un contenido de humedad menor de aproximadamente el 10 % en peso. En una realización preferida, el contenido de humedad es menor de aproximadamente el 9, el 8, el 7, el 6 o el 5 % en peso.
- 15 De manera adecuada, el volumen de la disolución acuosa y el tamaño de la superficie de secado en la etapa c), y la duración y la temperatura de la etapa de secado d) se seleccionan de manera que se obtenga una película delgada de disolución rápida que tiene un grosor de menos de 500  $\mu\text{m}$ , preferiblemente menos de 400  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente menos de 300  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente todavía, menos de 250  $\mu\text{m}$ .
- 20 Normalmente, la temperatura de secado en la etapa d) es de desde aproximadamente 50 °C hasta aproximadamente 90 °C, por ejemplo desde aproximadamente 55 °C hasta aproximadamente 70 °C, por ejemplo 60 °C o 65 °C. De manera adecuada, la duración de la etapa de secado d) es de desde aproximadamente 30 hasta aproximadamente 180 minutos, por ejemplo desde aproximadamente 40 hasta aproximadamente 120 o desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 90 minutos, por ejemplo 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90 minutos.
- 25 En una realización, la etapa e) va seguida por una etapa f) de corte de la película delgada seca en películas delgadas de disolución rápida que tienen una superficie de entre 300 y 600  $\text{mm}^2$ , preferiblemente entre 400 y 500  $\text{mm}^2$ .
- 30 La disolución acuosa de la etapa a) comprende un virus. De manera adecuada, el virus se selecciona de un virus vivo, un virus vivo atenuado y un virus inactivado. En una realización, el virus es un virus reagrupado. En una realización, el virus es un virus vivo o vivo atenuado que se ha modificado genéticamente para codificar uno o más antígenos derivados de un patógeno diferente que provoca una respuesta inmunitaria protectora contra ese patógeno. De manera adecuada, el virus está presente en la disolución acuosa en un título que oscila entre aproximadamente  $1 \times 10^5$  y aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  uff por ml (o entre aproximadamente  $1 \times 10^{5.5}$  y aproximadamente  $1 \times 10^{11.5}$  CCID50 por ml), de manera más adecuada en un título que oscila entre aproximadamente  $10^5$  y aproximadamente  $10^{10}$  uff por ml (o entre aproximadamente  $10^{5.5}$  y aproximadamente  $10^{10.5}$  CCID50 por ml).
- 35 En una realización preferida, la disolución acuosa de la etapa a) comprende un virus que es un rotavirus. En una realización, la disolución acuosa comprende un rotavirus vivo atenuado, preferiblemente un rotavirus humano (HRV) vivo atenuado, más preferiblemente un HRV vivo atenuado seleccionado del grupo que comprende los serotipos G1, G2, G3, G4, G9, P[1] o P[8]. En una realización preferida, el rotavirus es un rotavirus humano vivo atenuado de tipo G1P[8]. La disolución acuosa puede comprender más de 1 serotipo de HRV y en una realización particular de la invención, la vacuna contra HRV comprende 5 o más serotipos de HRV (en particular G1, G2, G3, G4, G9, P1 o P8). En una realización, el rotavirus es un rotavirus humano vivo atenuado seleccionado de la cepa 89-12C2 depositada en la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852) con el número de registro VR 2272, su progenie, reagrupados y derivados inmunológicamente activos de los mismos, y la cepa P43 depositada en la ECACC (Colección Europea de Cultivos de Células Animales, Laboratorio de Investigación y Producción de Vacunas, Servicio de Laboratorio de Salud Pública, Centro de Investigación y Microbiología Aplicadas, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 OJG, Reino Unido) el 13 de agosto de 1999 con el número de registro ECACC 99081301, su progenie, reagrupados y derivados inmunológicamente activos de los mismos. En otra realización, la disolución acuosa comprende un rotavirus reagrupado, por ejemplo un rotavirus reagrupado humano-humano, rotavirus reagrupado bovino-humano o un rotavirus reagrupado mono Rhesus-humano. Un rotavirus para su inclusión en la disolución acuosa puede ser monovalente, es decir, que contiene una única cepa de rotavirus, o ser multivalente, es decir, que contiene al menos dos o más cepas de rotavirus. De manera adecuada, el rotavirus está presente en la disolución acuosa en un título que oscila entre aproximadamente  $1 \times 10^5$  y aproximadamente  $1 \times 10^8$  uff por ml (o entre aproximadamente  $1 \times 10^{5.5}$  y aproximadamente  $1 \times 10^{8.5}$  CCID50 por ml), de manera más adecuada con un título que oscila entre aproximadamente  $10^5$  y aproximadamente  $10^6$  uff por ml (o entre aproximadamente  $10^{5.5}$  y aproximadamente  $10^{6.5}$  CCID50 por ml).
- 55 La disolución acuosa de la etapa a) comprende uno o más polímero(s) soluble(s) en agua. Los polímeros solubles en agua adecuados incluyen poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), alginato, croscarmelosa sódica (también conocida como "carboximetilcelulosa de sodio" o "CMC de sodio") e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Los ejemplos de combinaciones de polímeros solubles en agua adecuadas incluyen PVA-PEG (90 %-10 % en peso) y PVA-HPMC (90 %-10 % en peso).
- 60

- De manera adecuada, la concentración del uno o más polímeros solubles en agua en la disolución acuosa de la etapa a) es de desde aproximadamente el 5 % hasta aproximadamente el 30 % (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 8 % hasta aproximadamente el 20 % (p/v), por ejemplo aproximadamente el 8, el 9, el 10, el 11, el 12, el 13, el 14, el 15, el 16, el 17, el 18, el 19 o el 20 % (p/v).
- 5 De manera adecuada, el uno o más polímeros solubles en agua en la disolución acuosa de la etapa a) comprenden PVA, de manera adecuada, al menos el 80 % PVA, de manera más adecuada al menos el 90 % PVA.
- 10 En una realización preferida, la disolución acuosa de la etapa a) comprende un solo polímero soluble en agua que es PVA, y la concentración de PVA en la disolución acuosa de la etapa a) es de desde aproximadamente el 5 % hasta aproximadamente el 30 % (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 8 % hasta aproximadamente el 20 % (p/v), por ejemplo aproximadamente el 8, el 9, el 10, el 11, el 12, el 13, el 14, el 15, el 16, el 17, el 18, el 19 o el 20 % (p/v).
- 15 La disolución acuosa de la etapa a) comprende trehalosa. En una realización preferida, la trehalosa es trehalosa dihidratada.
- De manera adecuada, la concentración de la trehalosa en la disolución acuosa de la etapa a) es de desde aproximadamente el 1 % hasta aproximadamente el 15 % (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 1,5 % hasta aproximadamente el 10 % (p/v), por ejemplo aproximadamente el 1,5, el 2, el 3, el 4, el 5, el 6, el 7, el 8, el 9 o el 10 % (p/v). En una realización preferida, la concentración de trehalosa (de manera adecuada, trehalosa dihidratada) en la disolución acuosa de la etapa a) es de desde aproximadamente el 1 % hasta aproximadamente el 15 % (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 1,5 % hasta aproximadamente el 10 % (p/v), por ejemplo aproximadamente el 1,5, el 2, el 3, el 4, el 5, el 6, el 7, el 8, el 9 o el 10 % (p/v).
- 20 De manera adecuada, la concentración del ion metálico en la disolución acuosa de la etapa a) es de desde aproximadamente el 0,005 % hasta aproximadamente el 0,5 % (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 0,10 %, desde aproximadamente el 0,015 hasta aproximadamente el 0,05 %, por ejemplo aproximadamente el 0,015, el 0,02, el 0,03, el 0,04 o el 0,05, el 3, el 4, el 5, el 6, el 7, el 8, el 9 o el 10 % mM (p/v). En una realización preferida, el ion metálico está en forma de  $\text{ZnCl}_2$  y la concentración de  $\text{ZnCl}_2$  en la disolución acuosa de la etapa a) es de desde aproximadamente el 0,005 % hasta aproximadamente el 0,5 % (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 0,10 %, desde aproximadamente el 0,015 hasta aproximadamente el 0,05 %, por ejemplo aproximadamente el 0,015, el 0,02, el 0,03, el 0,04 o el 0,05 % (p/v).
- 25 La disolución acuosa de la etapa a) comprende un ion metálico. Los iones metálicos adecuados incluyen  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ . En una realización, el ion metálico se selecciona de  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ . En una realización preferida, el ion metálico es  $\text{Zn}^{2+}$ . De manera adecuada, el ion metálico está en forma de una sal, preferiblemente una sal de cloruro. En una realización, el ion metálico está en forma de una sal de cloruro seleccionada de  $\text{ZnCl}_2$  y  $\text{MnCl}_2$ . En una realización preferida, el ion metálico está en forma de  $\text{ZnCl}_2$ .
- 30 De manera adecuada, la concentración del ion metálico o la sal en la disolución acuosa de la etapa a) es de desde aproximadamente el 0,005 % hasta aproximadamente el 0,5 % (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 0,10 %, desde aproximadamente el 0,015 hasta aproximadamente el 0,05 %, por ejemplo aproximadamente el 0,015, el 0,02, el 0,03, el 0,04 o el 0,05, el 3, el 4, el 5, el 6, el 7, el 8, el 9 o el 10 % mM (p/v). En una realización preferida, el ion metálico está en forma de  $\text{ZnCl}_2$  y la concentración de  $\text{ZnCl}_2$  en la disolución acuosa de la etapa a) es de desde aproximadamente el 0,005 % hasta aproximadamente el 0,5 % (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 0,10 %, desde aproximadamente el 0,015 hasta aproximadamente el 0,05 %, por ejemplo aproximadamente el 0,015, el 0,02, el 0,03, el 0,04 o el 0,05 % (p/v).
- 35 La disolución acuosa de la etapa a) comprende un carboxilato. En una realización preferida, el carboxilato es ácido cítrico.
- 40 De manera adecuada, la concentración del carboxilato en la disolución acuosa de la etapa a) es de desde aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 1 % (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 0,1 % hasta aproximadamente el 0,8 %, por ejemplo aproximadamente el 0,1, el 0,2, el 0,3, el 0,4, el 0,5, el 0,6, el 0,7 o el 0,8 % (p/v). En una realización preferida, el carboxilato es ácido cítrico y la concentración de ácido cítrico en la disolución acuosa de la etapa a) es de desde aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 1 % (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 0,1 % hasta aproximadamente el 0,8 %, por ejemplo aproximadamente el 0,1, el 0,2, el 0,3, el 0,4, el 0,5, el 0,6, el 0,7 o el 0,8 % (p/v).
- 45 La disolución acuosa de la etapa a) comprende uno o más agentes de tamponamiento. En una realización preferida, el agente de tamponamiento se selecciona de tampón fosfato ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) y base de histidina.
- 50 De manera adecuada, la concentración del/de los agente(s) de tamponamiento en la disolución acuosa de la etapa a) es de desde aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 1 % (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 0,1 % hasta aproximadamente el 0,8 %, por ejemplo aproximadamente el 0,1, el 0,2, el 0,3, el 0,4, el 0,5, el 0,6, el 0,7 o el 0,8 % (p/v). En una realización preferida, el agente de tamponamiento se selecciona de tampón fosfato y base de histidina y la concentración de tampón fosfato o base de histidina en la disolución acuosa de la etapa a) es de desde aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 1 % (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 0,1 % hasta aproximadamente el 0,8 %, por ejemplo aproximadamente el 0,1, el 0,2, el 0,3, el 0,4, el 0,5, el 0,6, el 0,7 o el 0,8 % (p/v).
- 55 De manera adecuada, la concentración del/de los agente(s) de tamponamiento en la disolución acuosa de la etapa a) es de desde aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 1 % (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 0,1 % hasta aproximadamente el 0,8 %, por ejemplo aproximadamente el 0,1, el 0,2, el 0,3, el 0,4, el 0,5, el 0,6, el 0,7 o el 0,8 % (p/v). En una realización preferida, el agente de tamponamiento se selecciona de tampón fosfato y base de histidina y la concentración de tampón fosfato o base de histidina en la disolución acuosa de la etapa a) es de desde aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 1 % (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 0,1 % hasta aproximadamente el 0,8 %, por ejemplo aproximadamente el 0,1, el 0,2, el 0,3, el 0,4, el 0,5, el 0,6, el 0,7 o el 0,8 % (p/v).
- 60

En una realización del método de la invención, la disolución acuosa de la etapa a) comprende además uno o más aminoácidos. En una realización preferida, el uno o los aminoácidos se seleccionan de glicina, arginina, prolina, y combinaciones de los mismos. En una realización más preferida, la mezcla de excipientes comprende glicina, arginina o ambas.

5

De manera adecuada, la concentración de aminoácido(s) en la disolución acuosa de la etapa a) es de desde aproximadamente el 0 hasta aproximadamente el 2 % (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 1,5 %, desde aproximadamente el 0,015 % hasta aproximadamente el 1,2 %, por ejemplo aproximadamente el 0,015, el 0,02, el 0,03, el 0,04, el 0,05, el 0,06, el 0,07, el 0,08, el 0,09, el 0,1, el 0,2, el 0,3, el 0,4, el 0,5, el 0,6, el 0,7, el 0,8, el 0,9, el 1,0, el 1,1 o el 1,2 % (p/v).

10

En una realización preferida, la disolución acuosa de la etapa a) comprende glicina, arginina o ambas. En una realización preferida, la disolución acuosa de la etapa a) comprende glicina a una concentración de desde aproximadamente el 0 hasta aproximadamente el 1 % (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 0,005 % hasta aproximadamente el 1 %, desde aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 0,5 %, por ejemplo aproximadamente el 0,01, el 0,015, el 0,02, el 0,025, el 0,03, el 0,04, el 0,05, el 0,06, el 0,07, el 0,08, el 0,09, el 0,10, el 0,20, el 0,30, el 0,40 o el 0,50 % (p/v), y arginina a una concentración de desde aproximadamente el 0 hasta aproximadamente el 2 % (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 1,5 %, desde aproximadamente el 0,02 % hasta aproximadamente el 1 %, por ejemplo aproximadamente el 0,02, el 0,03, el 0,04, el 0,05, el 0,06, el 0,07, el 0,08, el 0,09, el 0,10, el 0,20, el 0,30, el 0,40, el 0,50, el 0,60, el 0,70, el 0,80, el 0,90 o el 1 % (p/v).

15

20

En una realización del método de la invención, se añade un **antiácido** a la disolución acuosa de la etapa a). En una realización preferida, el antiácido permite que el pH permanezca por encima de 4 en la prueba de BBR durante al menos 10 minutos, preferiblemente durante al menos 15 minutos. Los antiácidos adecuados incluyen acetato alcalino, citrato, succinato, tartrato, maleato, lactato, bicarbonato de amonio, fosfato, óxido de magnesio, óxido de aluminio, hidróxido de aluminio con hidróxido de magnesio, gel de carbonato de aluminio, carbonato de calcio, bicarbonato de sodio, hidrotalcita, sucralfato, subsalicilato de bismuto y/o similares. En una realización preferida, el antiácido es carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>). En una realización preferida del método de la invención, la disolución acuosa de la etapa a) comprende un virus, por ejemplo un rotavirus, y comprende además un antiácido que es carbonato de calcio.

25

30

De manera adecuada, la disolución acuosa de la etapa a) comprende un antiácido en una concentración de desde aproximadamente el 10 hasta aproximadamente el 50 % (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 15 hasta el 40 % (p/v), por ejemplo aproximadamente el 15, el 20, el 25, el 30, el 35 o el 40 % (p/v). En una realización preferida, el antiácido es carbonato de calcio y la concentración de carbonato de calcio en la disolución acuosa de la etapa a) es de desde aproximadamente el 10 hasta aproximadamente el 50 % (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 15 hasta el 40 % (p/v), por ejemplo aproximadamente el 15, el 20, el 25, el 30, el 35 o el 40 % (p/v).

35

En la etapa b), el pH se ajusta a un valor comprendido entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9, preferiblemente entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8, por ejemplo aproximadamente 6, 6,5, 7, 7,5 u 8. De manera adecuada, se usa KOH y/HCl para ajustar el pH en la etapa b).

40

La disolución acuosa de la etapa a) no comprende ningún producto de origen animal, tal como gelatina o albúmina.

45

En un aspecto adicional, la invención proporciona una película delgada de disolución rápida termoestable de la invención que puede obtenerse mediante el método de la invención.

En una realización preferida de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 1, de manera más adecuada de 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3 log<sub>10</sub> uff por dosis después del almacenamiento durante 10 semanas a 40 °C. En otra realización de la película delgada de disolución rápida de la invención, la película delgada de disolución rápida tiene una pérdida máxima de título de virus de 1, de manera más adecuada de 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3 CCID<sub>50</sub> por dosis después del almacenamiento durante 10 semanas a 40 °C.

50

Los inventores pretenden que los términos “que comprende”, “comprender” y “comprende” en el presente documento puedan sustituirse opcionalmente por los términos “que consiste en”, “consistir en” y “consiste en”, respectivamente, en cualquier caso.

55

El término “aproximadamente” en relación con un valor numérico x significa  $x \pm$  el 5 % o el 10 %.

60

Ahora se describirá adicionalmente la invención haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

## EJEMPLOS

**Ejemplo 1 - Métodos**

(1) **Fabricación de películas delgadas orales (OTF) de rotavirus** – Se formularon asépticamente disoluciones madre acuosas de excipientes con el pH ajustado a 6,5 con KOH 10 N. También se preparó un volumen igual de una disolución madre de polímero al 25 % (p/v). Estas disoluciones madre de excipientes se combinaron asépticamente en primer lugar con polvo de  $\text{CaCO}_3$  (tamaño de partícula promedio 30 micrómetros) para lograr una carga del 24,3 % en peso en la mezcla húmeda de película final mezclándose en una placa con agitación magnética a una velocidad de aproximadamente 100 rpm durante 5-10 minutos, lo que dispersó el polvo uniformemente. Luego se añadió asépticamente a la mezcla la disolución madre de polímero al 25% (p/v) y se continuó mezclando durante otros 10-15 minutos hasta que quedó homogéneo. Se usaron KOH 10 N o HCl 6 N para ajustar el pH de la mezcla húmeda de película final a un valor de entre 6,5 y 7,5. Por último, se añadió asépticamente a la mezcla una vacuna concentrada a granel 10x contra rotavirus y se agitó suavemente a una velocidad de 80-100 rpm durante 5 minutos adicionales. La mezcla húmeda de película se desgaseificó dejándola reposar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. La mezcla (PET) (Kinmar PET, K-Mac Plastic) usando un aplicador manual (BYK-Gardner) a una profundidad de 30 mil. Las películas húmedas se secaron durante 35 a 90 minutos a 65 °C en un horno de convección (VWR, modelo 1350FM).

