



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0608877-5 B1



(22) Data do Depósito: 15/02/2006

(45) Data de Concessão: 09/02/2021

(54) Título: COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA DE ROTAVÍRUS LÍQUIDA, USO DE UM ANTÍGENO DE ROTAVÍRUS, UM AÇÚCAR E UM CARBOXILATO, E, MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE ROTAVÍRUS LÍQUIDA

(51) Int.Cl.: A61K 39/15; A61P 1/00.

(30) Prioridade Unionista: 17/02/2005 GB 0503337.8.

(73) Titular(es): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S. A..

(72) Inventor(es): VINCENT VANDE VELDE.

(86) Pedido PCT: PCT EP2006001442 de 15/02/2006

(87) Publicação PCT: WO 2006/087205 de 24/08/2006

(85) Data do Início da Fase Nacional: 17/08/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA DE ROTAVÍRUS LÍQUIDA, USO DE UM ANTÍGENO DE ROTAVÍRUS, UM AÇÚCAR E UM CARBOXILATO, MÉTODOS PARA A PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DE DOENÇAS ASSOCIADAS AO ROTAVÍRUS EM SERES HUMANOS, E PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE ROTAVÍRUS LÍQUIDA. A invenção fornece formulações de rotavírus líquidas que são adequadas para a administração oral aos bebês humanos. Em particular a invenção fornece composições farmacêuticas e vacinas, compreendendo um antígeno de rotavírus, um açúcar e um carboxilato em que a dita formulação tem um pH entre o pH 5,0 e pH 8,0 e não compreende fosfato ou menos do que 5 mM de fosfato. A invenção também fornece métodos de preparar as ditas formulações de rotavírus e o uso destas na prevenção ou tratamento de doenças associadas ao rotavírus em seres humanos.

“COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA DE ROTAVÍRUS LÍQUIDA, USO DE UM ANTÍGENO DE ROTAVÍRUS, UM AÇÚCAR E UM CARBOXILATO, E, MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE ROTAVÍRUS LÍQUIDA”

CAMPO TÉCNICO

[0001] A presente invenção diz respeito a novas formulações de rotavírus líquidas que são úteis como composições farmacêuticas e vacinas, ao método para prepará-las e ao seu uso em prevenir rotavírus, em particular doenças associadas ao rotavírus humano.

FUNDAMENTOS TÉCNICOS

[0002] A diarreia infecciosa, aguda é uma principal causa de doença e morte em muitas áreas do mundo. Em países em desenvolvimento, o impacto da doença diarreica é muito importante. Para a Ásia, África e América Latina, foi estimado que existem entre 3 a 4 bilhões de casos de diarreia a cada ano e destes casos cerca de 5 a 10 milhões resultam em morte (Walsh, J.A. *et al.*: N. Engl. J. Med., 301:967-974 (1979)).

[0003] Os rotavírus foram reconhecidos como uma das causas mais importantes de diarreia severa em bebês e crianças jovens (Estes, M.K. Rotaviruses and Their Replication in Fields Virology, Terceira Edição, editado por Fields *et al.*, Raven Publishers, Filadélfia, 1996). É estimado que a doença por rotavírus é responsável por mais de 600.000 mortes anualmente. A doença induzida por rotavírus o mais comumente afeta crianças entre 6 e 24 meses de idade, e a prevalência máxima da doença no geral ocorre durante os meses mais frios em climas temperados, e durante o ano todo em áreas tropicais. Os rotavírus são tipicamente transmitidos de pessoa a pessoa pela via fecal-oral com um período de incubação de cerca de 1 a cerca de 3 dias. Diferentemente da infecção no grupo de 6 meses a 24 meses de idade, os recém nascidos no geral são assintomáticos ou têm apenas doença suave. Ao contrário da doença severa normalmente encontrada em crianças jovens, a

maioria dos adultos são protegidos como um resultado da infecção por rotavírus prévia de modo que a maioria de infecções em adulto são suaves ou assintomáticas (Offit, P.A. *et al.* Comp. Ther., 8(8):21-26, 1982).

[0004] Os rotavírus são esféricos, e seu nome é derivado de sua estrutura de capsídeo de revestimento duplo ou externa e interna distintiva. Tipicamente, a estrutura de capsídeo de revestimento duplo de um rotavírus circunda um revestimento de proteína interno ou núcleo que contém o genoma. O genoma de um rotavírus é composto de 11 segmentos de RNA de filamento duplo que codificam pelo menos 11 proteínas virais distintas. Duas destas proteínas virais designadas como VP4 (proteína P) e VP7 (proteína G) são proteínas estruturais arranjadas no exterior da estrutura de capsídeo de revestimento duplo. O capsídeo interno do rotavírus apresenta uma proteína, que é a proteína de rotavírus designada VP6. A importância relativa destas três proteínas de rotavírus particulares em evocar a resposta imune que segue a infecção por rotavírus ainda não está clara. Não obstante, a proteína VP6 determina o antígeno do grupo e subgrupo, e as proteínas VP4 e VP7 são os determinantes da especificidade do sorotipo.

[0005] Até agora, pelo menos 14 sorotipos G de rotavírus e 11 sorotipos P de rotavírus foram identificados (Linhares A.C. & Bresse J.S., Pan. Am. J. Publ. Health 2000, 9, 305-330). Entre estes, 10 sorotipos G e 6 sorotipos P foram identificados entre o rotavírus humano.

[0006] A proteína VP7 é uma glicoproteína de 38.000 MW (34.000 MW quando não glicosilada) que é o produto traducional do segmento genômico 7, 8 ou 9, dependendo da cepa. Esta proteína estimula a formação do anticorpo neutralizante principal a seguir da infecção por rotavírus. A proteína VP4 é uma proteína não glicosilada de aproximadamente 88.000 MW que é o produto traducional do segmento genômico 4. Esta proteína também estimula o anticorpo neutralizante a seguir da infecção por rotavírus. Visto que as proteínas VP4 e VP7 são as proteínas virais contra as quais os

anticorpos neutralizantes são direcionados, acredita-se que elas sejam candidatos primários para o desenvolvimento de vacinas contra rotavírus, fornecendo proteção contra a doença por rotavírus.

[0007] A infecção natural por rotavírus durante a primeira infância é conhecida evocar imunidade protetiva.

[0008] O desenvolvimento da primeira vacina para prevenir infecções por rotavírus começou nos anos 70 depois da descoberta do vírus. Inicialmente, as cepas atenuadas de animais e seres humanos foram estudadas, embora esforços mais recentes tenham focado em recontaminantes humanos-animais.

[0009] O desenvolvimento de novas formulações de rotavírus deve cumprir várias necessidades, incluindo potencial de distribuição e estabilidade pelo mundo inteiro sob uma faixa ampla de condições ambientais e de armazenamento. Em particular, a estabilidade de uma formulação, especialmente de uma composição farmacêutica e de vacina, no geral será melhor em temperaturas mais baixas comparadas às temperaturas ambientes e mais baixas.

[0010] Consequentemente um método de estabilização foi desenvolver formulações de vacina que pode ser armazenadas congeladas (-20°C a -70°C) ou alternativamente desenvolver vacinas liofilizadas que podem ser mantidas durante um período prolongado de tempo em torno da temperatura de refrigerador (2°C a 8°C). Entretanto, é um fato conhecido que o processo de liofilização tenha uma capacidade limitante, e esteja associado com um custo de produção alto. Além disso, as vacinas liofilizadas têm um manejo mais sofisticado para a administração visto que elas podem requerer dispositivos mais complexos, consequentemente relativamente caros tais como vacinas em multicâmara/frasco, com o ingrediente ativo em uma câmara e o líquido de reconstituição em uma outra câmara. As vacinas liofilizadas também são associadas com custo de carregamento e

armazenamento mais alto. Estas opções podem ser inadequadas para alguns países no mundo em desenvolvimento onde o dispositivo de administração tem que ser financeiramente de preço acessível e onde a disponibilidade da infra-estrutura de produção e armazenamento pode ser inexistente ou não confiável.

[0011] Visto que os rotavírus são convencionalmente administrados oralmente aos bebês humanos, esta via trás vários desafios às composições de rotavírus imunogênicas.

[0012] O rotavírus é rapidamente inativado em um ambiente ácido, em exposição ao tampão ácido ou suco gástrico ácido por exemplo (C. Weiss e H.F. Clark, 1985, J. Gen. Virol., 66, 2725-2730; T. Vesikari *et al.*, 1984, The Lancet, página 700; R.H. Foster e A.J. Wagstaff, 1998, BioDrugs Feb: 9(2) 155-178). Portanto é desejável que as composições de rotavírus sejam formuladas em um modo que elas sejam estáveis durante o armazenamento e depois da administração no receptor hospedeiro.

[0013] As vacinas contra rotavírus são principalmente intencionadas a serem administradas aos bebês, já na idade de 4 semanas. Um volume de dose de vacina pequeno, tal como mais baixo do que 2 ml ou ainda do que o volume de dose de 1,5 ml, será vantajoso para esta população. Portanto, é desejável que as composições de rotavírus sejam formuladas em um volume de dose pequeno.

[0014] As formulações estabilizantes para vacinas virais líquidas são conhecidas. Por exemplo, a EP 0 065 905 no geral divulga composições estabilizantes adequadas para uma série de vírus tais como aqueles que causam sarampo ou influenza, e em particular ela divulga soluções contendo tampão de fosfato estabilizantes adequadas para vírus atenuado vivo.

[0015] Outras formulações estabilizantes são divulgadas na WO 98/13065 e em Clark *et al.* (Pediatr Infect Dis J. 2003 Oct; 22(10):914-20). Tais formulações também requerem, entre outros constituintes, a presença de

fosfato para agir como um agente tamponante para neutralizar a acidez estomacal. Estas formulações entretanto não são compatíveis com as necessidades apresentadas acima para o desenvolvimento bem sucedido de uma formulação de rotavírus, especificamente elas não são compatíveis com um volume reduzido da dose de vacina que é melhor adequada para um bebê humano. Em particular, o presente inventor descobriu que adaptando esta formulação da técnica anterior em um ajuste de volume baixo tal como 1,5 ml ou mais baixo, embora mantendo capacidade antiácida eficiente, leva a problemas que surgem da concentração inapropriada dos constituintes da formulação, em particular tampão de fosfato.

[0016] Portanto existe uma necessidade para desenvolver formulações de rotavírus alternativas, em particular formulações líquidas alternativas que podem suportar a acidez gástrica, e são estáveis no refrigerador apesar da ausência de fosfato. Além disso existe uma necessidade de que tais formulações alternativas também sejam formuladas com êxito em um volume de dose de vacina tão pequeno quanto possível.

[0017] Portanto a presente invenção não apenas fornece composições imunogênicas estáveis alternativas que são desprovidas de fosfato ou contêm apenas quantidades mínimas de fosfato, mas também permitem que o rotavírus seja formulado em um volume de dose baixo que são adequadas para a administração oral aos bebês humanos.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0018] Figura 1 - Curvas de titulação de ácido base padrão para quatro carboxilatos

[0019] Figura 2A - Capacidade antiácida de várias formulações contendo adipato

[0020] Figura 2B - Configuração experimental do ensaio de Baby Rossett-Rice

[0021] Figura 3 - Índice refrativo de formulações contendo adipato. A

Figura 3A mostra que na etapa de tampão de adipato o valor alvo é sacarose a 58,5 % p/p que fornece um índice refrativo de 1,4578 na mistura. A Figura 3B mostra que na etapa de formulação final o alvo é sacarose a 55 % p/p que leva a um índice refrativo de 1,4480.

[0022] Figura 4 - Visão geral do projeto de estudo clínico de Fase II

DECLARAÇÃO DA INVENÇÃO

[0023] Consequentemente, em um primeiro aspecto da presente invenção, é fornecida uma composição imunogênica de rotavírus líquida que é adequada para a administração oral a um bebê humano, compreendendo um antígeno de rotavírus, um açúcar e um carboxilato em que a dita composição tem um pH entre cerca do pH 5,0 e cerca do pH 8,0 e compreende menos do que 5 mM de fosfato. Apropriadamente a concentração de fosfato na composição reivindicada não excede 1 mM.

[0024] Em um aspecto específico da invenção, uma dose de vacina adequada normalmente será de 1,5 ml ou apropriadamente qualquer volume menor do que 2,5 ml tal como um volume de 2 ml ou menos, que é adequado para a administração oral aos recém-nascidos ou bebês. Em particular o volume de dose será tal que a viabilidade técnica da formulação é possível e não existe nenhum efeito prejudicial no potencial imunogênico da formulação. As composições reivindicadas oferecem a vantagem sobre as formulações contendo fosfato da técnica anterior que elas podem suportar a acidez gástrica, permanecem imunogênicas e estáveis durante uma vida de prateleira longa, embora sendo compatíveis com a formulação em um volume de dose menor do que o usual, tal como menor do que 2,0 ml ou ainda compatível com um volume de dose de 1,5 ml ou menor.

[0025] Em uma forma de realização específica, a composição imunogênica líquida de acordo com a invenção tem uma capacidade antiácida entre 6 e 23 minutos como avaliado pelo ensaio de Baby Rossett-Rice (adaptado como detalhado no Exemplo III.2.2 a partir do teste de Rossett-

Rice básico). Apropriadamente a capacidade antiácida será pelo menos de 8 minutos, tipicamente pelo menos 12 minutos, e uma faixa adequada é entre 12 e 20 minutos. Surpreendentemente, as composições reivindicadas têm mostrado uma capacidade antiácida não apenas aceitável mas mais alta mesmo em um volume de dose menor, comparadas às formulações da técnica anterior contendo fosfato.

[0026] Em um outro aspecto, é fornecido um método para a preparação da dita composição imunogênica de rotavírus líquida compreendendo misturar um antígeno de rotavírus, um açúcar e um carboxilato com um diluente farmaceuticamente aceitável.

[0027] A invenção também abrange em um outro aspecto o uso de um antígeno de rotavírus em mistura com um carboxilato e um açúcar para a fabricação de uma composição imunogênica oral para a prevenção ou tratamento de doenças associadas ao rotavírus em seres humanos em que a dita composição não contém mais do que 5 mM de fosfato e tem um pH entre cerca do pH 5,0 e cerca do pH 8,0.

[0028] Ainda em um outro aspecto um método de tratar ou prevenir doenças associadas ao rotavírus em seres humanos administrando-se a um paciente humano em necessidade deste uma quantidade eficaz da dita composição imunogênica líquida também é fornecido.

[0029] Outros aspectos e vantagens da presente invenção são descritos ainda na descrição detalhada seguinte das formas de realização preferidas desta.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0030] O presente inventor desenvolveu novas composições de rotavírus líquidas que são imunogênicas, estáveis na temperatura de refrigerador (entre 2 e 7°C, tipicamente a 4°C), que podem suportar a natureza ácida inerente do estômago quando administradas oralmente e que são compatíveis com um volume de dose pequeno.

[0031] Uma composição líquida é intencionada a significar uma formulação em uma forma fluida, em oposição a uma forma seca, cujo volume é fixo sob condições específicas constantes (por exemplo, na temperatura ambiente ou temperatura de refrigerador, na pressão atmosférica) e cuja forma é determinada pelo recipiente que ela enche.