(2) **Capacidad de antiácido - Pruebas Baby Rossett-Rice (BBR)** - El sistema usado para las pruebas de BBR se representa en la figura 1. Se añadió agua para inyección (WFI) a la formulación en un vaso de precipitados (50 ml) para obtener un volumen de líquido final de diez (10) ml. Luego se instaló el vaso de precipitados en un baño de agua ajustado para obtener 37 °C dentro del vaso de precipitados. Se añadió la muestra de antiácido al vaso de precipitados. La medición del valor del pH representa el "pH inicial". Luego se añadieron de una vez 4 ml de HCl 0,1 N y al mismo tiempo se pusieron en marcha el reloj y la bomba. La bomba añadió de manera continua 0,5 ml/min de HCl 0,1 N. Se registraron los valores de pH a lo largo del tiempo, hasta obtener un pH 4.

(3) **Pruebas de humedad residual (o contenido de humedad)** - El objetivo de esta prueba era medir cantidades traza de agua dentro de la OTF mediante el procedimiento de titulación colorimétrica usando un disolvente orgánico (Hydranal Coulamat AG) para extraer agua de la muestra. Se colocó una cantidad conocida de muestra de OTF e Hydranal en un vial de vidrio para suero. Se dejó que el disolvente/película se mezclaran durante treinta (30) minutos para extraer agua de la muestra. Luego se inyectó una cantidad conocida de Hydranal (extraído de la muestra) en el titulador Karl Fisher para medir la cantidad de agua presente en la muestra. Luego se calculó el contenido de humedad (MC) total de la OTF basándose en la fracción de masa calculada del disolvente, los sólidos en las muestras y el disolvente en la muestra. Para determinar el contenido de humedad en un modo libre de  $\text{CaCO}_3$ , el contenido de humedad total de la OTF se dividió entre la fracción de masa de componentes distintos de  $\text{CaCO}_3$  en la película seca.

**(4) Pruebas de infectividad**

**Reconstitución de OTF:** Basándose en el peso de la OTF, se determinó mediante cálculo el volumen de reconstitución para alcanzar una concentración final de rotavirus de  $6,3 \log_{10}$  CCID<sub>50</sub>/ml (correspondiente a la formulación actual de Rotarix Iyo que contiene  $6,5 \log_{10}$  CCID<sub>50</sub> por 1,5 ml de vacuna oral). Luego se insertó cada OTF en un vial de 4,5 ml que contenía DMEM o WFI en su volumen de reconstitución. La muestra se cortó en 3 trozos con unas tijeras y todos los trozos se insertaron con unas pinzas en el vial.

**Prueba de infectividad in vitro:** Después de la activación viral por tripsina, se añadieron diluciones de muestra óptimas a células MA-104 puestas previamente en cultivo durante 16-18 horas a  $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  para permitir un ciclo de replicación viral. Después de la incubación, se detectaron las células infectadas usando el anticuerpo monoclonal 9F6 específico de rotavirus VP4, cuya unión se reveló usando un anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP seguido por incubación con el reactivo Trueblue. El título viral se obtuvo contando los puntos azules y se expresó como  $\log_{10}$  UFF/dosis o /ml. El punto de corte se fijó en  $3,9 \log_{10}$  uff/ml (límite de detección). A los efectos del análisis, todos los valores por debajo del punto de corte se establecieron arbitrariamente en  $3,6 \log_{10}$  uff/ml.

(5) **Tiempo de disolución** - El método para medir el tiempo de disolución se adaptó del capítulo <711> de la USP (Farmacopea de los Estados Unidos). Brevemente, se usó un aparato de paletas tipo 2 para medir el tiempo de disolución de OTF. Brevemente, un baño de agua mantuvo la temperatura dentro del recipiente de medios a 37 °C. Esta temperatura se controló mediante un dispositivo de calentamiento con una sonda de temperatura colocada dentro del recipiente. La distancia entre la parte inferior de la pala del impulsor y la parte inferior interior del recipiente fue de aproximadamente 25 mm y se mantuvo fija durante las pruebas. El recipiente era cilíndrico con una parte inferior plana y una capacidad volumétrica de 1 litro. Se usaron aproximadamente 300 ml de medios (PBS (1x): NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  10 mM - isotónico) para la prueba de disolución. La posición del árbol estaba a 2 mm del eje vertical del recipiente; la rotación fue suave sin oscilación significativa durante las pruebas. Una "plomada" en espiral mantuvo la OTF en su sitio en la parte inferior del recipiente de medios durante la prueba. La velocidad de rotación de aproximadamente 65 rpm se controló mediante un controlador de agitador.

**(6) pH de superficie** - Se colocó un pequeño volumen de disolución acuosa (20 - 25 ul) sobre la OTF, dejando en remojo durante 5 minutos antes de colocar papel de pH (tornasol) sobre la superficie humedecida. El pH se leyó según la indicación del papel de pH.

5 **(7) Flexibilidad / fragilidad** - Se seccionó una película de 20 mm x 20 mm de la tira de película y luego se dobló la película seccionada de arriba a abajo usando pinzas para determinar la flexibilidad y fragilidad de la muestra. Si la muestra no se rompía en dos pedazos sin grietas visibles, se consideraba una película flexible. Si se observaba una grieta pero no se observaba separación, esto se consideró flexible/frágil. Si la muestra de película se rompía en dos trozos, se consideró frágil.

10 **(8) Métodos estadísticos** - Se usó el software SAS 9.4 para evaluar las pendientes (decrecimiento por unidad de tiempo) a través de un modelo lineal simple usando el log10 del título transformado que se supone está distribuido normalmente con varianza desconocida con el día como factor de efectos fijos. La pérdida media para cada punto de tiempo con IC del 95% se deriva de la diferencia de medias por mínimos cuadrados en el modelo con el punto de tiempo como covariable.

15

**Ejemplo 2: Termoestabilidad de formulaciones de OTF de rotavirus con diferentes iones divalentes (ejemplo comparativo)**

20 Se prepararon los lotes de OTF P n.º 44 a P n.º 50 tal como se describe en el ejemplo 1(1). Antes de combinar con la disolución madre de CaCO<sub>3</sub> y PVA (PVA al 25 % p/v), la disolución madre de excipientes comprendía sacarosa al 20 % (p/v), ácido cítrico 41,6 mM, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, y opcionalmente uno o más (dos) iones divalentes:

- Formulación P n.º 44: ninguna

25 - Formulación P n.º 45: ZnCl<sub>2</sub> 4 mM

- Formulación P n.º 46: CaCl<sub>2</sub> 4 mM

30 - Formulación P n.º 47: ZnCl<sub>2</sub> 4 mM / CaCl<sub>2</sub> 4 mM

- Formulación P n.º 48: MgCl<sub>2</sub> 4 mM

- Formulación P n.º 49: MnCl<sub>2</sub> 4 mM

35 Formulación P n.º 50: NaCl 50 mM

40 Se ajustó el pH final de cada disolución de mezcla húmeda a 6,5. El tiempo de secado se estableció en 90 minutos para todos los lotes. Después del secado, cada lote de OTF comprendía aproximadamente el 59 % (p/p) de CaCO<sub>3</sub> y aproximadamente el 41 % (p/p) de la mezcla combinada de excipiente/polímero, y la mezcla de excipiente/polímero (en un modo libre de CaCO<sub>3</sub>) consistía en el 53,2-53,5 % (p/p) de poli(alcohol vinílico) (PVA), el 42,5-42,8 % (p/p) de sacarosa, el 1,9 % (p/p) de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, el 1,9 % (p/p) de ácido cítrico y el 0,12-0,62 % iones divalentes (cuando estaban presentes).

45 Se evaluó la termoestabilidad de cada lote de OTF determinando el título viral en los puntos de tiempo T0 4 °C, T5 días 45 °C, T5 días 40 °C, T14 días 40 °C y T19 días 40 °C tal como se describe en el ejemplo 1(4) anterior. Se analizaron cuatro muestras en cada punto de tiempo. También se analizó Rotarix Iyo (vacuna comercial) como control. Los resultados se presentan en la figura 2.

50 **Ejemplo 3: Modelo para estimar la estabilidad a largo plazo basándose en el modelo de Arrhenius (ejemplo comparativo)**

55 Se usó una formulación de base P n.º 51 para el modelo de Arrhenius. Se preparó el lote de OTF P n.º 51 tal como se describe en el ejemplo 1(1). Antes de combinar con la disolución madre de CaCO<sub>3</sub> y PVA (PVA al 25 % p/v), la disolución madre de excipientes comprendía sacarosa al 20 % (p/v), ácido cítrico 41,6 mM y K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM. Se ajustó el pH final de la disolución de mezcla húmeda a 6,5. El tiempo de secado se estableció en 90 minutos. Después del secado, el lote de OTF P n.º 51 comprendía aproximadamente el 59 % (p/p) de CaCO<sub>3</sub> y aproximadamente el 41 % (p/p) de la mezcla combinada de excipiente/polímero, y la mezcla de excipiente/polímero (en un modo libre de CaCO<sub>3</sub>) consistía en el 53,5 % (p/p) de poli(alcohol vinílico) (PVA), el 42,8 % (p/p) de sacarosa, el 1,9 % (p/p) de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y el 1,9 % (p/p) de ácido cítrico.

60

Se evaluó la termoestabilidad del lote de OTF P n.º 51 determinando el título viral en los puntos de tiempo T0 4 °C, T70 días 30 °C, T26 días 40 °C y T5 días 45 °C tal como se describe en el ejemplo 1(4) anterior. Se analizaron cuatro muestras en cada punto de tiempo. Los resultados individuales se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1 - Datos de termoestabilidad del lote de OTF P n.º 51

| ID              | Temp. | Punto de tiempo (días) | Título_viral_log_uff_por_ml |
|-----------------|-------|------------------------|-----------------------------|
| OTF P n.º 51 30 | 40 °C | 26                     | 5,4485                      |
| OTF P n.º 51 15 | 40 °C | 26                     | 5,0603                      |
| OTF P n.º 51 16 | 40 °C | 26                     | 5,1913                      |
| OTF P n.º 51 23 | 40 °C | 26                     | 5,4832                      |
| OTF P n.º 51 12 | 45 °C | 5                      | 5,7521                      |
| OTF P n.º 51 3  | 45 °C | 5                      | 5,6918                      |
| OTF P n.º 51 8  | 45 °C | 5                      | 5,7660                      |
| OTF P n.º 51 29 | 45 °C | 5                      | 5,6618                      |
| OTF P n.º 51 31 | 30 °C | 70                     | 5,6703                      |
| OTF P n.º 51 19 | 30 °C | 70                     | 5,7122                      |
| OTF P n.º 51 9  | 30 °C | 70                     | 5,7309                      |
| OTF P n.º 51 27 | 30 °C | 70                     | 5,7267                      |
| OTF P n.º 51 7  | 4 °C  | T0                     | 5,9139                      |
| OTF P n.º 51 28 | 4 °C  | T0                     | 5,8970                      |
| OTF P n.º 51 10 | 4 °C  | T0                     | 5,9146                      |
| OTF P n.º 51 20 | 4 °C  | T0                     | 5,8038                      |

Basándose en la suposición de que el modelo cinético plausible más simple para la degradación de la vacuna sería uno basado en la cinética de primer orden, se estimó la estimación de mínimos cuadrados para la tasa (o pendiente) de degradación para cada combinación de punto de tiempo y temperatura usando un modelo de regresión lineal simple (con ordenada en el origen) en el log<sub>10</sub> título transformado con el día como factor de efectos fijos (proc glm SAS 9.4).

Se ha aplicado el siguiente modelo de efectos fijos para cada temperatura.

$$Potencia = \log_{10}(Y) = \beta_0 + \beta_{1T}Día + \varepsilon$$

donde Y es el vector de mediciones de títulos virales (media uff/ml)

$\beta_0$  = media log título en el Día 0

$\beta_{1T}$  = pendiente o tasa de degradación de log de título por unidad de tiempo (día) a temperatura T

$\varepsilon$  vector de error aleatorio, independiente, idéntica y normalmente distribuido con una media de cero y una desviación estándar  $\sigma^2$

Una vez estimadas las tasas de degradación en cada temperatura T (véase la tabla 2), y suponiendo que la pérdida en el log de título sigue siendo lineal, se obtuvieron estimaciones de los parámetros desconocidos en la ecuación de Arrhenius ajustando un modelo de regresión lineal al logaritmo de las tasas de degradación estimadas ( $\beta_{1T}$ ) ( $K_T$  en la ecuación de Arrhenius con la inversa de temperatura (en Kelvin) como factor fijo). Este modelo supone que la tasa de degradación  $K_T$  es función de la temperatura T: una temperatura T más alta conduce a una mayor  $K_T$  o a una degradación más rápida.

Tabla 2 - Tasa de degradación por día para cada condición de temperatura

| Temperatura en °C                                                                                          | Temperatura en °K | Tasa de degradación por log uff por día (-<br>$\beta_1$ )= $K_T$ |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------|
| 30 °C                                                                                                      | 303               | 0,00246                                                          |
| 40 °C                                                                                                      | 313               | 0,02256                                                          |
| 45 °C                                                                                                      | 318               | 0,03288                                                          |
| Nota: la ordenada en el origen ( $\beta_0$ ) es 5,8823. Temperatura en Kelvin=Temperatura en Celsius + 273 |                   |                                                                  |

Las estimaciones de los parámetros desconocidos en la ecuación de Arrhenius se obtuvieron del siguiente modelo lineal

$$\ln(K_T) = \ln(A) + (\alpha) * (1/T)$$

5

donde

- $K_T$  es la tasa de degradación (en  $\log_{10}$  título viral por día) a temperatura T (en °K) obtenida a partir de la regresión lineal en el  $\log_{10}$  título a temperatura T
- $\ln(A)$  es la ordenada en el origen
- $(\alpha)$  es la pendiente de la recta de regresión de  $\ln(K_T)$  frente a  $1/T$
- T es la temperatura (en °K).

15

La ilustración de las tasas de degradación por la temperatura se muestra en la figura 3.

20

**Ejemplo 4 - Termoestabilidad de las formulaciones de OTF de rotavirus con diferentes excipientes (ejemplo comparativo)**

Se prepararon los lotes de OTF P n.º 58 a P n.º 70 tal como se describe en el ejemplo 1(1). Antes de combinar con la disolución madre de  $\text{CaCO}_3$  y PVA (PVA al 25 % p/v), la disolución madre de excipientes comprendía sacarosa al 20 % (p/v), ácido cítrico 41,6 mM,  $\text{K}_2\text{PO}_4$  50 mM,  $\text{ZnCl}_2$  4 mM y opcionalmente un excipiente adicional tal como sigue:

25

- Formulación P n.º 58: ninguna
- Formulación P n.º 59: histidina 25 mM
- Formulación P n.º 60: arginina 25 mM
- Formulación P n.º 61: metionina 25 mM
- Formulación P n.º 62: prolina 25 mM
- Formulación P n.º 63: hidroxiprolina 25 mM
- Formulación P n.º 64: ninguna
- Formulación P n.º 65: glicina 25 mM
- Formulación P n.º 66: ácido glutámico 25 mM
- Formulación P n.º 67: travasol al 0,4 % (p/v) (en base sólida)
- Formulación P n.º 68: alanina 25 mM
- Formulación P n.º 69: rHSA al 0,2 % (p/v)
- Formulación P n.º 70: sorbitol al 0,5 % (p/v)

45

50

Travasol es una mezcla al 10 % (p/v) de aminoácidos que comprende:

55

mg/100 ml

|          |      |
|----------|------|
| alanina  | 2070 |
| glicina  | 1030 |
| arginina | 1150 |
| prolina  | 680  |
| leucina  | 730  |
| valina   | 580  |

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| serina                | 500    |
| isoleucina            | 600    |
| treonina              | 420    |
| fenilalanina          | 560    |
| clorhidrato de lisina | 580    |
| histidina             | 480    |
| metionina             | 400    |
| triptófano            | 180    |
| tirosina              | 40     |
| acetato               | 88 mEq |
| cloruro               | 40 mEq |

Se ajustó el pH final de cada disolución de mezcla húmeda a 6,5. El tiempo de secado se estableció en 90 minutos para todos los lotes. Después del secado, cada lote de OTF comprendía aproximadamente el 59 % (p/p) de CaCO<sub>3</sub> y aproximadamente el 41 % (p/p) de la mezcla combinada de excipiente/polímero (PVA).

Entonces se evaluó la termoestabilidad de cada lote de OTF determinando el título viral en los puntos de tiempo T0 4 °C, T5 días 40 °C, T14 días 40 °C, T20 días 40 °C y T14 días 45 °C tal como se describe en el ejemplo 1(4) anterior. Se analizaron cuatro muestras en cada punto de tiempo. También se analizó Rotarix Iyo (vacuna comercial) como control. Las formulaciones P n.º 58 to P n.º 63 se analizaron en una primera ronda, y las formulaciones P n.º 64 to P n.º 70 se analizaron en una segunda ronda. Los resultados se presentan en la figura 4.

#### **Ejemplo 5 - Termoestabilidad de las formulaciones de OTF de rotavirus con diferentes excipientes**

Se prepararon los lotes de OTF P n.º 71 a P n.º 77 tal como se describe en el ejemplo 1(1). Antes de combinar con la disolución madre de CaCO<sub>3</sub> y PVA (PVA al 25 % p/v), la disolución madre de excipientes comprendía sacarosa al 20 % (p/v) (con la excepción de P n.º 74), ácido cítrico 41,6 mM, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, ZnCl<sub>2</sub> 4 mM y opcionalmente un excipiente adicional tal como sigue:

- Formulación P n.º 71: ninguna
- Formulación P n.º 72: fenilalanina 25 mM
- Formulación P n.º 73: glicerol al 0,5 % (p/v)
- Formulación P n.º 74: trehalosa dihidratada al 20 % (p/v) (en sustitución de sacarosa)
- Formulación P n.º 75: TPGS al 0,1 % (p/v) (succinato de D- $\alpha$ -Tocoferol-polietilenglicol 100, una forma soluble en agua de vitamina E)
- Formulación P n.º 76: polisorbato 20 al 0,1 % (p/v)
- Formulación P n.º 77: Pluronic F68 al 0,1 % (p/v)

La formulación P n.º 74 es según la invención, mientras que las formulaciones P n.º 71, P n.º 72, P n.º 73, P n.º 75, P n.º 76 y P n.º 77 son ejemplos comparativos.

Se ajustó el pH final de cada disolución de mezcla húmeda a 6,5. El tiempo de secado se estableció en 90 minutos para todos los lotes. Después del secado, cada lote de OTF comprendía aproximadamente el 59 % (p/p) de CaCO<sub>3</sub> y aproximadamente el 41 % (p/p) de la mezcla de excipiente/polímero (PVA).

Se evaluó la termoestabilidad de cada lote de OTF determinando el título viral en los puntos de tiempo T0 4 °C, T5 días 40 °C, T14 días 40 °C, T20 días 40 °C y T14 días 45 °C tal como se describe en el ejemplo 1(4) anterior. Se analizaron cuatro muestras en cada punto de tiempo. También se analizó Rotarix Iyo (vacuna comercial) como control. Los resultados se presentan en la figura 5.

#### **Ejemplo 6 - Termoestabilidad de las formulaciones de OTF de rotavirus con diferente tampones y pH (ejemplo comparativo)**

Se prepararon los lotes de OTF P n.º 84 a P n.º 89 tal como se describe en el ejemplo 1(1). Antes de combinar con la

disolución madre de  $\text{CaCO}_3$  y PVA (PVA al 25 % p/v), la disolución madre de excipientes comprendía sacarosa al 20 % (p/v), ácido cítrico 41,6 mM,  $\text{ZnCl}_2$  4 mM y un tampón seleccionado de tampón  $\text{K}_2\text{PO}_4$  50 mM e histidina 50 mM y se ajustó el pH tal como sigue:

- 5 - Formulación P n.º 84: tampón  $\text{K}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 6,5
- Formulación P n.º 85: tampón  $\text{K}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7
- Formulación P n.º 86: tampón  $\text{K}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7,5
- 10 - Formulación P n.º 87: tampón histidina 50 mM, pH 6,5
- Formulación P n.º 88: tampón histidina 50 mM, pH 7
- 15 - Formulación P n.º 89: tampón histidina 50 mM, pH 7,5

El tiempo de secado se estableció en 90 minutos para todos los lotes. Después del secado, cada lote de OTF comprendía aproximadamente el 59 % (p/p) de  $\text{CaCO}_3$  y aproximadamente el 41 % (p/p) de la mezcla de excipiente/polímero (PVA).

- 20 Se evaluó la termoestabilidad de cada lote de OTF determinando el título viral en los puntos de tiempo T0 4 °C, T2 semanas 40 °C, T3 semanas 40 °C y T5 semanas 40 °C tal como se describe en el ejemplo 1(4) anterior. Se analizaron cuatro muestras en cada punto de tiempo. Los resultados se presentan en la figura 6.

#### 25 **Ejemplo 7 - Termoestabilidad de las formulaciones de OTF de rotavirus con diferentes polímeros (ejemplo comparativo)**

- 30 Se prepararon los lotes de OTF P n.º 94, P n.º 95, P n.º 97 y P n.º 100 tal como se describe en el ejemplo 1(1). Antes de combinar con disolución madre de  $\text{CaCO}_3$  y polímero (polímero al 25 % p/v), la disolución de excipiente comprendía sacarosa al 20 % (p/v), ácido cítrico 41,6 mM,  $\text{K}_2\text{PO}_4$  50 mM,  $\text{ZnCl}_2$  4 mM. Las disoluciones madre de polímero al 25 % en peso tenían la siguiente composición:

- Formulación P n.º 94: PVA / PEG400 (90 %/10 % p/p)
- 35 - Formulación P n.º 95: PVA / HPMC (90 %/10 % p/p)
- Formulación P n.º 97: PVA (100 %)
- Formulación P n.º 100: PVP / PEG400 (90 %/10 % p/p)
- 40

- Se ajustó el pH final de cada disolución de mezcla húmeda a 6,5. El tiempo de secado se estableció en 90 minutos para las formulaciones P n.º 94 y P n.º 97, 65 minutos para P n.º 95 y 35 minutos para P n.º 100. Después del secado, cada lote de OTF comprendía aproximadamente el 59 % (p/p) de  $\text{CaCO}_3$  y aproximadamente el 41 % (p/p) de mezcla de excipiente/polímero. Se evaluó la termoestabilidad de cada lote de OTF determinando el título viral en los puntos de tiempo T0 4 °C, T2 semanas 40 °C, T3 semanas 40 °C, T5 semanas 40 °C y T6 semanas 40 °C tal como se describe en el ejemplo 1(4) anterior. Se analizaron cuatro muestras en cada punto de tiempo. También se analizó Rotarix Iyo (vacuna comercial) como control. Los resultados se presentan en la figura 7.
- 45

#### 50 **Ejemplo 8 - Termoestabilidad de las formulaciones de OTF de rotavirus, form. 1 a form. 8**

- Se analizaron veinticuatro lotes de OTF de rotavirus (P n.º 111-P n.º 134) basándose en ocho formulaciones diferentes (form. 1 a form. 8) en 3 rondas. Se prepararon los lotes de OTF P n.º 111-P n.º 134 tal como se describe en el ejemplo 1(1). El tiempo de secado fue de 90 minutos para todos los lotes. La composición de excipiente (en un modo libre de  $\text{CaCO}_3$ ) de cada formulación de OTF se seca se presenta en la tabla 3. Antes de combinar con la disolución madre de  $\text{CaCO}_3$  y PVA (PVA al 25 % p/v), cada disolución madre de excipiente comprendía ácido cítrico 41,6 mM,  $\text{ZnCl}_2$  4 mM, trehalosa dihidratada o sacarosa al 20 % (p/v), tampón fosfato ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) o histidina 50 mM, y opcionalmente 25 mM de o bien arginina, prolina, o bien glicina o Travasol al 0,4 % (p/v) (basado en el contenido de sólidos).
- 55

- Se ajustó el pH final de cada disolución de mezcla húmeda a 7 para todos los lotes con la excepción de los lotes P n.º 118, P n.º 120 y P n.º 131 (form. 8) para el que el pH se ajustó a 7,5. El tiempo de secado se estableció en 90 minutos para todos los lotes.
- 60

Una vez seco, cada lote de OTF comprendía aproximadamente el 59 % (p/p) de  $\text{CaCO}_3$  y aproximadamente el 41 % (p/p) de mezcla combinada de excipiente/polímero (PVA). Para cada lote de OTF, se presenta la cantidad de mezcla

de excipientes en la tabla 3.

**Tabla 3** – Composición de excipientes de los lotes de formulación de OTF secos P n.º 111 a P n.º 134

| Lote de OTF                     | P n.º 111, P n.º 123, P n.º 134 (Form1) | P n.º 112, P n.º 121, P n.º 128 (Form2) | P n.º 113, P n.º 125, P n.º 130 (Form3) | P n.º 114, P n.º 119, P n.º 133 (Form4) | P n.º 115, P n.º 126, P n.º 129 (Form5) | P n.º 116, P n.º 124, P n.º 132 (Form6) | P n.º 117, P n.º 122, P n.º 127 (Form7) | P n.º 118, P n.º 120, P n.º 131 (Form8) |
|---------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
|                                 | % en peso sin CaCO <sub>3</sub>         |                                         |                                         |                                         |                                         |                                         |                                         |                                         |
| PVA (Mowiol 8-88)               | 53,53                                   | 53,42                                   | 52,92                                   | 53,09                                   | 52,96                                   | 53,20                                   | 53,42                                   | 53,53                                   |
| Sacarosa                        | 42,82                                   | 0,00                                    | 42,34                                   | 42,47                                   | 42,37                                   | 42,56                                   | 42,73                                   | 42,82                                   |
| Trehalosa dihidratada           | 0,00                                    | 42,73                                   | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    |
| Ácido cítrico                   | 1,87                                    | 1,87                                    | 1,85                                    | 1,86                                    | 1,85                                    | 1,86                                    | 1,87                                    | 1,87                                    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0,00                                    | 1,86                                    | 1,84                                    | 1,85                                    | 1,85                                    | 1,85                                    | 1,86                                    | 0,00                                    |
| ZnCl <sub>2</sub>               | 0,12                                    | 0,12                                    | 0,12                                    | 0,12                                    | 0,12                                    | 0,12                                    | 0,12                                    | 0,12                                    |
| Base de histidina               | 1,66                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 1,66                                    |
| Arginina                        | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,92                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    |
| Glicina                         | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,40                                    | 0,00                                    | 0,00                                    |
| Prolina                         | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,61                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    |
| Travasol                        | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,85                                    | 0,00                                    | 0,00                                    | 0,00                                    |
| pH de la mezcla de excipientes  | 7,0                                     | 7,0                                     | 7,0                                     | 7,0                                     | 7,0                                     | 7,0                                     | 7,0                                     | 7,5                                     |

5

Los lotes de OTF Form. 2 son formulaciones según la invención, mientras que los lotes de OTF Form1, Form3, Form4, Form5, Form6, Form7 y Form8 son ejemplos comparativos.

10 Los lotes P n.º 111 a P n.º 118 se analizaron en la primera ronda. Los lotes P n.º 119 a P n.º 126 se analizaron en la segunda ronda. Los lotes P n.º 127 a P n.º 134 se analizaron en la tercera ronda.

15 El contenido de humedad (humedad residual) de cada lote de OTF se determinó tal como se describe en el ejemplo 1(3) sobre el contenido total y en un modo libre de CaCO<sub>3</sub>. El tiempo de disolución de cada lote de OTF se determinó tal como se describe en el ejemplo 1(5). También se midió el grosor de cada lote de OTF. El contenido de humedad (MC), el grosor y el tiempo de disolución de los lotes de OTF P n.º 111 a P n.º 134 se presentan en la tabla 4.

**Tabla 4** - Contenido de humedad (MC), grosor y tiempo de disolución de los lotes de OTF P n.º 111 a P n.º 134

| OTF       | Ronda   | MC (%) | ±de  | MC libre de CaCO <sub>3</sub> (%) | Grosor (µm) | Tiempo de disolución (s) | ±de |
|-----------|---------|--------|------|-----------------------------------|-------------|--------------------------|-----|
| P n.º 111 | Ronda 1 | 2,20   | 0,14 | 5,34                              | 213         | 49,0                     | 1,4 |
| P n.º 112 | Ronda 1 | 1,37   | 1,11 | 3,32                              | 218         | 48,0                     | 1,4 |
| P n.º 113 | Ronda 1 | 2,37   | 0,07 | 5,71                              | 209         | 46,0                     | 1,4 |
| P n.º 114 | Ronda 1 | 2,20   | 0,15 | 5,31                              | 226         | 48,5                     | 2,1 |
| P n.º 115 | Ronda 1 | 2,21   | 0,13 | 5,33                              | 218         | 49,5                     | 3,5 |
| P n.º 116 | Ronda 1 | 2,01   | 0,15 | 5,32                              | 215         | 47,5                     | 0,7 |
| P n.º 117 | Ronda 1 | 2,13   | 0,00 | 5,33                              | 208         | 51,0                     | 1,4 |
| P n.º 118 | Ronda 1 | 2,48   | 0,05 | 5,34                              | 198         | 47,5                     | 2,1 |
| P n.º 119 | Ronda 2 | 2,23   | 0,22 | 5,39                              | 214         | 51,0                     | 1,4 |
| P n.º 120 | Ronda 2 | 2,46   | 0,32 | 5,92                              | 203         | 52,0                     | 1,4 |
| P n.º 121 | Ronda 2 | 1,44   | 0,03 | 3,49                              | 207         | 48,0                     | 1,4 |
| P n.º 122 | Ronda 2 | 2,48   | 0,03 | 5,92                              | 210         | 48,5                     | 2,1 |

| OTF       | Ronda   | MC (%) | ±de  | MC libre de CaCO <sub>3</sub> (%) | Grosor (μm) | Tiempo de disolución (s) | ±de |
|-----------|---------|--------|------|-----------------------------------|-------------|--------------------------|-----|
| P n.º 123 | Ronda 2 | 2,44   | 0,03 | 5,92                              | 213         | 49,0                     | 1,4 |
| P n.º 124 | Ronda 2 | 2,22   | 0,09 | 5,90                              | 208         | 47,5                     | 0,7 |
| P n.º 125 | Ronda 2 | 1,98   | 0,12 | 4,77                              | 214         | 49,0                     | 1,4 |
| P n.º 126 | Ronda 2 | 2,48   | 0,00 | 5,98                              | 206         | 44,5                     | 2,1 |
| P n.º 127 | Ronda 3 | 2,41   | 0,06 | 6,01                              | 219         | 48,0                     | 2,8 |
| P n.º 128 | Ronda 3 | 1,23   | 0,13 | 2,98                              | 213         | 48,0                     | 1,4 |
| P n.º 129 | Ronda 3 | 2,26   | 0,08 | 5,45                              | 213         | 49,0                     | 1,4 |
| P n.º 130 | Ronda 3 | 2,27   | 0,10 | 5,47                              | 216         | 51,5                     | 2,1 |
| P n.º 131 | Ronda 3 | 2,48   | 0,25 | 6,02                              | 212         | 49,0                     | 4,2 |
| P n.º 132 | Ronda 3 | 2,24   | 0,06 | 6,0                               | 210         | 50,0                     | 1,4 |
| P n.º 133 | Ronda 3 | 2,04   | 0,01 | 4,93                              | 214         | 46,5                     | 5,0 |
| P n.º 134 | Ronda 3 | 2,48   | 0,10 | 6,02                              | 195         | 48,0                     | 1,4 |

Se evaluó la termoestabilidad de cada lote de OTF determinando el título viral en los puntos de tiempo T0 4 °C, T3 semanas 40 °C, T5 semanas 40 °C, T8 semanas 40 °C y T12 semanas 40 °C tal como se describe en el ejemplo 1(4) anterior. Para cada lote, se analizaron 4 OTF en cada punto de tiempo. Los resultados para las rondas 1, 2 y 3 se presentan en la figura 8 (Form. 1, Form. 8), la figura 9 (Form. 7, Form. 2) y la figura 10 (Form. 3, Form. 4, Form. 6, Form. 5).

#### **Ejemplo 9 - Termoestabilidad de las formulaciones de OTF de rotavirus P n.º 165 a P n.º 198**

- 10 Se prepararon los lotes de OTF de rotavirus P n.º 165 a P n.º 198 tal como se describe en el ejemplo 1(1). Antes de combinar con la disolución madre de CaCO<sub>3</sub> y PVA (PVA al 25 % p/v), cada disolución madre de excipiente comprendía ácido cítrico 41,6 mM, ZnCl<sub>2</sub> 4 mM, trehalosa dihidratada a una concentración del 5, el 10 o el 20 % (p/v), histidina 50 mM o tampón fosfato (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), y opcionalmente glicina y/o arginina a una concentración de 5, 25 o 125 mM.
- 15 Se ajustó el pH final de cada disolución de mezcla húmeda a 7. El tiempo de secado se estableció en 55 minutos para todos los lotes excepto para los lotes P n.º 165 a P n.º 168 para los que se estableció en 60 minutos, y los lotes P n.º 170 y P n.º 171 para los que se estableció en 70 minutos. Una vez seco, cada lote de OTF comprendía aproximadamente el 50-77 % (p/p) de CaCO<sub>3</sub> y aproximadamente el 23-50 % (p/p) de la mezcla de excipiente/polímero (PVA). Para cada lote de OTF, la composición de película seca en un modo libre de CaCO<sub>3</sub> consistía en PVA (el 40-78 % en peso), trehalosa dihidratada, ZnCl<sub>2</sub> (0,12-0,17% en peso), ácido cítrico (1,8-2,7 % en peso), un tampón seleccionado de K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0-2,7 % en peso) y base de histidina (0-2,4 % en peso), y opcionalmente glicina y/o arginina.

El lote OTF P n.º 194, usado como formulación que contiene gelatina de referencia comparativa, tenía una composición de excipiente (en un modo libre de CaCO<sub>3</sub>) consiste en el 49,3 % en peso de sacarosa, el 9,9 % en peso de gelatina, el 4,0 % en peso de sorbitol, el 0,15 % en peso de CaCl<sub>2</sub>, además del 2,0 % en peso de ácido cítrico, el 2,2 % en peso de K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, el 0,15 % en peso de CaCl<sub>2</sub>, el 0,14 % en peso de ZnCl<sub>2</sub> y el 40,6 % en peso de PVA. El polvo de CaCO<sub>3</sub> usado para esta referencia tenía un tamaño de partícula promedio de 12 micrómetros y la concentración de CaCO<sub>3</sub> en la mezcla húmeda fue del 20,41 % (p/v). Se ajustó el pH final de la disolución de mezcla húmeda a 7,15. Este lote de referencia se secó durante 180 minutos a 60 °C.

La elección del tampón, así como del contenido de trehalosa, glicina y arginina de cada lote de OTF se presentan en la tabla 5.

**Tabla 5** – Elección del contenido de tampón, trehalosa, glicina y arginina en la disolución madre de excipiente y OTF, seca y tiempo de secado para los lotes P n.º 165 a P n.º 198

| Form.     | Tampón           | Trehalosa<br>(% p/v)              | Gly<br>(mM) | Arg<br>(mM) | Trehalosa                                                    | Gly  | Arg  | Tiempo de<br>secado (min) |
|-----------|------------------|-----------------------------------|-------------|-------------|--------------------------------------------------------------|------|------|---------------------------|
|           |                  | Disolución madre de<br>excipiente |             |             | % en peso de en OTF en un modo<br>libre de CaCO <sub>3</sub> |      |      |                           |
| P n.º 165 | Histidina        | 5                                 | 0           | 0           | 15,77                                                        | 0,00 | 0,00 | 60                        |
| P n.º 166 | KPO <sub>4</sub> | 5                                 | 125         | 125         | 14,32                                                        | 2,69 | 6,24 | 60                        |
| P n.º 167 | KPO <sub>4</sub> | 10                                | 5           | 5           | 27,08                                                        | 0,10 | 0,24 | 60                        |
| P n.º 168 | Histidina        | 10                                | 0           | 125         | 25,72                                                        | 0,00 | 5,60 | 60                        |