[0032] A matéria de estudo e informação divulgadas dentro das publicações e patentes ou pedidos de patente mencionados neste relatório descritivo são incorporadas por referência aqui.

[0033] Os termos ‘compreendendo’, ‘compreendem’ e ‘compreende’ aqui são intencionados pelo inventor a serem opcionalmente substituíveis com os termos ‘que consiste de’, ‘consistem de’, e ‘consiste de’, respectivamente, em cada exemplo.

[0034] A presente invenção leva em consideração uma composição imunogênica de rotavírus líquida compreendendo um antígeno de rotavírus, um açúcar e um carboxilato em que a dita composição tem um pH entre cerca do pH 5,0 e cerca do pH 8,0 e compreende menos do que 5 mM de fosfato. As composições da invenção mostram um perfil de estabilidade muito bom quando comparadas às formulações contendo fosfato, embora o perfil de imunogenicidade seja mantido. Estas composições são pelo menos tão estáveis quanto suas contrapartes contendo fosfato. Uma outra vantagem das presentes composições é que elas podem ser preparadas em um volume de dose pequeno tal como mais baixo do que 2,0 ml, tipicamente 1,5 ml por exemplo, comparadas às formulações da técnica anterior em que o fosfato está presente.

[0035] Em uma forma de realização específica, a concentração de fosfato dentro da composição imunogênica não excede 5 mM, apropriadamente 1 mM, em particular ela não excede 0,5 mM. Fosfato refere-se como o sal do ácido fosfórico (também conhecido como ácido ortofosfórico (H_3PO_4)), usualmente sódio ou potássio ou mistura de sais de

sódio e potássio são usados (por exemplo: Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4). Appropriadamente, a concentração de fosfato é de 0,4 mM ou abaixo, tipicamente 0,2 mM ou abaixo, idealmente 0,1 mM ou abaixo. Em uma outra forma de realização específica, a composição como reivindicado aqui é isenta de fosfato. Tipicamente fosfato, quando presente, vem do meio de cultura celular ou tampão salino usados como um diluente, tal como DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco), meio basal BME de Eagle ou PBS.

[0036] A concentração de fosfato à qual ela é referida por todo o relatório descritivo será uma concentração calculada, como determinado a partir da(s) quantidade(s) de produtos químicos contendo fosfato operados na preparação da(s) composição(ões) reivindicada(s). Alternativamente, a concentração de fosfato presente na composição como reivindicado aqui pode ser medida experimentalmente usando técnicas analíticas de rotina.

[0037] Uma técnica adequada é um ensaio colorimétrico denominado 'Nanocolor' comercializado por Macherey-Nagel (catálogo nº 918 78). Este método é fundamentado na determinação fotométrica do complexo amarelo formado por ácido fosfórico-molibdato-vanadato em uma solução ácida. O limite de quantificação do ensaio é de 2 µg/ml de fosfato ou 0,02 mM.

[0038] Um método alternativo é a dosagem de fósforo (P) por uma técnica de espectroscopia de emissão atômica tal como Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES) (Boss & Fredeen, em Concepts, Instrumentation, and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy, Perkin Elmer eds, segunda edição, 1997 - ver a Metodologia na página 72 à frente). O limite de quantificação do ensaio é 0,030 µg/ml de fósforo correspondendo a uma concentração de fosfato de 0,00032 mM.

[0039] Em uma forma de realização, o pH da composição está entre pH 5,0 e pH 8,0. Em uma outra forma de realização específica, o pH da

composição reivindicada está entre cerca do pH 5,5 a cerca do pH 7,5. Por ‘cerca do pH’ é significado dentro de 0,2 unidades do valor do pH estabelecido. Em particular, o pH da composição está entre pH 5,5 e pH 7,5. Por exemplo, o pH da composição está entre cerca do pH 6,0 a cerca do pH 7,0, em particular entre o pH 6,0 e pH 7,0, tipicamente entre pH 6,2 e pH 6,8 ou entre o pH 6,2 e pH 6,6. Um pH de cerca de 6,4, em particular de 6,4, é considerado. É conhecido que o rotavírus é negativamente afetado em pH ácido tal como um pH abaixo de 4,0, e seria esperado que uma estabilidade máxima é obtida em um pH neutro ou ainda levemente básico, isto é, uma faixa do pH de 7,0 a 8,0, que é obtida por exemplo nas formulações tamponadas de fosfato da técnica anterior. Como mostrado na seção experimental, as composições da invenção, apesar da ausência de fosfato, têm mostrado um bom perfil de estabilidade na faixa do pH reivindicada, e além disso surpreendentemente têm mostrado um perfil de estabilidade e imunogenicidade aceitável mesmo sob condições suavemente ácidas, isto é, em torno do pH 6,0 a 7,0, tal como em um pH em torno de 6,4 por exemplo.

[0040] A composição líquida como reivindicado aqui compreende um carboxilato.

[0041] O carboxilato “(-COO⁻)” é a forma dissociada do ácido carboxílico que resulta da neutralização da função de ácido (“-COOH”) por uma substância básica. Um ácido carboxílico é um composto contendo o grupo carboxila:” -COOH”; que é formalmente fabricado combinando-se o grupo carbonila (“-CO-”) e um grupo hidroxila (“-OH”). Entretanto, a interação entre estas duas partes modifica deste modo suas propriedades químicas que o grupo inteiro é considerado como uma nova função com suas próprias propriedades características (Organic Chemistry by J.B. Hendrickson, D.J. Cram, e G.S. Hammond, McGraw-Hill Book Company, terceira edição 1970 página 131). Embora a International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC) recomendasse usar a nomenclatura ácido

alcanóico (para ácidos monocarboxílicos) e ácido alcanodióico (para ácidos dicarboxílicos), a maioria de nomes triviais dos ácidos carboxílicos foram usados neste texto porque estes produtos são bem conhecidos pela pessoa habilitada na Técnica. Por exemplo o nome IUPAC de acético ácido é o ácido etanóico e para ácido adípico o nome será ácido hexanodióico.

[0042] Em uma forma de realização específica, um sal de carboxilato de um ácido inorgânico ou, apropriadamente, de um ácido orgânico é usado. Em uma forma de realização específica, o dito carboxilato é derivado de um ácido fraco. Por exemplo, o dito carboxilato é um sal de carboxilato selecionado do grupo que consiste de: adipato, citrato, malato, acetato, succinato, propionato, butirato, malonato, glutarato, maleato, glicolato, lactato, gluconato, fumarato, tartarato, pimelato e qualquer combinação de dois ou mais destes. Os carboxilatos adequados são carboxilatos derivados de um ácido carboxílico com um $pK_a > 4$ ou carboxilatos derivados de um ácido di- ou tri-carboxílico (di- ou tri-carboxilatos) com um pK_a médio numérico > 4 (Tabela 9). Os exemplos da classe formadora incluem carboxilatos derivados de ácido propínico, butírico e acético. Os exemplos da última classe incluem carboxilatos derivados de ácido cítrico, maléico, malônico, succínico, adípico, glutárico e málico.

[0043] Em uma forma de realização específica o dito carboxilato pertence à lista de GRAS, isto é, carboxilatos que são ‘Generally Recognized As Safe by the Food and Drug Administration of the USA’, e é selecionado da lista compreendendo acetato, propionato, malato, glutarato, adipato, lactato, fumarato, e tartrato. Apropriadamente o carboxilato é um sal de ácido adípico, isto é, sal de monossódio de ácido adípico, sal de monopotássio de ácido adípico, apropriadamente atipato de dissódio ou atipato de dipotássio, ou adipato de cálcio.

[0044] Em uma forma de realização específica, uma concentração de carboxilato entre 50 mM a 2 M é apropriadamente usada na composição de

rotavírus líquida. Será entendido que a concentração de carboxilato dentro da faixa mencionada acima pode ser apropriadamente adaptada, através de experimentação de rotina, de acordo com a natureza do carboxilato, a capacidade antiácida para ser obtido e o volume da dose de vacina. Por exemplo, concentrações de carboxilato altas de acima de 1 M podem ser usadas quando um potencial antiácido alto é necessário, tal como acima de 8 minutos, apropriadamente acima 10 minutos, ou acima de 12 minutos como avaliado pelo teste Baby Rossett Rice para um volume de dose de 1,5 ml. Concentrações de 1 M ou abaixo são tipicamente usadas, tais como concentrações entre 100 mM e 1 M, tipicamente concentrações entre 200 mM e 800 mM. Concentrações de carboxilato adequadas são compreendidas entre cerca de 300 mM e cerca de 800 mM, apropriadamente entre 400 mM e 700 mM. Em particular, quando o carboxilato é adipato uma faixa de concentração adequada está entre 400 e 500 mM. Entretanto, a pessoa habilitada reconhecerá que concentrações dentro de 10 a 20 por cento dos valores estabelecidos podem ser apropriadas, isto é, quando 100 mM for estabelecido, uma faixa de 80 a 90 mM a 110 a 120 mM também é divulgada e significada ser abrangida. Concentrações ilustrativas são dadas na Tabela 1 abaixo para vários carboxilatos.

Tabela 1 - Capacidade antiácida de carboxilatos em uma concentração específica

[0045] Estes parâmetros ilustrativos são dados para um volume de dose de 1,5 ml e correspondem ao número de exemplo mencionado dado na Tabela 1.

Carboxilato (Mw)	Concentração de Carboxilato (M)	pH em BRR em t = 0	Capacidade antiácida (min)*	Amostra Nº no Exemplo II
Adipato (144)	0,372	6,38	8	91
Adipato (144)	0,465	6,24	12	92
Adipato (144)	0,548	6,50	16	93
Adipato (144)	0,652	6,11	20	94
D,L-malato (132)	0,621	6,15	8	72
D,L-malato (132)	0,746	6,08	12	64
D,L-malato (132)	0,895	5,35	15	77
Acetato (59)	1,000	6,14	12	89

Citrato (189)	0,441	6,55	12	129
---------------	-------	------	----	-----

*avaliado pelo teste Baby Rossett Rice (BRR) como adaptado de acordo com o Exemplo III.2.2

[0046] O pH da composição imunogênica de rotavírus líquida como reivindicado aqui pode ser obtido por mistura de um ácido carboxílico e um sal de carboxilato. Em particular, o ácido carboxílico pode ser usado em mistura com um sal de carboxilato diferente, por exemplo, um citrato é combinado com ácido adípico. Isto pode ser vantajoso quando do uso de produtos químicos comercialmente disponíveis, alguns dos quais podem não estar prontamente disponíveis, ou para simplificar a etapa de formulação. Por exemplo, um (ou mais) do(s) dito(s) ácido(s) carboxílico(s) podem ser selecionados da lista que consiste de: ácido adípico, ácido cítrico, ácido málico, ácido acético, ácido succínico, ácido carbônico, ácido propiônico, ácido butírico, ácido malônico, ácido glutárico, ácido maléico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido glucônico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido pimélico, e é (são) misturado(s) em proporções adequadas com um (ou mais) de sais de carboxilato selecionados da lista que consiste de: adipato, citrato, malato, acetato, succinato, propionato, butirato, malonato, glutarato, maleato, glicolato, lactato, gluconato, fumarato, tartarato, pimeliato.

[0047] A composição líquida como reivindicado aqui compreende um açúcar. Sacarose é particularmente adequada. Dextrose é um outro açúcar adequado. Outros açúcares ou álcoois de açúcar também podem ser usados no lugar de sacarose ou dextrose, incluindo por exemplo: glicerol, eritrose, eritriol, xilitol, arabitól, ribose, xilose, arabinose, glicose, tagalose, manose, galactose, frutose, inositol, sorbitol, manitol, galactitol, mistura de glicose e frutose, maltose, soforose, lactose, celobiose, melibiose, trealose, sacarose, palatinose, maltulose, lactulose, maltitol, lactitol, rafinose, maltotriose, melezitose, celotriose, ciritol, maltotetraose, estaquiase, celotetraose, maltopentaose, celopentaose, maltoexaose, celoexaose, oligossacarídeos.

[0048] Concentrações de açúcar típicas variam de cerca de 1 % p/p a

cerca de 70 % p/p, por exemplo de cerca de 25 % p/p a cerca de 60 % p/p. A pessoa habilitada entretanto reconhecerá que a natureza e concentração do açúcar devem ser otimizadas tal que ela garante viabilidade viral satisfatória embora mantendo a viscosidade em um nível que é compatível com etapas de processamento a jusante da formulação, tal como filtração. Em uma forma de realização específica, a sacarose é usada. Tipicamente, sua concentração é mantida em um mínimo de 30 % p/p. As concentrações de sacarose mais altas, isto é, acima de 30 % p/p, além disso podem ser usadas para garantir armazenamento a longo prazo, como esperado que a pressão iso-osmótica alta de tais formulações impedirá o crescimento bacteriano. Consequentemente, o limite inferior para a concentração de sacarose na composição líquida como reivindicado aqui é apropriadamente 30 % p/p ou mais alto, tal como 35 % p/p ou mais alto, apropriadamente 40 % p/p ou mais alto. Uma concentração de sacarose adequada varia de cerca de 40 % p/p a cerca de 70 % p/p. Por exemplo, uma concentração adequada de sacarose será entre 45 % p/p e 60 % p/p, apropriadamente entre 50 % p/p e 55 % p/p. Em particular, a sacarose em uma concentração de cerca de 50 % p/p ou cerca de 55 % p/p é usada. Concentrações de sacarose finais de 50 % p/p ou 55 % p/p são adequadas.

[0049] A pessoa habilitada entenderá que otimização de rotina da concentração de açúcar pode ser realizada de modo a garantir estabilidade viral quando um outro açúcar é substituído no lugar de sacarose.

[0050] Além disso, os valores estabelecidos para açúcares podem ser levemente adaptados para tomar em consideração parâmetros de formulação/fabricação tais como o volume de dose. Portanto, a pessoa habilitada reconhecerá que concentrações dentro de 10 % dos valores estabelecidos podem ser apropriados, isto é, quando 50 % p/p for estabelecido, uma faixa de 45 % p/p a 55 % p/p também é divulgado e significado a ser abrangido.

[0051] A composição imunogênica de rotavírus líquida da presente

invenção também compreende um antígeno de rotavírus. Em particular a composição líquida como reivindicado aqui é uma composição imunogênica, por exemplo, uma composição de vacina. Um antígeno de rotavírus é entendido a significar qualquer antígeno de rotavírus que é adequado para o uso em uma formulação de vacina. Os antígenos de rotavírus vivo orais são especialmente considerados. Por exemplo, qualquer antígeno de rotavírus adequado pode ser selecionado do grupo que consiste de: um rotavírus atenuado vivo de animais ou seres humanos, em particular um rotavírus atenuado vivo humano; um rotavírus recontaminante, em particular mas não limitado a um rotavírus recontaminante humano-humano, um rotavírus recontaminante bovino-humano ou um rotavírus recontaminante de macaco reso-humano.