| Form.      | Tampón           | Trehalosa<br>(% p/v)              | Gly<br>(mM) | Arg<br>(mM) | Trehalosa                                                    | Gly  | Arg  | Tiempo de<br>secado (min) |
|------------|------------------|-----------------------------------|-------------|-------------|--------------------------------------------------------------|------|------|---------------------------|
|            |                  | Disolución madre de<br>excipiente |             |             | % en peso de en OTF en un modo<br>libre de CaCO <sub>3</sub> |      |      |                           |
| P n.º 169  | Histidina        | 5                                 | 25          | 125         | 14,67                                                        | 0,55 | 6,39 | 55                        |
| P n.º 170  | KPO <sub>4</sub> | 20                                | 125         | 25          | 41,52                                                        | 1,95 | 0,91 | 70                        |
| P n.º 171  | Histidina        | 20                                | 125         | 25          | 41,60                                                        | 1,95 | 0,91 | 70                        |
| P n.º 172  | KPO <sub>4</sub> | 5                                 | 0           | 0           | 15,72                                                        | 0,00 | 0,00 | 55                        |
| P n.º 173  | Histidina        | 5                                 | 125         | 25          | 15,11                                                        | 2,84 | 1,32 | 55                        |
| P n.º 174  | KPO <sub>4</sub> | 20                                | 0           | 0           | 42,73                                                        | 0,00 | 0,00 | 55                        |
| P n.º 175  | Histidina        | 10                                | 5           | 5           | 27,15                                                        | 0,10 | 0,24 | 55                        |
| P n.º 176  | KPO <sub>4</sub> | 20                                | 125         | 0           | 41,22                                                        | 1,93 | 0,00 | 55                        |
| P n.º 177  | Histidina        | 20                                | 25          | 125         | 40,76                                                        | 0,38 | 4,44 | 55                        |
| P n.º 178  | KPO <sub>4</sub> | 10                                | 25          | 25          | 26,72                                                        | 0,50 | 1,16 | 55                        |
| P n.º 179  | Histidina        | 20                                | 125         | 25          | 41,60                                                        | 1,95 | 0,91 | 55                        |
| P n.º 180  | Histidina        | 20                                | 0           | 25          | 42,43                                                        | 0,00 | 0,92 | 55                        |
| P n.º 181  | Histidina        | 5                                 | 25          | 0           | 15,68                                                        | 0,59 | 0,00 | 55                        |
| P n.º 182  | KPO <sub>4</sub> | 20                                | 0           | 125         | 40,83                                                        | 0,00 | 4,45 | 55                        |
| P n.º 183  | Histidina        | 20                                | 25          | 0           | 42,65                                                        | 0,40 | 0,00 | 55                        |
| P n.º 184  | Histidina        | 10                                | 125         | 125         | 25,11                                                        | 2,36 | 5,47 | 55                        |
| P n.º 185  | KPO <sub>4</sub> | 10                                | 25          | 5           | 26,97                                                        | 0,51 | 0,23 | 55                        |
| P n.º 186  | Histidina        | 5                                 | 0           | 25          | 15,56                                                        | 0,00 | 1,36 | 55                        |
| P n.º 187  | KPO <sub>4</sub> | 20                                | 125         | 125         | 40,07                                                        | 1,88 | 4,36 | 55                        |
| P n.º 188  | Histidina        | 20                                | 0           | 0           | 42,82                                                        | 0,00 | 0,00 | 55                        |
| P n.º 189  | KPO <sub>4</sub> | 5                                 | 125         | 125         | 14,32                                                        | 2,69 | 6,24 | 55                        |
| P n.º 190  | Histidina        | 10                                | 125         | 0           | 26,56                                                        | 2,49 | 0,00 | 55                        |
| P n.º 191  | KPO <sub>4</sub> | 20                                | 5           | 5           | 42,62                                                        | 0,08 | 0,19 | 55                        |
| P n.º 192  | KPO <sub>4</sub> | 5                                 | 125         | 0           | 15,27                                                        | 2,87 | 0,00 | 55                        |
| P n.º 193  | Histidina        | 10                                | 0           | 125         | 25,72                                                        | 0,00 | 5,60 | 55                        |
| P n.º 194* | Referencia       | 0                                 | 0           | 0           | 0                                                            | 0    | 0    | 180                       |
| P n.º 195  | Histidina        | 5                                 | 0           | 0           | 15,77                                                        | 0,00 | 0,00 | 55                        |
| P n.º 196  | KPO <sub>4</sub> | 5                                 | 125         | 125         | 14,32                                                        | 2,69 | 6,24 | 55                        |
| P n.º 197  | KPO <sub>4</sub> | 10                                | 5           | 5           | 27,08                                                        | 0,10 | 0,24 | 55                        |
| P n.º 198  | Histidina        | 5                                 | 25          | 125         | 14,67                                                        | 0,55 | 6,39 | 55                        |

\*P n.º 194 (referencia comparativa) también contenía sacarosa, gelatina, sorbitol, CaCl<sub>2</sub> y se secó durante 3 horas a 60 °C.

El contenido de humedad (humedad residual) de cada lote de OTF se determinó tal como se describe en el ejemplo 1(3) en un modo libre de CaCO<sub>3</sub>. El tiempo de disolución de cada lote de OTF se determinó tal como se describe en el ejemplo 1(5). También se midió el grosor de cada lote de OTF. La flexibilidad de cada lote de OTF se determinó tal como se describe en el ejemplo 1(7).

5

El contenido de humedad (MC), el grosor y el tiempo de disolución de los lotes de OTF P n.º 165 a P n.º 198 se presentan en la tabla 6.

10 **Tabla 6** - Contenido de humedad (MC), tiempo de disolución, grosor y flexibilidad de los lotes de OTF P n.º 165 a P n.º 198

| Lote de OTF | MC libre de CaCO <sub>3</sub> (%) | Disolución (s) | Grosor (µm) | Flexibilidad |
|-------------|-----------------------------------|----------------|-------------|--------------|
| P n.º 165   | 4,3                               | 53,0           | 207         | flex./frag.  |

| Lote de OTF | MC libre de CaCO <sub>3</sub> (%) | Disolución (s) | Grosor (μm) | Flexibilidad |
|-------------|-----------------------------------|----------------|-------------|--------------|
| P n.º 166   | 3,7                               | 49,0           | 213         | flex./frag.  |
| P n.º 167   | 4,5                               | 47,5           | 215         | flex./frag.  |
| P n.º 168   | 6,2                               | 47,5           | 191         | frag.        |
| P n.º 169   | 5,7                               | 49,0           | 188         | flex./frag.  |
| P n.º 170   | 4,8                               | 47,5           | 216         | frag.        |
| P n.º 171   | 5,0                               | 49,0           | 217         | frag.        |
| P n.º 172   | 5,3                               | 51,5           | 200         | flex.        |
| P n.º 173   | 5,6                               | 50,0           | 186         | flex.        |
| P n.º 174   | 7,4                               | 47,5           | 218         | flex.        |
| P n.º 175   | 6,0                               | 51,0           | 192         | flex.        |
| P n.º 176   | 7,0                               | 51,5           | 206         | flex.        |
| P n.º 177   | 6,9                               | 48,0           | 193         | flex.        |
| P n.º 178   | 4,8                               | 50,5           | 212         | flex.        |
| P n.º 179   | 7,1                               | 49,5           | 200         | flex.        |
| P n.º 180   | 7,0                               | 51,0           | 195         | flex.        |
| P n.º 181   | 3,2                               | 48,5           | 208         | frag.        |
| P n.º 182   | 6,7                               | 51,0           | 206         | flex.        |
| P n.º 183   | 7,5                               | 50,0           | 199         | flex./frag.  |
| P n.º 184   | 5,9                               | 49,5           | 190         | flex./frag.  |
| P n.º 185   | 3,9                               | 49,0           | 198         | flex./frag.  |
| P n.º 186   | 5,4                               | 51,5           | 198         | flex./frag.  |
| P n.º 187   | 7,6                               | 47,5           | 199         | flex.        |
| P n.º 188   | 7,3                               | 47,5           | 206         | flex./frag.  |
| P n.º 189   | 4,2                               | 52,0           | 215         | flex./frag.  |
| P n.º 190   | 7,6                               | 50,0           | 199         | flex.        |
| P n.º 191   | 5,4                               | 50,5           | 201         | flex.        |
| P n.º 192   | 5,9                               | 51,5           | 198         | flex.        |
| P n.º 193   | 6,2                               | 51,0           | 198         | flex.        |
| P n.º 194   | 4,9                               | 94,0           | 264         | frag.        |
| P n.º 195   | 2,8                               | 51,5           | 198         | frag.        |
| P n.º 196   | 5,1                               | 51,5           | 204         | flex./frag.  |
| P n.º 197   | 3,4                               | 50,5           | 203         | flex./frag.  |
| P n.º 198   | 5,0                               | 48,0           | 192         | flex./frag.  |

Se evaluó la termoestabilidad de cada lote de OTF determinando el título viral en los puntos de tiempo T0 4 °C (4 OTF para P n.º 165-196, 2 para P n.º 194-P n.º 198), T3 semanas 40 °C (3 OTF), T5 semanas 40 °C (6 OTF) y T10 semanas 40 °C (6 OTF) tal como se describe en el ejemplo 1(4) anterior. También se analizó Rotarix Iyo (vacuna comercial) como control.

Los resultados se presentan en la tabla 7 y la tabla 8 a continuación y en las figuras 11 a 16.

**Tabla 7 - Título viral de los lotes de OTF P n.º 165 a P n.º 198 a lo largo del tiempo**

| Lote de OTF | Día | N.º de muestras | Título viral (Log <sub>10</sub> ufc/ml) |                      |                      | Pérdida media desde el Día 0 |                      |                      |
|-------------|-----|-----------------|-----------------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|
|             |     |                 | Media por punto de tiempo               | IC del 95 % inferior | IC del 95 % superior | Media por punto de tiempo    | IC del 95 % inferior | IC del 95 % superior |
| P n.º       | 0   | 4               | 5,36                                    | 5,14                 | 5,58                 |                              |                      |                      |

# ES 2 969 298 T3

| Lote de OTF | Día | N.º de muestras | Título viral (Log <sub>10</sub> uff/ml) |                      |                      | Pérdida media desde el Día 0 |                      |                      |
|-------------|-----|-----------------|-----------------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|
|             |     |                 | Media por punto de tiempo               | IC del 95 % inferior | IC del 95 % superior | Media por punto de tiempo    | IC del 95 % inferior | IC del 95 % superior |
| 165         |     |                 |                                         |                      |                      |                              |                      |                      |
| P n.º 165   | 21  | 3               | 4,91                                    | 4,68                 | 5,15                 | 0,45                         | 0,25                 | 0,65                 |
| P n.º 165   | 35  | 6               | 4,96                                    | 4,89                 | 5,04                 | 0,40                         | 0,23                 | 0,56                 |
| P n.º 165   | 70  | 6               | 4,75                                    | 4,59                 | 4,91                 | 0,61                         | 0,45                 | 0,78                 |
| P n.º 166   | 0   | 4               | 5,20                                    | 5,03                 | 5,37                 |                              |                      |                      |
| P n.º 166   | 21  | 3               | 5,02                                    | 4,73                 | 5,31                 | 0,18                         | -0,01                | 0,37                 |
| P n.º 166   | 35  | 6               | 4,94                                    | 4,82                 | 5,06                 | 0,26                         | 0,10                 | 0,42                 |
| P n.º 166   | 70  | 6               | 4,84                                    | 4,71                 | 4,97                 | 0,36                         | 0,20                 | 0,52                 |
| P n.º 167   | 0   | 4               | 5,37                                    | 5,17                 | 5,58                 |                              |                      |                      |
| P n.º 167   | 21  | 3               | 5,07                                    | 5,02                 | 5,12                 | 0,30                         | 0,04                 | 0,57                 |
| P n.º 167   | 35  | 6               | 4,65                                    | 4,55                 | 4,75                 | 0,72                         | 0,50                 | 0,95                 |
| P n.º 167   | 70  | 6               | 4,36                                    | 4,10                 | 4,62                 | 1,01                         | 0,79                 | 1,24                 |
| P n.º 168   | 0   | 4               | 5,57                                    | 5,38                 | 5,75                 |                              |                      |                      |
| P n.º 168   | 21  | 3               | 5,24                                    | 4,92                 | 5,56                 | 0,33                         | 0,14                 | 0,51                 |
| P n.º 168   | 35  | 6               | 5,11                                    | 4,99                 | 5,23                 | 0,46                         | 0,30                 | 0,62                 |
| P n.º 168   | 70  | 6               | 4,86                                    | 4,74                 | 4,97                 | 0,71                         | 0,56                 | 0,87                 |
| P n.º 169   | 0   | 4               | 5,51                                    | 5,24                 | 5,77                 |                              |                      |                      |
| P n.º 169   | 21  | 3               | 5,06                                    | 4,59                 | 5,53                 | 0,45                         | 0,20                 | 0,69                 |
| P n.º 169   | 35  | 6               | 4,93                                    | 4,82                 | 5,03                 | 0,58                         | 0,37                 | 0,79                 |
| P n.º 169   | 70  | 6               | 4,67                                    | 4,48                 | 4,85                 | 0,84                         | 0,63                 | 1,05                 |
| P n.º 170   | 0   | 4               | 5,37                                    | 5,12                 | 5,62                 |                              |                      |                      |
| P n.º 170   | 21  | 3               | 5,12                                    | 5,06                 | 5,17                 | 0,25                         | 0,07                 | 0,42                 |
| P n.º 170   | 35  | 6               | 5,22                                    | 5,13                 | 5,32                 | 0,15                         | 0,00                 | 0,29                 |
| P n.º 170   | 70  | 6               | 5,03                                    | 4,92                 | 5,14                 | 0,34                         | 0,19                 | 0,48                 |
| P n.º 171   | 0   | 4               | 5,51                                    | 5,25                 | 5,76                 |                              |                      |                      |
| P n.º 171   | 21  | 3               | 4,89                                    | 4,18                 | 5,61                 | 0,61                         | 0,31                 | 0,91                 |
| P n.º 171   | 35  | 6               | 4,76                                    | 4,67                 | 4,84                 | 0,75                         | 0,49                 | 1,00                 |
| P n.º 171   | 70  | 6               | 4,48                                    | 4,25                 | 4,71                 | 1,02                         | 0,77                 | 1,28                 |
| P n.º 172   | 0   | 4               | 5,24                                    | 5,10                 | 5,39                 |                              |                      |                      |
| P n.º       | 21  | 3               | 3,79                                    | 2,97                 | 4,61                 | 1,46                         | 1,09                 | 1,82                 |

# ES 2 969 298 T3

| Lote de OTF | Día | N.º de muestras | Título viral (Log <sub>10</sub> uff/ml) |                      |                      | Pérdida media desde el Día 0 |                      |                      |
|-------------|-----|-----------------|-----------------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|
|             |     |                 | Media por punto de tiempo               | IC del 95 % inferior | IC del 95 % superior | Media por punto de tiempo    | IC del 95 % inferior | IC del 95 % superior |
| 172         |     |                 |                                         |                      |                      |                              |                      |                      |
| P n.º 172   | 35  | 6               | 3,71                                    | 3,42                 | 4,00                 | 1,53                         | 1,22                 | 1,84                 |
| P n.º 172   | 70  | 6               | 3,67                                    | 3,50                 | 3,84                 | 1,58                         | 1,27                 | 1,89                 |
| P n.º 173   | 0   | 4               | 5,32                                    | 5,18                 | 5,46                 |                              |                      |                      |
| P n.º 173   | 21  | 3               | 3,75                                    | 3,11                 | 4,38                 | 1,58                         | 1,31                 | 1,84                 |
| P n.º 173   | 35  | 6               | 3,69                                    | 3,46                 | 3,92                 | 1,63                         | 1,41                 | 1,86                 |
| P n.º 173   | 70  | 6               | 3,60                                    |                      |                      | 1,72                         | 1,50                 | 1,95                 |
| P n.º 174   | 0   | 4               | 5,34                                    | 5,07                 | 5,61                 |                              |                      |                      |
| P n.º 174   | 21  | 3               | 4,26                                    | 2,46                 | 6,07                 | 1,08                         | 0,51                 | 1,65                 |
| P n.º 174   | 35  | 6               | 3,94                                    | 3,55                 | 4,34                 | 1,40                         | 0,91                 | 1,88                 |
| P n.º 174   | 70  | 6               | 3,60                                    |                      |                      | 1,74                         | 1,26                 | 2,22                 |
| P n.º 175   | 0   | 4               | 5,41                                    | 5,26                 | 5,57                 |                              |                      |                      |
| P n.º 175   | 21  | 3               | 4,93                                    | 4,47                 | 5,39                 | 0,48                         | 0,06                 | 0,91                 |
| P n.º 175   | 35  | 6               | 4,35                                    | 3,92                 | 4,77                 | 1,07                         | 0,71                 | 1,42                 |
| P n.º 175   | 70  | 6               | 4,44                                    | 4,30                 | 4,59                 | 0,97                         | 0,61                 | 1,33                 |
| P n.º 176   | 0   | 4               | 5,31                                    | 5,17                 | 5,46                 |                              |                      |                      |
| P n.º 176   | 21  | 3               | 5,14                                    | 4,79                 | 5,48                 | 0,18                         | -0,42                | 0,78                 |
| P n.º 176   | 35  | 5               | 4,44                                    | 4,12                 | 4,76                 | 0,87                         | 0,34                 | 1,40                 |
| P n.º 176   | 70  | 5               | 4,00                                    | 3,27                 | 4,73                 | 1,31                         | 0,79                 | 1,84                 |
| P n.º 177   | 0   | 4               | 5,43                                    | 5,29                 | 5,58                 |                              |                      |                      |
| P n.º 177   | 21  | 3               | 5,38                                    | 5,24                 | 5,52                 | 0,05                         | -0,13                | 0,23                 |
| P n.º 177   | 35  | 6               | 5,02                                    | 4,92                 | 5,12                 | 0,42                         | 0,26                 | 0,57                 |
| P n.º 177   | 70  | 6               | 4,75                                    | 4,59                 | 4,90                 | 0,69                         | 0,53                 | 0,84                 |
| P n.º 178   | 0   | 4               | 5,24                                    | 5,04                 | 5,43                 |                              |                      |                      |
| P n.º 178   | 21  | 3               | 5,03                                    | 4,74                 | 5,32                 | 0,21                         | -0,08                | 0,49                 |
| P n.º 178   | 35  | 6               | 4,72                                    | 4,57                 | 4,87                 | 0,51                         | 0,27                 | 0,76                 |
| P n.º 178   | 70  | 6               | 4,27                                    | 4,02                 | 4,52                 | 0,97                         | 0,73                 | 1,21                 |
| P n.º 180   | 0   | 4               | 5,43                                    | 5,15                 | 5,71                 |                              |                      |                      |
| P n.º 180   | 21  | 3               | 5,17                                    | 4,67                 | 5,67                 | 0,26                         | -0,22                | 0,74                 |
| P n.º       | 35  | 6               | 5,01                                    | 4,82                 | 5,20                 | 0,42                         | 0,02                 | 0,82                 |