[0052] Todas as cepas de rotavírus, cepas humanas ou animais, são consideradas na presente invenção. Cepas de rotavírus humano são adequadas. Em particular, o antígeno de rotavírus é em uma forma de realização a população de rotavírus humano atenuado compreendendo uma única variante ou substancialmente uma única variante, a dita variante sendo definida pela seqüência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma das principais proteínas virais designadas como VP4 e VP7 como divulgado na WO 01/12797, em particular qualquer uma, incluindo uma ou mais, das variantes definidas pelas mutações apresentadas na Tabela 2, Tabelas 3.1 e 3.2 da WO 01/12797. Em formas de realização específicas, o antígeno de rotavírus é qualquer uma das cepas de rotavírus atenuado vivo humano seguintes: cepa HRV 89-12C2 depositada sob o número de acesso ATCC VR 2272 (como descrito na EP 0 557 427), sua progenia, recontaminantes e derivados imunologicamente ativos destes; cepa HRV P43 depositada sob número de acesso ECACC 99081301 (como descrito na WO 01/12797), sua progenia, recontaminantes e derivados imunologicamente ativos destes.

[0053] Populações de rotavírus tendo as características de qualquer

uma das cepas depositadas mencionadas acima também são cepas de vacina adequadas. Derivados das ditas cepas depositadas podem ser obtidos submetendo-se as ditas cepas a outro processamento tal como propagando-as por outra passagem, clonagem, ou outros procedimentos usando o vírus vivo ou modificando-se as ditas cepas depositadas em qualquer modo incluindo por técnicas de engenharia genética ou técnicas recombinantes. Tais etapas e técnicas são bem conhecidas no ramo. Antígenos de rotavírus de interesse particular são progenia de qualquer uma das ditas cepas depositadas e derivados imunologicamente ativos destas. Derivados imunologicamente ativos significam materiais obtidos de ou com qualquer uma das cepas depositadas, em particular de ou com a cepa HRV P43 depositada sob número de acesso ECACC 99081301, particularmente antígenos do vírus, que são capazes de evocar uma resposta imune que é reativa contra rotavírus quando injetada em um animal hospedeiro.

[0054] Materiais derivados das cepas depositadas relatadas acima também são antígenos de rotavírus adequados, e incluem proteína e material genético. De interesse particular são rotavírus recontaminantes que compreendem pelo menos um antígeno ou pelo menos um segmento de qualquer uma das ditas cepas depositadas, por exemplo recontaminantes que compreendem uma cepa virulenta de rotavírus em que uma ou parte de um dos 11 segmentos de genoma foi substituída pelo segmento de genoma ou parte deste de qualquer uma das ditas cepas depositadas. Especificamente, um rotavírus recontaminante em que o segmento ou segmento parcial que codifica NSP4 é um segmento ou segmento parcial de qualquer uma das ditas cepas depositadas, pode ter propriedades úteis. Os rotavírus recontaminantes e técnicas para prepará-los são bem conhecidos (Foster, R. H. e Wagstaff, A. J. Tetravalent Rotavirus Vaccine, a review. ADIS drug evaluation, BioDrugs, Gev, 9 (2), 155-178, 1998).

[0055] O antígeno de rotavírus da composição reivindicada pode ser

produzido de acordo com técnicas de produção de rotina. Tipicamente preparações de antígeno de rotavírus podem ser derivadas de métodos de cultura de tecido usados para propagar o vírus ou expressar antígenos de rotavírus recombinantes. Substratos celulares adequados para o crescimento do vírus incluem por exemplo células do rim de cachorro tais como MDCK ou células de um clone de MDCK, células semelhantes a MDCK, células do rim de macaco tais como células AGMK incluindo células Vero que são particularmente adequadas, outras linhagens de células de origem de rim de macaco tais como BSC-1, LLC-MK2 e MA104, linhagens de célula de porco adequadas, ou qualquer outro tipo de célula mamífera adequado para a produção de rotavírus para propósitos de vacina. Os substratos celulares adequados também incluem células humanas por exemplo células MRC-5. Os substratos celulares adequados não são limitados a linhagens de célula; por exemplo células primárias também são incluídas.

[0056] Também dentro do escopo da invenção estão misturas de qualquer uma das cepas depositadas relatadas acima com outras variantes de rotavírus, por exemplo outras variantes clonadas ou outro rotavírus recontaminante, ou com outros vírus em particular outros vírus atenuados. Em particular a composição de acordo com a invenção contém dois antígenos de rotavírus. Em particular um antígeno dentro da composição é a cepa HRV P43 depositada sob número de acesso ECACC 99081301, e o outro antígeno é um derivado recontaminante desta ou qualquer derivado imunologicamente ativo desta.

[0057] O antígeno de rotavírus para a inclusão na composição reivindicada pode ser uma cepa de rotavírus monovalente, isto é, contendo uma única cepa de rotavírus, ou ser multivalente, isto é, contendo pelo menos duas ou mais cepas de rotavírus.

[0058] A pessoa habilitada entenderá que outras cepas atenuadas prontamente disponíveis, de origem humana ou animal, que são obtíveis de

instituições de depósito também são adequadas e podem ser usadas como substitutos para as cepas depositadas relatadas.

[0059] De acordo com a presente invenção, uma composição imunogênica adequada contém um antígeno de rotavírus, em particular a cepa P43 atenuada humana (como depositado sob número de acesso ECACC 99081301, ver a WO 01/12797) em uma concentração de 10^5 a 10^6 ffu por dose (ou equivalente a $10^{5,5}$ a $10^{6,5}$ como expressado em CCID50 por dose), 55 % de sacarose p/p, adipato de dissódio 0,465 M (correspondendo a 132,74 mg por dose), e tem um pH de cerca de 6,2 a 6,6, em um volume de dose de 1,5 ml. Para esta composição o teor de DMEM é de 6 % p/p e portanto representa menos do que 0,1 mM de fosfato.

[0060] A composição de acordo com a presente invenção pode incluir ainda um componente antiácido adicional tal como um antiácido inorgânico, por exemplo hidróxido de alumínio $\text{Al}(\text{OH})_3$ e hidróxido de magnésio $\text{Mg}(\text{OH})_2$. O hidróxido de alumínio é um particularmente adequado. Outros antiácidos comercialmente disponíveis, que são adequados para o uso na invenção, incluem Mylanta[®], que contém hidróxido de alumínio e hidróxido de magnésio. Estes são insolúveis em água e são fornecidos em suspensão. Um outro antiácido particularmente adequado que pode ser adicionalmente usado na composição de vacina da presente invenção é o sal inorgânico insolúvel, carbonato de cálcio (CaCO_3). Uma concentração de CaCO_3 típica é 80 mg por dose de vacina por exemplo.

[0061] Outros antiácidos insolúveis em água adequados são carbonato de magnésio, carbonato de alumínio, fosfato de alumínio, mistura de hidróxido de alumínio e carbonato de magnésio, alumínio-magnésio-hidricarbonato, hidróxido de alumínio-carbonato de magnésio-sorbitol-manitol, hidróxi-alumínio-sódio-carbonato, dihidróxi-alumínio-potássio-carbonato, magaldrato, hidrotalcita, almagcita, magnésio-alumínio-silicato-hidrato.

[0062] A composição imunogênica de acordo com a presente invenção

adicionalmente pode compreender compostos e/ou carregadores farmacêuticamente adequados, em particular aqueles conhecidos na técnica como sendo adequados para a administração oral, especialmente aos bebês. Tais carregadores incluem e não são limitados a carboidratos, poliálcoois, aminoácidos, hidróxido de alumínio, hidróxido de magnésio, hidroxiapatita, talco, óxido de titânio, hidróxido de ferro, estearato de magnésio, carboximetilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, celulose microcristalina, gelatina, peptona vegetal, xantana, caragenano, goma arábica, β -ciclodextrina.

[0063] A composição de acordo com a presente invenção adicionalmente pode compreender íons cálcio que foram sugeridos para estabilizar rotavírus.

[0064] Agentes viscosos adicionalmente podem ser incluídos presentes na composição.

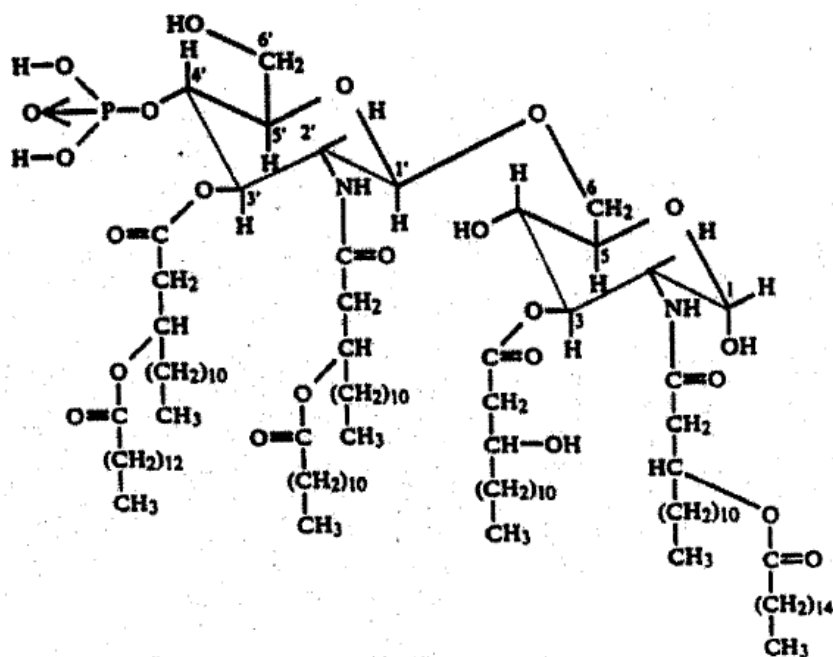
[0065] Agentes viscosos possíveis que podem ser usados incluem excipientes pseudoplásticos. Os agentes viscosos adequados incluem: propileno glicol, goma arábica, goma de tragacanto, ágar-ágar, alginato, pectina, carboximetilcelulose de sódio (Tyloses C[®]), metilcelulose (Methocels A[®], Viscotrans MC[®], Tylose MH[®] e MB[®]), hidroxipropilmetilcelulose (Klucels[®]), hidroxipropilcelulose (Methocels E[®] e K[®], Viscotrans MPHC[®]), Carbopol[®], goma xantana, Veegum[®] (silicato de magnésio-alumínio), Avicel[®] (cerca de 89 % de celulose microcristalina e 11 % de Carboximetilcelulose Na). Goma xantana ou amido são agentes viscosos particularmente adequados para o uso adicional na composição líquida de acordo com a invenção.

[0066] Também pode ser vantajoso incluir na composição reivindicada veículos com base em lipídeo tais como virossomos ou lipossomos, emulsões óleo em água ou partículas carregadoras. Alternativamente ou além disso imunostimulantes tais como aqueles conhecidos em the técnica para as vacinas orais podem ser incluídos na composição. Tais imunostimulantes incluem toxinas bacterianas, particularmente toxina do cólera (CT) na forma da holotoxina (molécula inteira) ou a cadeia B apenas (CTB) e a enterotoxina lábil ao calor de *E.*

coli (LT). As LTs mutadas (mLTs) que são menos prováveis a converter à sua forma ativa do que a LT nativa são descritas na WO 96/06627, WO 93/13202 e US 5.182.109.

[0067] A composição de acordo com a invenção pode compreender ainda um adjuvante ou imunestimulante tal como mas não limitado a lipídeo A desintoxicado de qualquer fonte e derivados não tóxicos de lipídeo A, saponinas e outros reagentes capazes de estimular uma resposta tipo TH1.

[0068] Por muito tempo foi conhecido que o lipopolissacarídeo enterobacteriano (LPS) é um estimulador potente do sistema imune, embora seu uso em adjuvantes fosse reduzido por seus efeitos tóxicos. Um derivado não tóxico de LPS, monofosforil lipídeo A (MPL), produzido pela remoção do grupo carboidrato central e do fosfato da glicosamina de extremidade reduzida, foi descrito por Ribí *et al* (1986, Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p407-419) e na estrutura seguinte:



[0069] Uma outra versão desintoxicada de MPL resulta da remoção da cadeia de acila da posição 3 da cadeia principal de dissacarídeo, e é chamado monofosforil lipídeo A 3-O-desacilado (3D-MPL). Ele pode ser purificado e preparado pelo métodos mostrados em GB 2122204B, referência esta que também divulga a preparação de difosforil lipídeo A, e variantes 3-

O-desaciladas deste.

[0070] Uma forma adequada de 3D-MPL está na forma de uma emulsão tendo um tamanho de partícula pequeno menor do que 0,2 µm em diâmetro, e seu método de fabricação é divulgado na WO 94/21292. As composições aquosas compreendendo monofosforil lipídeo A e um tensoativo foram descritas na WO9843670A2.

[0071] Os adjuvantes derivados de lipopolissacarídeo bacterianos a serem formulados nas composições da presente invenção podem ser purificados e processados de fontes bacterianas, ou alternativamente eles podem ser sintéticos. Por exemplo, o monofosforil lipídeo A purificado é descrito em Ribi *et al* 1986 (supra), e monofosforil ou difosforil lipídeo A 3-O-desacilado derivado de *Salmonella sp.* é descrito em GB 2220211 e US 4912094. Outros lipopolissacarídeos purificados e sintéticos foram descritos (Hilgers *et al.*, 1986, Int. Arch. Allergy. Immunol., 79(4):392-6; Hilgers *et al.*, 1987, Immunology, 60(1):141-6; e EP 0 549 074 B1). Um adjuvante de lipopolissacarídeo bacteriano particularmente adequado é 3D-MPL.

[0072] Consequentemente, os derivados de LPS que podem ser usados na presente invenção são aqueles imunoestimulantes que são similares em estrutura àquele de LPS ou MPL ou 3D-MPL. Em um outro aspecto da presente invenção os derivados de LPS podem ser um monossacarídeo acilado, que é uma sub-porção para a estrutura acima de MPL.

[0073] Os derivados sintéticos de lipídeo A também são conhecidos incluindo, mas não limitados a:

[0074] OM174 (2-desóxi-6-o-[2-desóxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-o-fosfono-β-D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]-α-D-glucopiranosildiidrogenofosfato), (WO 95/14026)

[0075] OM294 DP (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1,10-

bis(diidrogenofosfato) (WO99/64301 e WO 00/0462)

[0076] OM197 MP-Ac DP (3S-, 9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1-diidrogenofosfato 10-(6-aminoexanoato) (WO 01/46127)

[0077] As saponinas purificadas como adjuvantes orais são descritas na WO 98/56415. As saponinas e monofosforil lipídeo A podem ser utilizados separadamente ou em combinação (por exemplo WO 94/00153) e podem ser formulados em sistemas adjuvantes juntamente com outros agentes. 3DMPL é um adjuvante bem conhecido fabricado por Ribi Immunochem, Montana e sua fabricação é descrita em GB 2122204.

[0078] Um outro imunoestimulante preferido para o uso na presente invenção é a saponina Quil A e seus derivados. As saponinas são mostradas em: Lacaille-Dubois, M e Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol 2 páginas 363-386). As saponinas são glicosídeos de esteróide ou triterpeno amplamente distribuídos nos reinos de planta e animal marinho. As saponinas são observadas para formar soluções coloidais em água que espumam em agitação, e para precipitar o colesterol. Quando as saponinas estão próximas a membranas celulares elas criam estruturas semelhantes a poro na membrana que faz com que a membrana rompa-se. A hemólise dos eritrócitos é um exemplo deste fenômeno, que é uma propriedade de algumas, mas não todas, saponinas.