# ES 2 969 298 T3

| Lote de OTF | Día | N.º de muestras | Título viral (Log <sub>10</sub> uff/ml) |                      |                      | Pérdida media desde el Día 0 |                      |                      |
|-------------|-----|-----------------|-----------------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|
|             |     |                 | Media por punto de tiempo               | IC del 95 % inferior | IC del 95 % superior | Media por punto de tiempo    | IC del 95 % inferior | IC del 95 % superior |
| 180         |     |                 |                                         |                      |                      |                              |                      |                      |
| P n.º 180   | 70  | 6               | 4,16                                    | 3,70                 | 4,62                 | 1,27                         | 0,87                 | 1,68                 |
| P n.º 181   | 0   | 4               | 5,25                                    | 4,97                 | 5,54                 |                              |                      |                      |
| P n.º 181   | 21  | 3               | 4,88                                    | 4,34                 | 5,41                 | 0,37                         | -0,17                | 0,92                 |
| P n.º 181   | 35  | 6               | 4,61                                    | 4,08                 | 5,15                 | 0,64                         | 0,18                 | 1,10                 |
| P n.º 181   | 70  | 6               | 4,54                                    | 4,32                 | 4,77                 | 0,71                         | 0,25                 | 1,17                 |
| P n.º 182   | 0   | 4               | 5,30                                    | 4,93                 | 5,67                 |                              |                      |                      |
| P n.º 182   | 21  | 3               | 5,21                                    | 5,12                 | 5,30                 | 0,09                         | -0,21                | 0,39                 |
| P n.º 182   | 35  | 6               | 4,79                                    | 4,51                 | 5,06                 | 0,51                         | 0,26                 | 0,76                 |
| P n.º 182   | 70  | 6               | 3,60                                    |                      |                      | 1,70                         | 1,44                 | 1,95                 |
| P n.º 183   | 0   | 4               | 5,02                                    | 4,40                 | 5,64                 |                              |                      |                      |
| P n.º 183   | 21  | 3               | 5,22                                    | 4,92                 | 5,52                 | -0,20                        | -0,87                | 0,46                 |
| P n.º 183   | 35  | 6               | 4,83                                    | 4,20                 | 5,47                 | 0,19                         | -0,37                | 0,75                 |
| P n.º 183   | 70  | 6               | 4,64                                    | 4,45                 | 4,83                 | 0,38                         | -0,18                | 0,94                 |
| P n.º 184   | 0   | 4               | 5,43                                    | 5,08                 | 5,79                 |                              |                      |                      |
| P n.º 184   | 21  | 3               | 4,68                                    | 2,36                 | 6,99                 | 0,76                         | -0,08                | 1,60                 |
| P n.º 184   | 35  | 6               | 4,89                                    | 4,22                 | 5,56                 | 0,54                         | -0,17                | 1,25                 |
| P n.º 184   | 70  | 6               | 4,76                                    | 4,63                 | 4,90                 | 0,67                         | -0,04                | 1,38                 |
| P n.º 185   | 0   | 4               | 5,21                                    | 4,86                 | 5,57                 |                              |                      |                      |
| P n.º 185   | 21  | 3               | 4,97                                    | 4,68                 | 5,27                 | 0,24                         | -0,13                | 0,62                 |
| P n.º 185   | 35  | 6               | 5,02                                    | 4,94                 | 5,09                 | 0,20                         | -0,12                | 0,51                 |
| P n.º 185   | 70  | 6               | 4,01                                    | 3,65                 | 4,37                 | 1,21                         | 0,89                 | 1,52                 |
| P n.º 186   | 0   | 4               | 5,23                                    | 4,97                 | 5,49                 |                              |                      |                      |
| P n.º 186   | 21  | 3               | 5,00                                    | 4,61                 | 5,38                 | 0,23                         | -0,35                | 0,81                 |
| P n.º 186   | 35  | 6               | 4,57                                    | 4,07                 | 5,08                 | 0,66                         | 0,17                 | 1,15                 |
| P n.º 186   | 70  | 6               | 4,26                                    | 3,89                 | 4,63                 | 0,97                         | 0,48                 | 1,46                 |
| P n.º 188   | 0   | 4               | 5,46                                    | 5,24                 | 5,68                 |                              |                      |                      |
| P n.º 188   | 21  | 3               | 5,24                                    | 4,70                 | 5,77                 | 0,22                         | -0,41                | 0,86                 |
| P n.º 188   | 35  | 6               | 5,14                                    | 5,02                 | 5,27                 | 0,32                         | -0,22                | 0,85                 |
| P n.º       | 70  | 6               | 4,41                                    | 3,74                 | 5,09                 | 1,05                         | 0,51                 | 1,58                 |

# ES 2 969 298 T3

| Lote de OTF | Día | N.º de muestras | Título viral (Log <sub>10</sub> ufc/ml) |                      |                      | Pérdida media desde el Día 0 |                      |                      |
|-------------|-----|-----------------|-----------------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|
|             |     |                 | Media por punto de tiempo               | IC del 95 % inferior | IC del 95 % superior | Media por punto de tiempo    | IC del 95 % inferior | IC del 95 % superior |
| 188         |     |                 |                                         |                      |                      |                              |                      |                      |
| P n.º 189   | 0   | 4               | 5,20                                    | 5,02                 | 5,37                 |                              |                      |                      |
| P n.º 189   | 21  | 3               | 5,17                                    | 4,81                 | 5,52                 | 0,03                         | -0,15                | 0,21                 |
| P n.º 189   | 35  | 6               | 5,03                                    | 4,91                 | 5,16                 | 0,16                         | 0,01                 | 0,31                 |
| P n.º 189   | 70  | 6               | 4,77                                    | 4,68                 | 4,86                 | 0,43                         | 0,27                 | 0,58                 |
| P n.º 190   | 0   | 4               | 5,33                                    | 5,12                 | 5,54                 |                              |                      |                      |
| P n.º 190   | 21  | 3               | 4,78                                    | 4,66                 | 4,90                 | 0,55                         | 0,21                 | 0,89                 |
| P n.º 190   | 35  | 6               | 4,15                                    | 3,80                 | 4,51                 | 1,17                         | 0,89                 | 1,46                 |
| P n.º 190   | 70  | 6               | 3,60                                    |                      |                      | 1,73                         | 1,44                 | 2,01                 |
| P n.º 191   | 0   | 4               | 5,31                                    | 5,14                 | 5,48                 |                              |                      |                      |
| P n.º 191   | 21  | 3               | 4,52                                    | 2,49                 | 6,55                 | 0,79                         | 0,28                 | 1,30                 |
| P n.º 191   | 35  | 6               | 4,52                                    | 4,38                 | 4,67                 | 0,79                         | 0,36                 | 1,22                 |
| P n.º 191   | 70  | 6               | 3,60                                    |                      |                      | 1,71                         | 1,28                 | 2,14                 |
| P n.º 192   | 0   | 4               | 5,23                                    | 5,05                 | 5,40                 |                              |                      |                      |
| P n.º 192   | 21  | 3               | 4,41                                    | 3,95                 | 4,86                 | 0,82                         | 0,46                 | 1,19                 |
| P n.º 192   | 35  | 6               | 3,91                                    | 3,54                 | 4,29                 | 1,31                         | 1,01                 | 1,62                 |
| P n.º 192   | 70  | 6               | 3,60                                    |                      |                      | 1,63                         | 1,32                 | 1,94                 |
| P n.º 179   | 0   | 4               | 5,50                                    | 5,38                 | 5,61                 |                              |                      |                      |
| P n.º 179   | 21  | 3               | 4,67                                    | 2,37                 | 6,97                 | 0,83                         | 0,19                 | 1,47                 |
| P n.º 179   | 35  | 6               | 4,49                                    | 4,16                 | 4,81                 | 1,01                         | 0,47                 | 1,55                 |
| P n.º 179   | 70  | 6               | 3,66                                    | 3,51                 | 3,81                 | 1,84                         | 1,30                 | 2,38                 |
| P n.º 187   | 0   | 4               | 5,15                                    | 4,63                 | 5,68                 |                              |                      |                      |
| P n.º 187   | 21  | 3               | 5,26                                    | 4,74                 | 5,78                 | -0,11                        | -0,40                | 0,18                 |
| P n.º 187   | 35  | 6               | 5,22                                    | 5,12                 | 5,31                 | -0,06                        | -0,31                | 0,18                 |
| P n.º 187   | 70  | 6               | 5,04                                    | 4,97                 | 5,11                 | 0,11                         | -0,13                | 0,36                 |
| P n.º 193   | 0   | 4               | 5,34                                    | 5,12                 | 5,56                 |                              |                      |                      |
| P n.º 193   | 21  | 3               | 5,22                                    | 4,93                 | 5,51                 | 0,12                         | -0,06                | 0,31                 |
| P n.º 193   | 35  | 6               | 5,07                                    | 4,99                 | 5,14                 | 0,27                         | 0,11                 | 0,43                 |
| P n.º 193   | 70  | 6               | 4,78                                    | 4,65                 | 4,92                 | 0,56                         | 0,40                 | 0,71                 |
| P n.º       | 0   | 2               | 5,33                                    | 4,97                 | 5,70                 |                              |                      |                      |

# ES 2 969 298 T3

| Lote de OTF                | Día | N.º de muestras | Título viral (Log <sub>10</sub> ufc/ml) |                      |                      | Pérdida media desde el Día 0 |                      |                      |
|----------------------------|-----|-----------------|-----------------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|
|                            |     |                 | Media por punto de tiempo               | IC del 95 % inferior | IC del 95 % superior | Media por punto de tiempo    | IC del 95 % inferior | IC del 95 % superior |
| 195                        |     |                 |                                         |                      |                      |                              |                      |                      |
| P n.º 195                  | 21  | 3               | 5,31                                    | 5,13                 | 5,49                 | 0,02                         | -0,16                | 0,21                 |
| P n.º 195                  | 35  | 6               | 5,25                                    | 5,16                 | 5,34                 | 0,08                         | -0,09                | 0,24                 |
| P n.º 195                  | 70  | 4               | 5,20                                    | 5,01                 | 5,39                 | 0,13                         | -0,04                | 0,31                 |
| P n.º 196                  | 0   | 2               | 5,36                                    | 5,21                 | 5,51                 |                              |                      |                      |
| P n.º 196                  | 21  | 3               | 5,29                                    | 5,11                 | 5,48                 | 0,07                         | -0,10                | 0,23                 |
| P n.º 196                  | 35  | 6               | 5,24                                    | 5,16                 | 5,33                 | 0,12                         | -0,03                | 0,27                 |
| P n.º 196                  | 70  | 4               | 4,94                                    | 4,78                 | 5,10                 | 0,42                         | 0,27                 | 0,58                 |
| P n.º 197                  | 0   | 1               | 5,71                                    |                      |                      |                              |                      |                      |
| P n.º 197                  | 21  | 3               | 5,24                                    | 5,16                 | 5,31                 | 0,47                         | 0,10                 | 0,85                 |
| P n.º 197                  | 35  | 6               | 5,44                                    | 5,29                 | 5,60                 | 0,27                         | -0,08                | 0,62                 |
| P n.º 197                  | 70  | 5               | 5,13                                    | 4,90                 | 5,35                 | 0,58                         | 0,23                 | 0,94                 |
| P n.º 198                  | 0   | 2               | 5,40                                    | 4,09                 | 6,72                 |                              |                      |                      |
| P n.º 198                  | 21  | 3               | 5,44                                    | 5,29                 | 5,59                 | -0,04                        | -0,25                | 0,18                 |
| P n.º 198                  | 35  | 6               | 5,13                                    | 5,03                 | 5,22                 | 0,28                         | 0,08                 | 0,47                 |
| P n.º 198                  | 70  | 5               | 4,87                                    | 4,70                 | 5,04                 | 0,54                         | 0,33                 | 0,74                 |
| LYO                        | 0   | 2               | 5,38                                    | 4,80                 | 5,96                 |                              |                      |                      |
| LYO                        | 35  | 20              | 4,36                                    | 4,16                 | 4,56                 | 1,03                         | 0,42                 | 1,63                 |
| LYO                        | 70  | 19              | 3,87                                    | 3,69                 | 4,06                 | 1,51                         | 0,91                 | 2,12                 |
| CI: Intervalo de confianza |     |                 |                                         |                      |                      |                              |                      |                      |

**Tabla 8** - Ordenada en el origen y pendiente (pérdida de título viral por día ) para los lotes de OTF P n.º 165 a P n.º 198

| Lote de OTF | Ordenada en el origen |                |                      |                      | Pendiente (pérdida de título viral por día) |                |                      |                      |
|-------------|-----------------------|----------------|----------------------|----------------------|---------------------------------------------|----------------|----------------------|----------------------|
|             | Estimación            | Error estándar | IC del 95 % inferior | IC del 95 % superior | Estimación                                  | Error estándar | IC del 95 % inferior | IC del 95 % superior |
| P n.º 165   | 5,252                 | 0,0585         | 5,129                | 5,376                | -0,008                                      | 0,0013         | -0,010               | -0,005               |
| P n.º 166   | 5,152                 | 0,0461         | 5,055                | 5,249                | -0,005                                      | 0,0010         | -0,007               | -0,003               |
| P n.º 167   | 5,299                 | 0,0736         | 5,144                | 5,455                | -0,014                                      | 0,0016         | -0,018               | -0,011               |
| P n.º 168   | 5,501                 | 0,0475         | 5,401                | 5,601                | -0,010                                      | 0,0011         | -0,012               | -0,007               |
| P n.º 169   | 5,397                 | 0,0666         | 5,256                | 5,537                | -0,011                                      | 0,0015         | -0,014               | -0,008               |
| P n.º 170   | 5,331                 | 0,0464         | 5,233                | 5,429                | -0,004                                      | 0,0010         | -0,006               | -0,002               |
| P n.º 171   | 5,335                 | 0,0872         | 5,151                | 5,519                | -0,013                                      | 0,0019         | -0,017               | -0,009               |
| P n.º 172   | 4,706                 | 0,1886         | 4,308                | 5,104                | -0,018                                      | 0,0042         | -0,027               | -0,010               |
| P n.º 173   | 4,753                 | 0,1891         | 4,354                | 5,152                | -0,020                                      | 0,0042         | -0,029               | -0,011               |

| Lote de OTF            | Ordenada en el origen |                |                      |                      | Pendiente (pérdida de título viral por día) |                |                      |                      |
|------------------------|-----------------------|----------------|----------------------|----------------------|---------------------------------------------|----------------|----------------------|----------------------|
|                        | Estimación            | Error estándar | IC del 95 % inferior | IC del 95 % superior | Estimación                                  | Error estándar | IC del 95 % inferior | IC del 95 % superior |
| P n.º 174              | 4,999                 | 0,1702         | 4,640                | 5,358                | -0,022                                      | 0,0038         | -0,030               | -0,014               |
| P n.º 175              | 5,158                 | 0,1446         | 4,853                | 5,463                | -0,013                                      | 0,0032         | -0,020               | -0,006               |
| P n.º 176              | 5,316                 | 0,1491         | 4,998                | 5,634                | -0,020                                      | 0,0034         | -0,027               | -0,012               |
| P n.º 177              | 5,455                 | 0,0514         | 5,346                | 5,563                | -0,010                                      | 0,0011         | -0,013               | -0,008               |
| P n.º 178              | 5,250                 | 0,0670         | 5,109                | 5,391                | -0,014                                      | 0,0015         | -0,017               | -0,011               |
| P n.º 179              | 5,386                 | 0,1510         | 5,067                | 5,704                | -0,025                                      | 0,0034         | -0,032               | -0,018               |
| P n.º 180              | 5,540                 | 0,1159         | 5,296                | 5,785                | -0,019                                      | 0,0026         | -0,024               | -0,013               |
| P n.º 181              | 5,110                 | 0,1359         | 4,823                | 5,396                | -0,009                                      | 0,0030         | -0,016               | -0,003               |
| P n.º 182              | 5,534                 | 0,1016         | 5,320                | 5,749                | -0,026                                      | 0,0023         | -0,031               | -0,021               |
| P n.º 183              | 5,113                 | 0,1584         | 4,778                | 5,447                | -0,007                                      | 0,0035         | -0,014               | 0,001                |
| P n.º 184              | 5,202                 | 0,2077         | 4,764                | 5,640                | -0,007                                      | 0,0046         | -0,017               | 0,002                |
| P n.º 185              | 5,388                 | 0,1136         | 5,148                | 5,627                | -0,018                                      | 0,0025         | -0,023               | -0,013               |
| P n.º 186              | 5,186                 | 0,1373         | 4,897                | 5,476                | -0,014                                      | 0,0031         | -0,020               | -0,007               |
| P n.º 187              | 5,235                 | 0,0712         | 5,085                | 5,385                | -0,002                                      | 0,0016         | -0,006               | 0,001                |
| P n.º 188              | 5,558                 | 0,1494         | 5,243                | 5,873                | -0,015                                      | 0,0033         | -0,022               | -0,008               |
| P n.º 189              | 5,242                 | 0,0437         | 5,149                | 5,334                | -0,006                                      | 0,0010         | -0,009               | -0,004               |
| P n.º 190              | 5,212                 | 0,0967         | 5,008                | 5,417                | -0,024                                      | 0,0022         | -0,029               | -0,020               |
| P n.º 191              | 5,255                 | 0,1255         | 4,990                | 5,520                | -0,024                                      | 0,0028         | -0,029               | -0,018               |
| P n.º 192              | 4,961                 | 0,1255         | 4,696                | 5,225                | -0,022                                      | 0,0028         | -0,028               | -0,016               |
| P n.º 193              | 5,355                 | 0,0431         | 5,264                | 5,446                | -0,008                                      | 0,0010         | -0,010               | -0,006               |
| P n.º 194 (referencia) | 5,302                 | 0,0826         | 5,128                | 5,476                | -0,012                                      | 0,0018         | -0,016               | -0,008               |
| P n.º 195              | 5,332                 | 0,0416         | 5,242                | 5,422                | -0,002                                      | 0,0010         | -0,004               | 0,000                |
| P n.º 196              | 5,428                 | 0,0421         | 5,337                | 5,519                | -0,007                                      | 0,0010         | -0,009               | -0,004               |
| P n.º 197              | 5,561                 | 0,1003         | 5,345                | 5,778                | -0,006                                      | 0,0021         | -0,011               | -0,001               |
| P n.º 198              | 5,482                 | 0,0620         | 5,349                | 5,615                | -0,009                                      | 0,0014         | -0,012               | -0,006               |
| Rota Lyo               | 5,025                 | 0,1675         | 4,686                | 5,364                | -0,017                                      | 0,0031         | -0,023               | -0,011               |

Estos datos demostraron que se observó una pendiente óptima de (-0,002) para la formulación de OTF P n.º 187 que también tenía una buena flexibilidad.

- 5 El logaritmo de la pendiente de la formulación de OTF P n.º 187 (-0,002) se representó frente a la temperatura a 40 °C. Suponiendo que la relación entre la velocidad de decrecimiento y la temperatura es la misma que para la formulación de OTF de base P n.º 51, el modelo descrito en el ejemplo 3 predijo una pendiente de -0,000322 log<sub>10</sub> (uff/ml)/día (ln de pendiente de -8,0409) a 30 °C, es decir, una pérdida media de 0,235 en log<sub>10</sub> uff/ml después de 2 años a 30 °C (véase la figura 17). Se realizó un cálculo similar para un almacenamiento a 20 °C y 25 °C, cuyos resultados se presentan en la tabla 9.