[0079] As saponinas são conhecidas como adjuvantes em vacinas para a administração sistêmica. A atividade adjuvante e hemolítica de saponinas individuais foi extensivamente estudada na técnica (Lacaille-Dubois e Wagner, *supra*). Por exemplo, Quil A (derivado da casca da árvore da América do Sul Quillaja Saponaria Molina), e frações desta, são descritas na US 5.057.540 e “Saponins as vaccine adjuvants”, Kensil, C. R., *Crit Rev Ther*

Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2):1-55; e EP 0 362 279 B1. As estruturas particuladas, denominadas Complexos Estimulantes Imunes (ISCOMS), compreendendo frações de Quil A são hemolíticas e foram usadas na fabricação de vacinas (Morein, B., EP 0 109 942 B1; WO 96/11711; WO 96/33739). As saponinas hemolíticas QS21 e QS17 (frações purificadas em HPLC de Quil A) foram descritas como adjuvantes sistêmicos potentes, e o método de sua produção é divulgado na Patente US Nº 5.057.540 e EP 0 362 279 B1. QS-21 é uma saponina natural derivada da casca de *Quillaja saponaria* Molina, que induz células T citotóxicas CD8+ (CTLs), células Th1 e uma resposta de anticorpo de IgG2a predominante e é uma saponina adequada no contexto da presente invenção. Outras saponinas que foram usadas em estudos de vacinação sistêmicos incluem aquelas derivadas de outras espécies de planta tais como Gypsophila e Saponaria (Bomford *et al.*, Vaccine, 10(9):572-577, 1992).

[0080] Um sistema realçado envolve a combinação de um derivado de lipídeo A não tóxico e um derivado de saponina particularmente a combinação de QS21 e 3D-MPL como divulgado na WO 94/00153, ou uma composição menos reatogênica onde a QS21 é extinta com colesterol como divulgado na WO 96/33739. As saponinas que formam parte da presente invenção podem ser separadas na forma de micelas, ou podem estar na forma de estruturas ordenadas grandes tais como ISCOMs (EP 0 109 942 B1) ou lipossomos) quando formuladas com colesterol e lipídeo, ou na forma de uma emulsão óleo em água (WO 95/17210). As saponinas apropriadamente podem ser associadas com um sal metálico, tal como hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio (WO 98/15287).

[0081] Uma composição de adjuvante particularmente potente envolvendo QS21 e 3D-MPL em uma emulsão óleo em água é descrita na WO 95/17210 e na WO 99/11241 e WO 99/12565, e são composições adequadas.

[0082] Um debate geral de veículos e adjuvantes para a imunização oral pode ser encontrado em Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach, editado por Powell e Newman, Plenum Press, Nova Iorque, 1995.

[0083] A composição de vacina de acordo com a invenção pode conter componentes adicionais incluindo por exemplo flavorizantes (particularmente para uma vacina oral) e agentes bacteriostáticos.

[0084] Em uma forma de realização específica, a composição líquida de acordo com a invenção tem uma capacidade antiácida entre 6 e 23 minutos como avaliado pelo ensaio de Baby Rossett-Rice (adaptado como detalhado no Exemplo III.2.2 a partir do teste de Rossett-Rice básico). De acordo com a presente invenção, por 'capacidade antiácida' é significado o período de tempo, expressado em minutos, durante o qual o pH da formulação sob teste permanece acima de 4 como avaliado de acordo com o procedimento experimental fornecido no Exemplo III.2.2. Apropriadamente a capacidade antiácida será entre 12 e 20 minutos. Uma capacidade antiácida mais alta do que 23 minutos tal como 29 a 30 minutos por exemplo também é perfeitamente aceitável de uma perspectiva de desenvolvimento de vacina mas uma tal capacidade alta é supérflua. Em particular, uma capacidade antiácida de pelo menos 8 minutos, pelo menos 10 minutos, pelo menos 12 minutos é especialmente considerada. Uma capacidade antiácida de pelo menos 12 minutos, pelo menos 13 minutos, pelo menos 14 minutos, pelo menos 15 minutos, pelo menos 16 minutos, é adequada. É conhecido que o estômago de bebês pequenos que não se alimentaram durante um período de três horas é muito ácido, e que o rotavírus é negativamente afetado por uma tal pH ácido. Em nossas posses, quando do trabalho com uma formulação de volume baixo, que é desejável, foi impossível medir a capacidade antiácida de formulações contendo fosfato clássicas, visto que a solubilidade do fosfato foi facilmente excedida e a cristalização dos constituintes ocorreu durante a formulação e/ou armazenamento a curto prazo. Ao contrário, as composições

reivindicadas surpreendentemente mostraram uma capacidade antiácida aceitável mas mais alta mesmo em um volume de dose menor, comparado às formulações da técnica anterior contendo fosfato.

[0085] Em uma outra forma de realização específica, a dita composição imunogênica líquida é estável sob pelo menos uma das condições seguintes: durante 7 dias a 37°C, durante um ano a 4°C, durante 18 meses a 4°C, durante dois anos a 4°C. De acordo com a presente invenção, a estabilidade de uma composição dada é avaliada medindo-se o título viral (isto é, estabilidade viral), de acordo com o procedimento apresentado no exemplo III.1, depois do armazenamento da formulação durante um período definido de tempo em uma temperatura dada. A estabilidade da composição pode ser avaliada por um teste de estabilidade acelerada, por exemplo depois do armazenamento da formulação durante uma semana a 37°C. A estabilidade da composição alternativamente pode ser avaliada durante um período mais longo de tempo, tal como durante vários meses, na temperatura de refrigerador (entre 2 e 7°C, tipicamente a 4°C) ou na temperatura ambiente (20 a 22°C). Sob estas condições, uma composição estável é aquela que tem uma perda de título de rotavírus máxima de 1 como expressado em $\log_{10}$ ffu/dose nas condições de teste definidas. As composições particularmente adequadas são aquelas em que um máximo de 0,5 $\log_{10}$, por exemplo 0,4 ou menos, 0,3 ou menos, 0,2 ou menos ou apropriadamente 0,1 $\log_{10}$ ffu por dose de vacina, é perdido no teste de estabilidade acelerada a 37°C durante uma semana.

[0086] Alternativamente, a composição imunogênica líquida como reivindicado aqui pode ser congelada e armazenada congelada a -20°C ou abaixo, ou a -70°C durante vários anos, e permanecem estáveis a 4°C durante pelo menos um ano no descongelamento. Tipicamente a formulação congelada será estável durante pelo menos 6 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 2 anos, ou pelo menos 3 anos, e

permanecem estáveis a 4°C durante pelo menos um ano, apropriadamente 18 meses ou 2 anos no descongelamento.