**Tabla 9** – Predicción de pérdida de potencia después de 2 años mediante el modelo de Arrhenius

| Temperatura | Pérdida de potencia predicha (Login uff/ml) |
|-------------|---------------------------------------------|
| 20 °C       | 0,03                                        |
| 25 °C       | 0,09                                        |
| 30 °C       | 0,23                                        |

# REIVINDICACIONES

1. Película delgada de disolución rápida que comprende un virus y una mezcla de excipientes, en la que dicha mezcla de excipientes comprende  
5
  - uno o más polímero(s) soluble(s) en agua,
  - trehalosa,
  - 10
    - un ion metálico,
    - un carboxilato, y
  - un agente de tamponamiento,
  - 15en la que dicha película delgada de disolución rápida es termoestable,
  - en la que dicha película delgada de disolución rápida no comprende ningún producto de origen animal ni gelatina, y en la que dicho virus se selecciona preferiblemente de un virus vivo, un virus vivo atenuado, un virus inactivado o un virus reagrupado.
  - 20
2. Película delgada de disolución rápida según la reivindicación 1, en la que  
25
  - el virus es un rotavirus, preferiblemente un rotavirus vivo atenuado,
  - la mezcla de excipientes comprende un solo polímero soluble en agua que es PVA,
  - dicho ion metálico se selecciona de  $Zn^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ , preferiblemente en la forma de  $ZnCl_2$  o  $MnCl_2$ , más preferiblemente  $ZnCl_2$ ,
  - 30
    - el carboxilato es ácido cítrico, y/o
    - dicho agente de tamponamiento se selecciona de tampón fosfato y base de histidina.
- 35 3. Película delgada de disolución rápida según la reivindicación 1 o 2, en la que dicha mezcla de excipientes comprende además uno o más aminoácidos, seleccionados preferiblemente de glicina y/o arginina.
4. Película delgada de disolución rápida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el virus está presente en la película delgada de disolución rápida de la invención en un título que oscila entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^{11}$  uff por dosis, y en la que la mezcla de excipientes comprende o consiste en  
40
  - entre el 30 % y el 90 %, preferiblemente entre el 40 % y el 85 %, por ejemplo el 40, el 45, el 50, el 55, el 60, el 65, el 70, el 75, el 80 o el 85 % en peso del/de los polímero(s) soluble(s) en agua,
  - 45
    - entre el 10 % y el 60 %, preferiblemente entre el 14 % y el 45 %, por ejemplo el 14, el 15, el 20, el 25, el 30, el 35, el 40, el 42, o el 45 % en peso de trehalosa,
    - entre el 0,01 % y el 1 %, preferiblemente entre el 0,05 % y el 0,5 %, entre el 0,08 % y el 0,25 %, entre el 0,10 % y el 0,20 %, por ejemplo el 0,10, el 0,11, el 0,12, el 0,13, el 0,14, el 0,15, el 0,16, el 0,17, el 0,18, el 0,19 o el 0,20 % en peso del ion metálico o la sal,
    - 50
      - entre el 0,5 % y el 5 %, preferiblemente entre el 0,75 % y el 4 %, entre el 1 % y el 3 %, por ejemplo el 1, el 1,5, el 1,7, el 1,75, el 1,8, el 1,85, el 1,9, el 2, el 2,5 o el 3 % en peso del carboxilato,
      - 55
        - entre el 0,5 % y el 5 %, preferiblemente entre el 0,75 % y el 4 %, entre el 1 % y el 3 %, por ejemplo el 1, el 1,5, el 1,7, el 1,75, el 1,8, el 1,85, el 1,9, el 2, el 2,5 o el 3 % en peso del agente de tamponamiento, y
        - entre el 0 % y el 20 %, preferiblemente entre el 0,05 % y el 15 %, entre el 0,05 % y el 12 %, entre el 0,05 % y el 10 %, por ejemplo el 0,05, el 0,10, el 0,15, el 0,20, el 0,25, el 0,50, el 0,75, el 1, el 2, el 3, el 4, el 5, el 6, el 7, el 8, el 9 o el 10 % en peso de uno o más aminoácidos.
        - 60
  - 5. Película delgada de disolución rápida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que en la mezcla de excipientes,

- el polímero soluble en agua es PVA,
- el ion metálico está en forma de  $\text{ZnCl}_2$ ,
- 5 - el carboxilato es ácido cítrico,
- el agente de tamponamiento se selecciona de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y base de histidina, y
- el uno o más aminoácidos, si están presentes, se seleccionan de arginina y/o glicina.
- 10 6. Película delgada de disolución rápida según la reivindicación 5, en la que el virus es un rotavirus, y en la que el rotavirus está presente preferiblemente en la película delgada de disolución rápida de la invención en un título que oscila entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^8$  uff por dosis.
- 15 7. Película delgada de disolución rápida según la reivindicación 5 o 6, en la que la mezcla de excipientes comprende o consiste en
  - a. entre el 30 % y el 90 %, preferiblemente entre el 40 % y el 85 %, por ejemplo el 40, el 45, el 50, el 55, el 60, el 65, el 70, el 75, el 80 o el 85 % en peso de PVA,
  - 20 b. entre el 10 % y el 60 %, preferiblemente entre el 14 % y el 45 %, por ejemplo el 14, el 15, el 20, el 25, el 30, el 35, el 40, el 42 o el 45 % en peso de trehalosa,
  - c. entre el 0,01 % y el 1 %, preferiblemente entre el 0,05 % y el 0,5 %, entre el 0,08 % y el 0,25 %, entre el 0,10 % y el 0,20 %, por ejemplo el 0,10, el 0,11, el 0,12, el 0,13, el 0,14, el 0,15, el 0,16, el 0,17, el 0,18, el 0,19 o el 0,20 % en peso de  $\text{ZnCl}_2$ ,
  - 25 d. entre el 0,5 % y el 5 %, preferiblemente entre el 0,75 % y el 4 %, entre el 1 % y el 3 %, por ejemplo el 1, el 1,5, el 1,7, el 1,75, el 1,8, el 1,85, el 1,9, el 2, el 2,5 o el 3 % en peso de ácido cítrico,
  - 30 e. entre el 0,5 % y el 5 %, preferiblemente entre el 0,75 % y el 4 %, entre el 1 % y el 3 %, por ejemplo el 1, el 1,5, el 1,7, el 1,75, el 1,8, el 1,85, el 1,9, el 2, el 2,5 o el 3 % en peso de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  o base de histidina,
  - 35 f. entre el 0 % y el 10 %, preferiblemente entre el 0,05 % y el 8 %, entre el 0,10 % y el 7,5 %, entre el 0,15 % y el 7 %, por ejemplo el 0,15, el 0,20, el 0,25, el 0,50, el 0,75, el 1, el 2, el 3, el 4, el 5, el 6 o el 7 % y el 7,5 % en peso de arginina y,
  - g. entre el 0 % y el 5 %, preferiblemente entre el 0,05 % y el 4 %, entre el 0,08 % y el 3 %, por ejemplo el 0,08, el 0,10, el 0,15, el 0,20, el 0,25, el 0,5, el 0,75, el 1, el 1,5, el 2, el 2,5 o 3 el % en peso de glicina.
  - 40 8. Película delgada de disolución rápida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicha película delgada de disolución rápida comprende además un antiácido, y en la que el antiácido es preferiblemente carbonato de calcio.
  - 45 9. Película delgada de disolución rápida según la reivindicación 8, en la que la razón mezcla de excipientes:antiácido (p/p) es de desde 1:3 hasta 2:1, desde 1:2 hasta 1,5:1, desde 1:1,5 hasta 1:1, por ejemplo 1:1,5, 1:1,4, 1:1,3, 1:1,2, 1:1,1 o 1:1.
  - 50 10. Película delgada de disolución rápida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicha película delgada de disolución rápida tiene un pH de superficie de entre 5 y 9, preferiblemente entre 6,5 y 7,5.
  - 11. Película delgada de disolución rápida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que dicha película delgada de disolución rápida es adecuada para la administración oral a un paciente humano.
  - 55 12. Película delgada de disolución rápida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que dicha película delgada de disolución rápida tiene un tiempo de disolución de menos de 1 minuto, preferiblemente menos de 50 segundos.
  - 60 13. Película delgada de disolución rápida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que
    - dicha película delgada de disolución rápida tiene un grosor de menos de 500  $\mu\text{m}$ , preferiblemente menos de 400  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente menos de 300  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente todavía, menos de 250  $\mu\text{m}$ ,
    - dicha película delgada de disolución rápida tiene una superficie de entre 300 y 600  $\text{mm}^2$ , preferiblemente

entre 400 y 500 mm<sup>2</sup>, y/o

- dicha película delgada de disolución rápida tiene un contenido de humedad menor del 10 % en peso, preferiblemente menor del 9, el 8, el 7, el 6 o el 5 % en peso.

- 5 14. Película delgada de disolución rápida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en terapia.
- 10 15. Película delgada de disolución rápida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad infecciosa en un sujeto.
- 15 16. Kit que comprende la película delgada de disolución rápida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en un envase estéril e instrucciones para el uso del kit.
- 15 17. Método para preparar una película delgada de disolución rápida termoestable que comprende:  
a) preparar una disolución acuosa que comprende o consiste en  
20 - un virus,  
- uno o más polímero(s) soluble(s) en agua,  
- trehalosa,  
25 - un ion metálico,  
- un carboxilato, y  
30 - uno o más agentes de tamponamiento,  
en el que dicha disolución acuosa no comprende ningún producto de origen animal ni gelatina,  
b) ajustar el pH de la disolución acuosa a un valor comprendido entre 5 y 9,  
35 c) aplicar la disolución acuosa sobre una superficie de secado,  
d) secar la disolución acuosa para obtener una película delgada, y  
40 e) retirar la película delgada seca de la superficie de secado,  
obteniendo de ese modo dicha película delgada de disolución rápida termoestable.
- 45 18. Película delgada de disolución rápida termoestable según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que puede obtenerse mediante el método según la reivindicación 17.

FIGURA 1

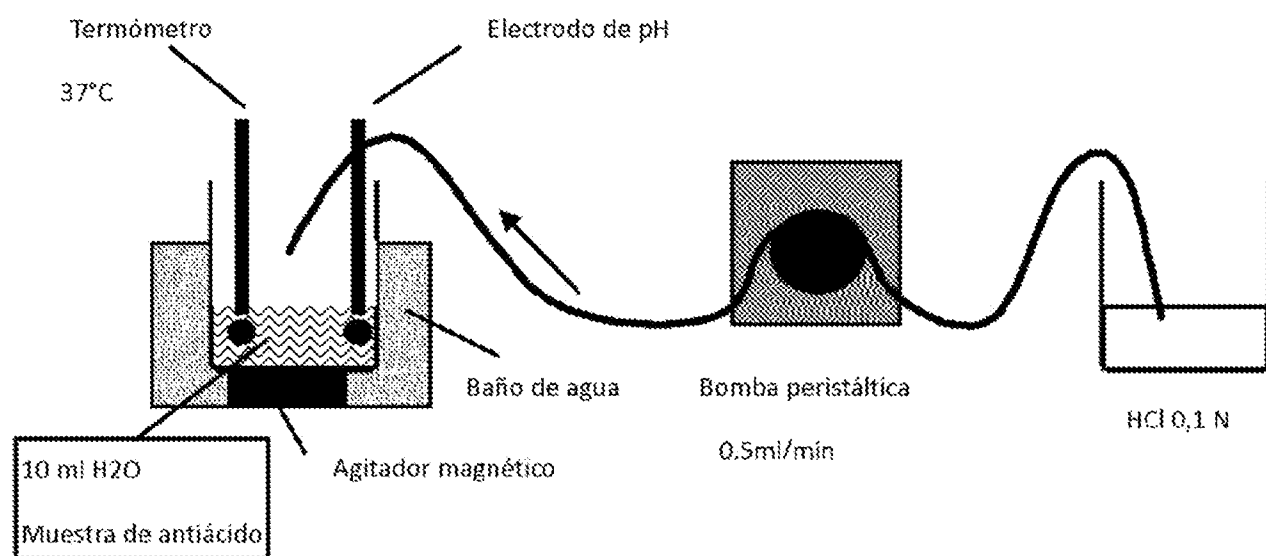


FIGURA 2

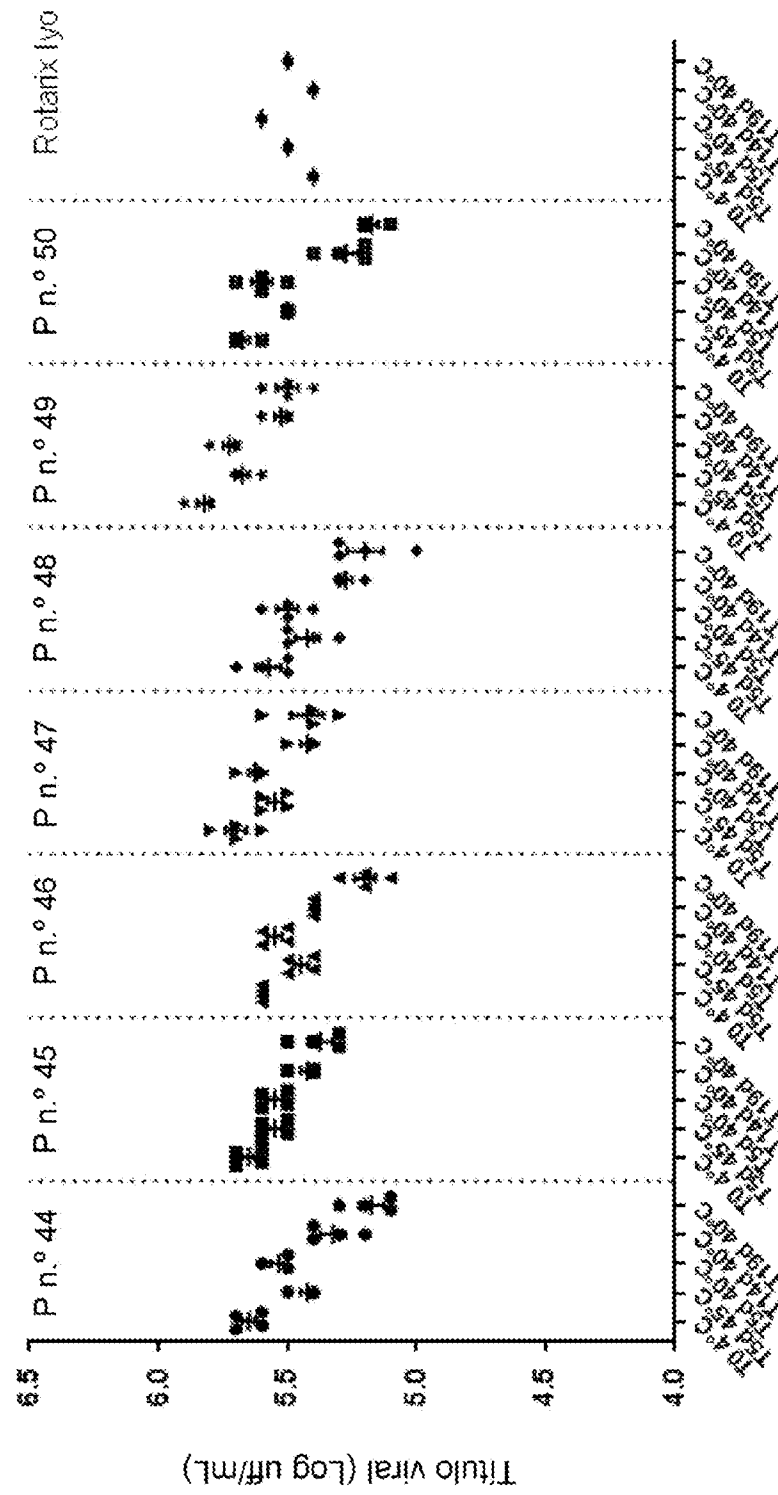


FIGURA 3A

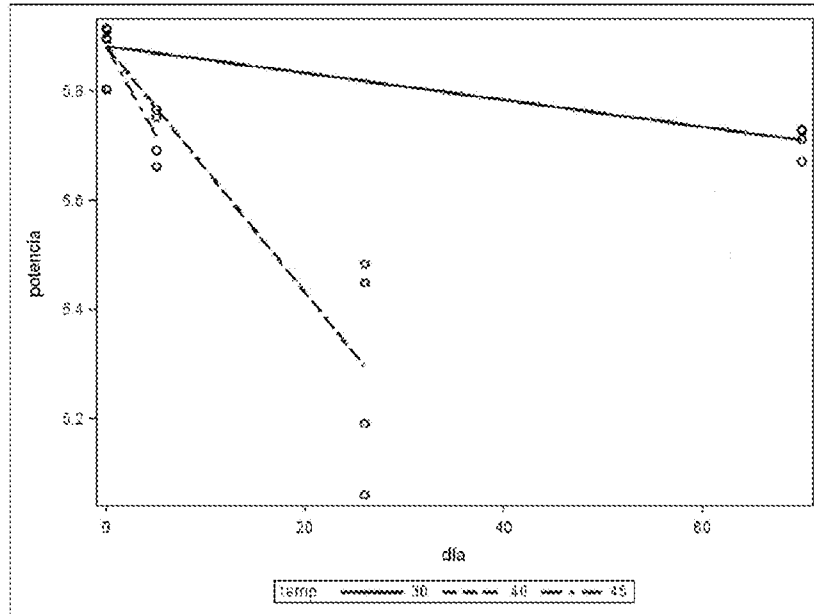


FIGURA 3B

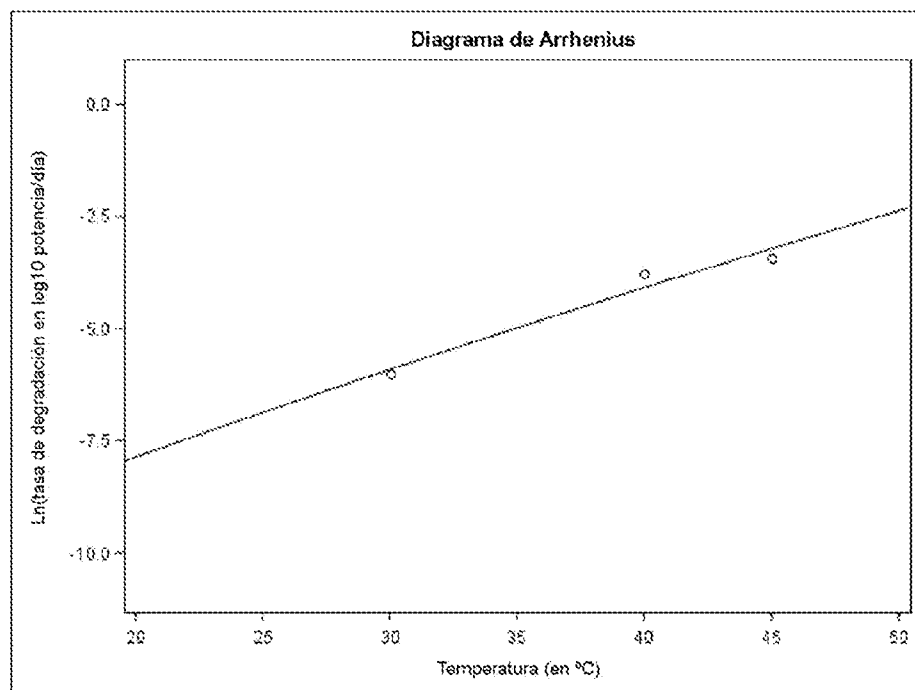


FIGURA 4

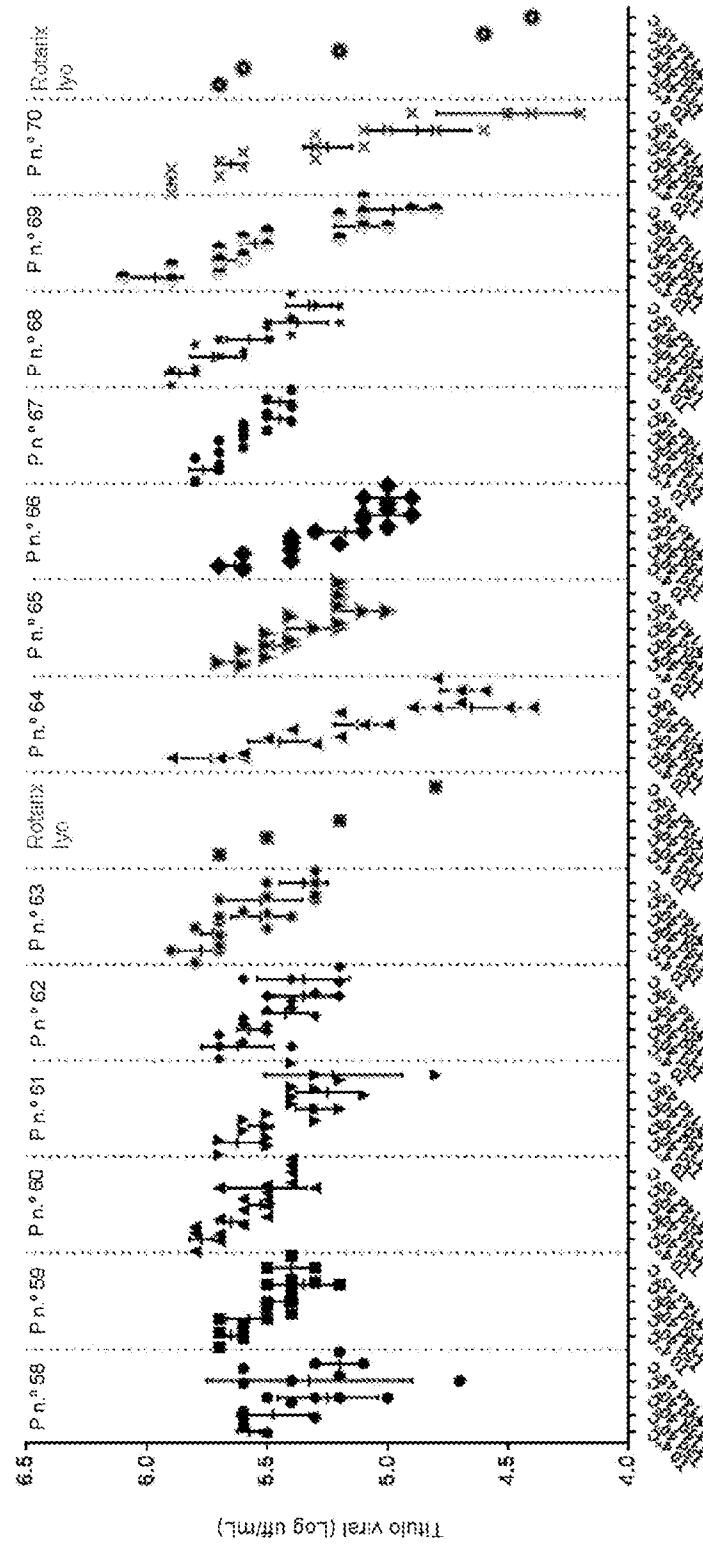


FIGURA 5

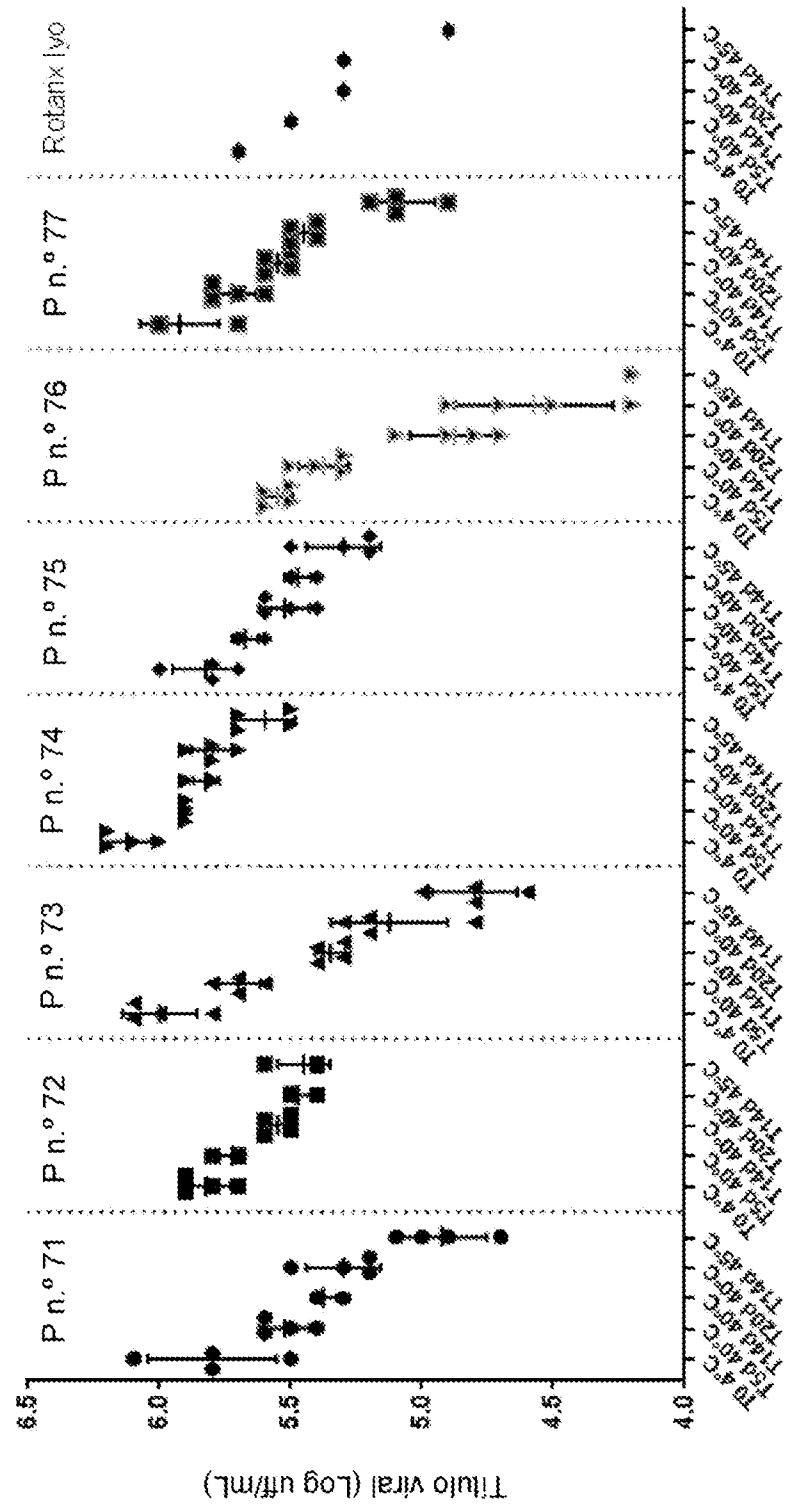


FIGURA 6

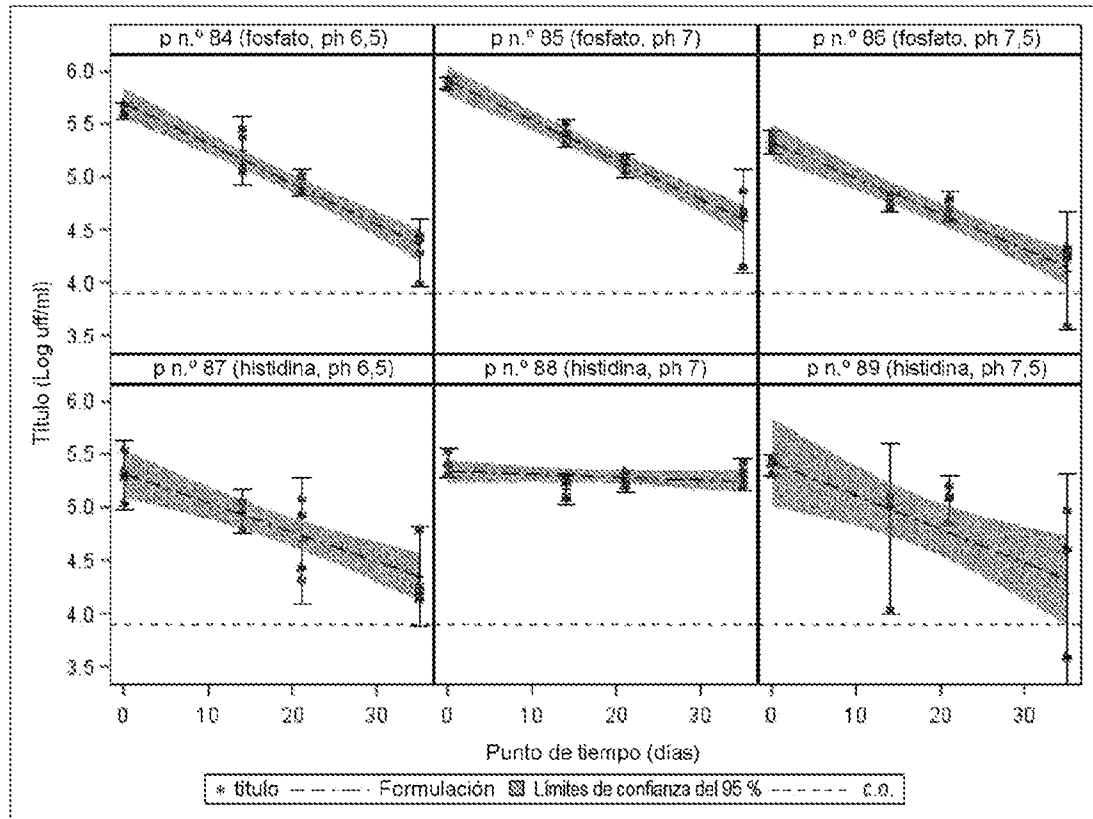


FIGURA 7

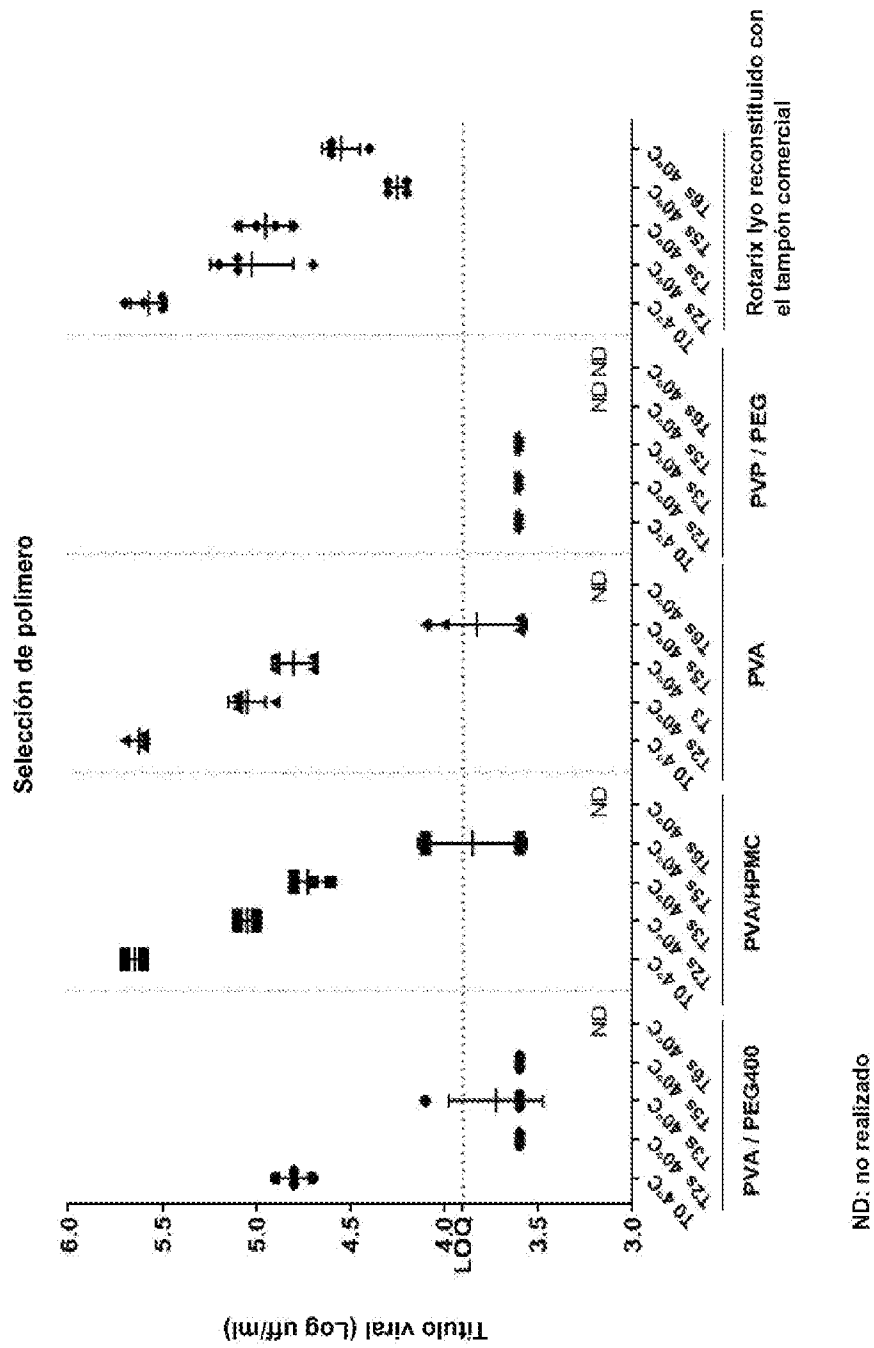


FIGURA 8

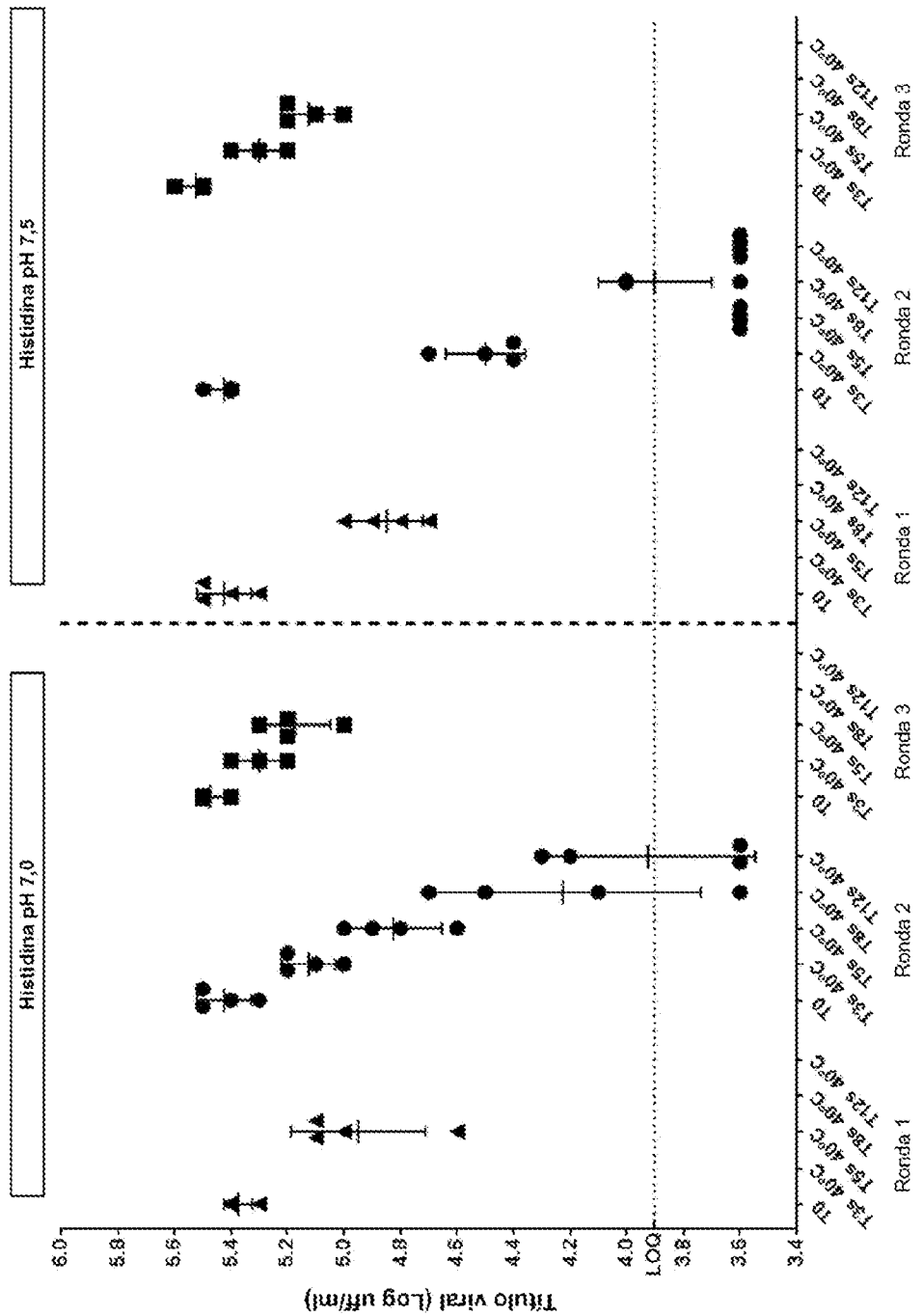


FIGURA 9

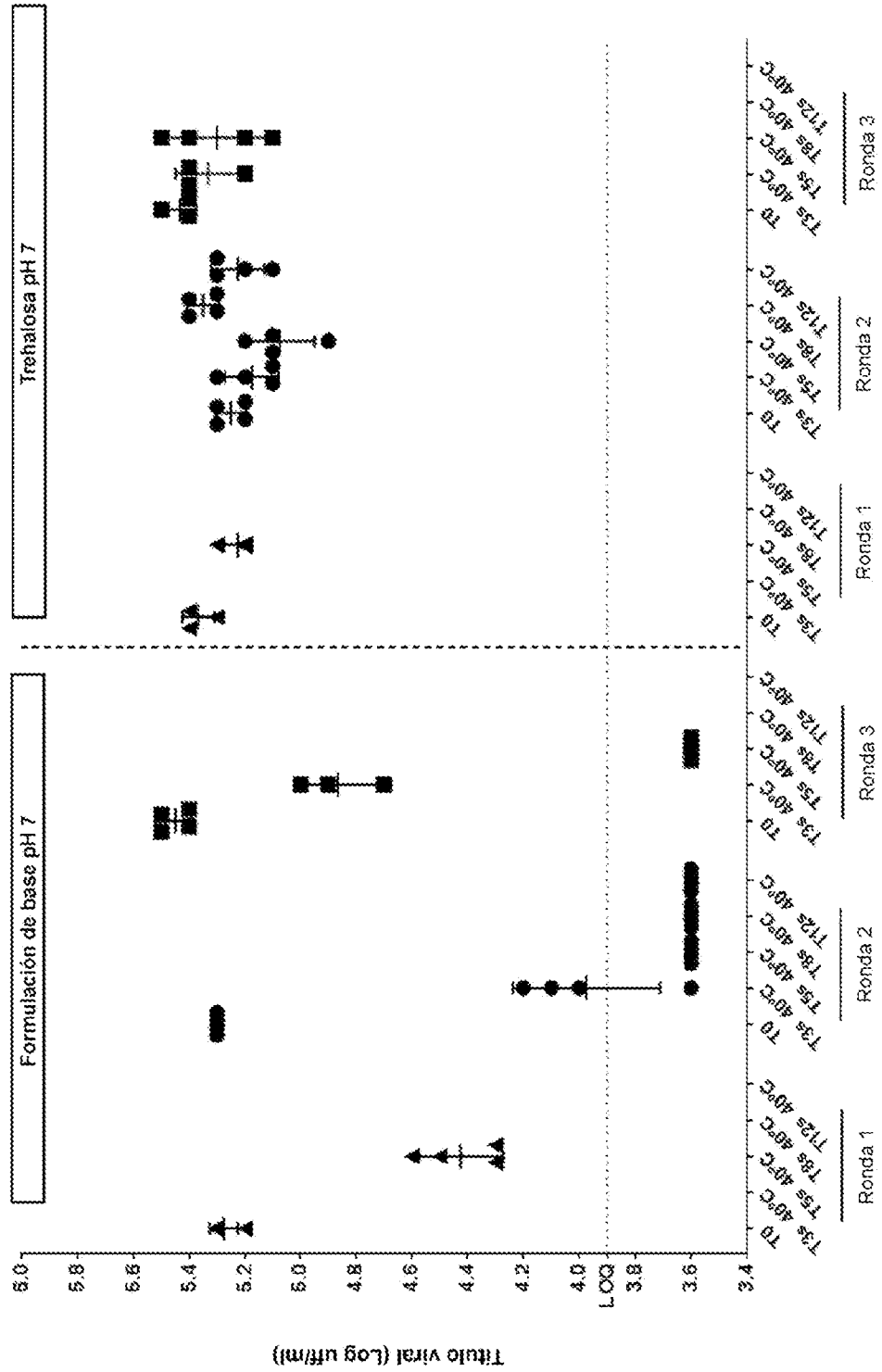


FIGURA 10

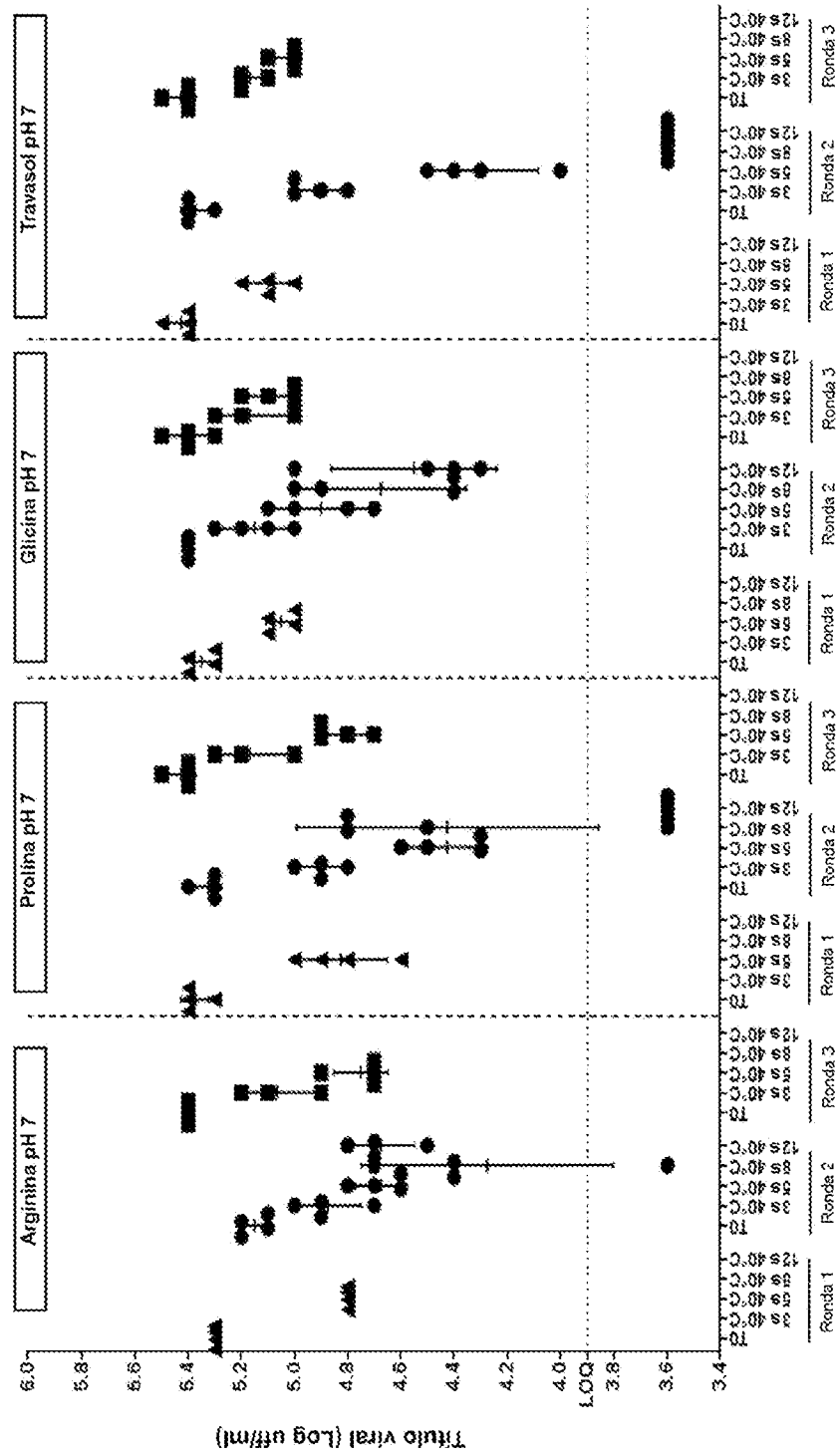


FIGURA 11

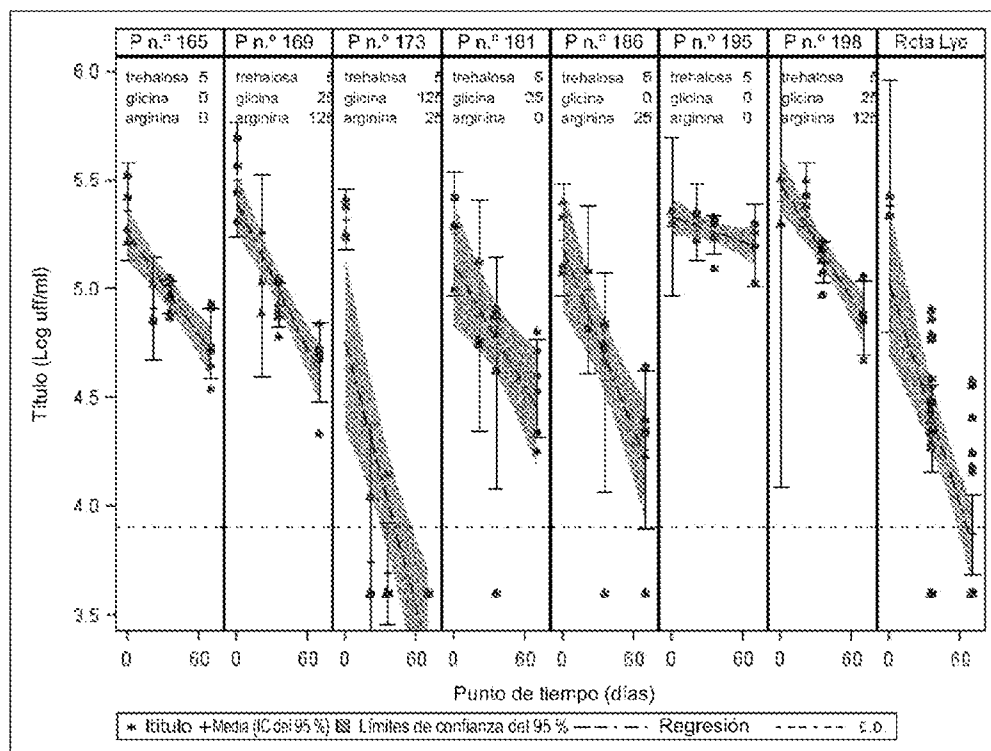


FIGURA 12

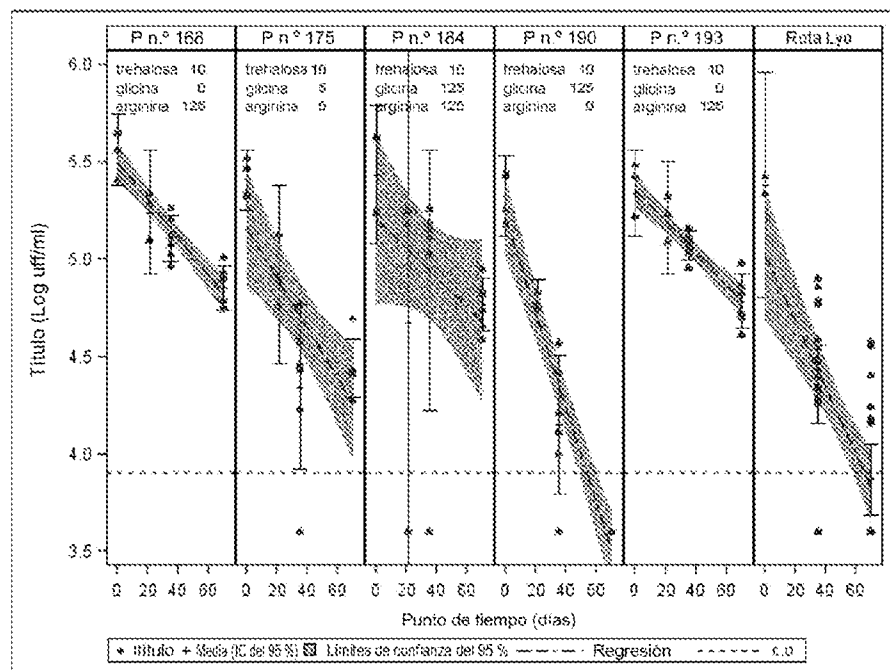


FIGURA 13

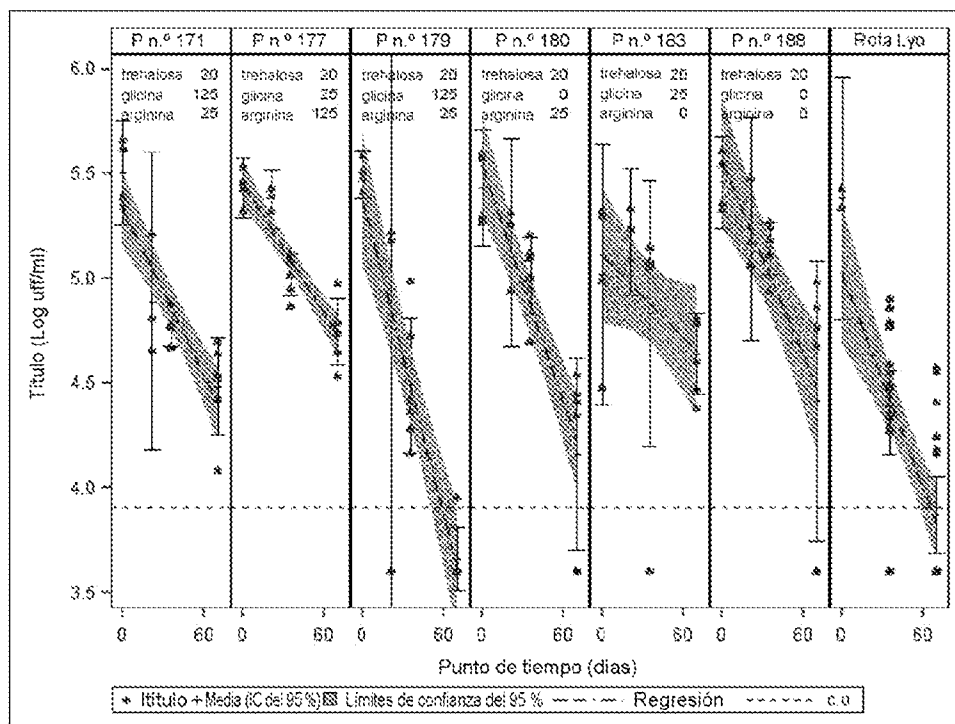


FIGURA 14

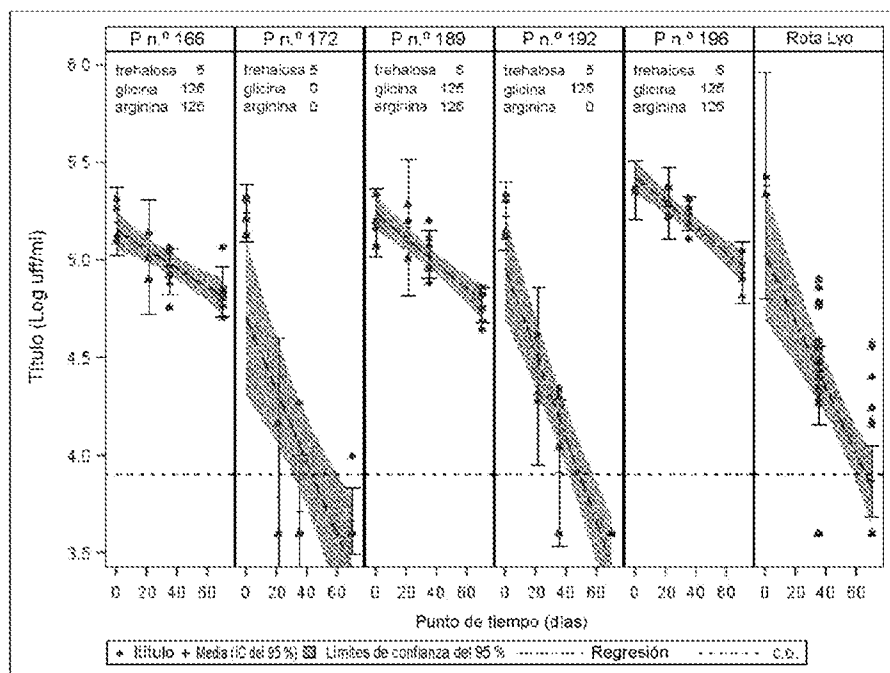


FIGURA 15

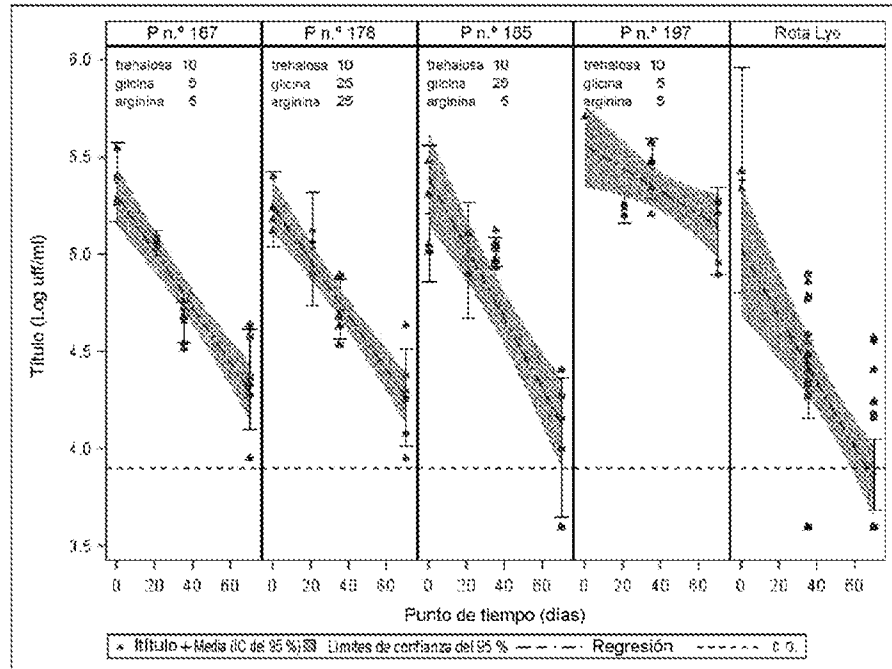


FIGURA 16

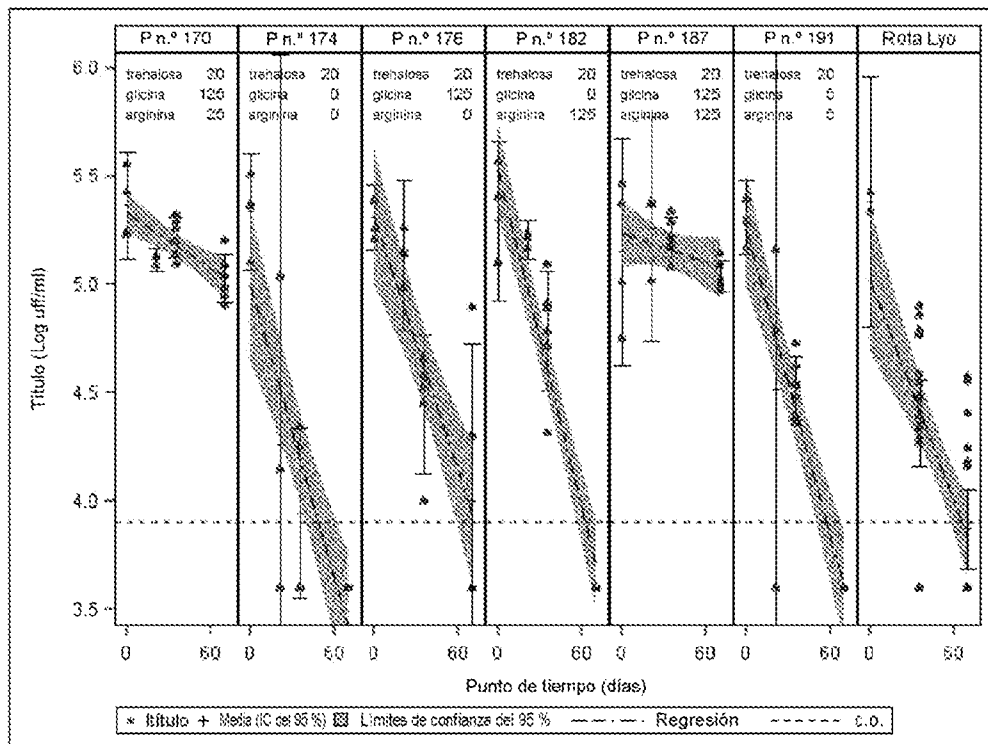


FIGURA 17