[0087] A composição de acordo com a presente invenção é uma composição imunogênica, por exemplo uma vacina. Por exemplo, a composição reivindicada imunogênica é capaz, tipicamente depois de uma, apropriadamente duas doses separadas por um ou dois meses, para evocar uma resposta imune por exemplo recepção de vacina excelente e uma resposta de IgA específica de rotavírus no soro. 'Recepção de vacina' é definida como a porcentagem de pacientes que exibem uma resposta sorológica, por exemplo aparecimento de IgA no soro para rotavírus em soros de pós imunização em um título ≥ 20 U/ml (ELISA), e/ou com propagação de rotavírus (ELISA) em qualquer amostra de fezes. A recepção de vacina pode ser definida como propagação do vírus da vacina em qualquer amostra de fezes coletada entre a primeira dose e até 1 a 2 meses depois da segunda dose. Em uma forma de realização específica, a vacina de acordo com a invenção é capaz de diminuir a ocorrência de qualquer gastroenterite por rotavírus, e preferivelmente severa, quando comparada ao placebo. Tipicamente a vacina é capaz para conferir proteção cruzada contra cepas circulantes outras que não aquela presente na vacina. Tipicamente, quando a vacina contém uma cepa tipo G1 tal como aquela da P43 de vírus humano atenuado, um resposta imune é induzida a G1 e pelo menos um dos sorotipos que não G1 selecionados do grupo que consiste de: sorotipos G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11, G12, G13 e G14. Apropriadamente uma vacina contendo uma cepa de G1 é capaz de conferir proteção contra cepas tanto de G1 quanto que não de G1, tais como as cepas de G2, G3 e/ou G4, e em particular contra o sorotipo G9 globalmente emergente.

[0088] Em uma forma de realização específica, a dita gastroenterite ou gastroenterite severa é causada por uma cepa de rotavírus de um sorotipo diferente àquele contido na composição reivindicada. Em particular, se a cepa

de rotavírus presente na composição reivindicada for um sorotipo G1, tal como mas não limitado à cepa de rotavírus atenuado vivo humano HRV P43 (ECACC 99081301), a prevenção é conferida contra gastroenterite ou gastroenterite severa causada por uma cepa de rotavírus de um sorotipo G1 e também por uma cepa de rotavírus de um sorotipo que não G1, por exemplo por uma cepa de rotavírus tendo um sorotipo selecionado da lista que consiste de: G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11, G12, G13 e G14. Em uma forma de realização particular, a composição imunogênica reivindicada aqui é capaz de induzir uma resposta imune contra, e/ou fornecer proteção contra gastroenterite ou gastroenterite severa causada por, pelo menos um, apropriadamente todos os sorotipos que não G1 seguintes: G2, G3, G4 e G9. Em uma outra forma de realização específica, se a cepa de rotavírus presente na composição reivindicada for um tipo de rotavírus P[8], tal como mas não limitada à cepa de rotavírus atenuado vivo humano HRV P43 (ECACC 99081301), a prevenção é conferida contra gastroenterite ou gastroenterite severa causada por uma cepa de rotavírus de um tipo P[8] e por um tipo que não P[8], por exemplo por uma cepa de rotavírus tendo um sorotipo selecionado da lista que consiste de: tipos P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P9 e P11. Em particular, a composição imunogênica reivindicada aqui é capaz de induzir uma resposta imune contra, e/ou fornecer proteção contra gastroenterite ou gastroenterite severa causada por, pelo menos um, apropriadamente todos os tipos que não P[8] seguintes: P4, P6. Em uma outra forma de realização, a composição reivindicada é capaz de induzir um resposta imune a, e/ou fornecer proteção contra gastroenterite ou gastroenterite severa causada por, uma cepa de rotavírus de um tipo G diferente e um tipo P diferente àquela presente na composição administrada. Especificamente, a composição reivindicada compreende uma cepa de rotavírus G1P[8] e também é capaz de induzir uma resposta imune a, e/ou fornecer proteção contra gastroenterite ou gastroenterite severa causada por,

uma cepa de rotavírus G2P[4].

[0089] Apropriadamente a composição de acordo com a invenção é administrada por administração oral. Apropriadamente a composição é fornecida em um dispositivo de dose única, tal como um frasco de vidro ou plástico ou seringa, adequados para a liberação aos bebês pequenos.

[0090] As vacinas da invenção podem ser formuladas e administradas por técnicas conhecidas, usando uma quantidade adequada de vírus vivo para fornecer proteção eficaz contra infecção por rotavírus sem efeitos colaterais adversos significantes em vacinas típicas.

[0091] Consequentemente a presente invenção fornece um método para a preparação de uma formulação de rotavírus líquida ou composição imunogênica como descrito aqui compreendendo misturar um antígeno de rotavírus, um açúcar e um carboxilato com um diluente farmacologicamente aceitável.

[0092] Uma quantidade adequada de vírus vivo normalmente estará entre 10^4 e 10^7 ffu por dose. Uma dose típica de vacina pode compreender 10^5 a 10^6 ffu por dose e pode ser fornecida em várias doses durante um período de tempo, por exemplo em duas doses fornecidas com um intervalo de dois meses. O título de rotavírus também pode ser expressado em CCID₅₀ e ele pode ser estimado no contexto desta invenção que um CCID₅₀ de $10^{6,0}$ é equivalente a um ffu de $10^{5,5}$ por dose. Benefícios entretanto podem ser obtido por ter mais do que 2 doses, por exemplo um 3 ou 4 regimes de dose, particularmente em países em desenvolvimento. A primeira dose apropriadamente pode ser fornecido aos bebês em 4 semanas a 14 ou 15 semanas de idade, apropriadamente entre 6 e 14 semanas de idade. O intervalo entre as doses é pelo menos de 4 semanas mas pode ser mais ou menos do que dois meses, por exemplo a segunda dose, e qualquer dose subsequente se apropriada, pode ser fornecida um mês ou três meses depois da dose anterior, dependendo do programa de imunização local. Uma

quantidade ideal de vírus vivo para uma única dose ou para um regime de dose múltipla, e cronometragem ideal para as doses, pode ser determinada por estudos padrão envolvendo a observação de títulos de anticorpo e outras respostas em pacientes.

[0093] Tipicamente o volume de uma dose de vacina de acordo com a invenção normalmente será de 2,5 ml ou mais baixo, tipicamente entre 0,5 ml e 2,5 ml. Em um aspecto específico da invenção, uma dose de vacina adequada normalmente será de 1,5 ml ou apropriadamente qualquer volume menor do que 2,5 ml tal como um volume de 2 ml ou menos, que é adequado para a administração oral a recém-nascidos ou bebês. Em particular o volume de dose será tal que a viabilidade técnica da formulação é possível e não existe nenhum efeito prejudicial no potencial imunogênico da formulação. As composições reivindicadas oferecem a vantagem sobre as formulações contendo fosfato da técnica anterior que elas podem suportar acidez gástrica, permanecer imunogênicas e estáveis durante uma vida de prateleira longa, embora sendo compatíveis com a formulação em um volume de dose menor do que usual, tal como menor do que 2,0 ml ou ainda, apropriadamente, 1,5 ml ou menor. Tipicamente o volume de uma dose de vacina de acordo com a invenção está entre 0,5 ml e 2,0 ml, apropriada e aproximadamente entre 1,0 ml e 1,5 ml, tal como aproximadamente 1,3 ml ou aproximadamente 1,4 ml ou aproximadamente 1,5 ml. Um volume de dose típico também pode ser de 2 ml ou abaixo, tal como por exemplo 1,1 ml, 1,2 ml, 1,3 ml, 1,4 ml ou 1,5 ml. Volumes de 1 ml ou volumes menores do que 1 ml, por exemplo entre 200 µl a 800 µl, também são considerados dentro do escopo da presente invenção. O volume de líquido que pode ser administrado oralmente também pode ser parcialmente determinado pelo dispositivo de liberação de vacina.

[0094] A composição imunogênica da invenção também pode ser formulada para conter outros antígenos, em particular antígenos de outros vírus vivos adequados para a proteção contra outras doenças, por exemplo

poliovírus. Os ditos ingredientes ativos adicionais adequados para a administração oral podem ser fornecido em mistura com a composição de rotavírus, ou alternativamente pode ser co-administrado (isto é, em uma dose separada mas na mesma ocasião) com a composição de rotavírus reivindicada aqui.

[0095] A composição reivindicada também pode ser fornecida concomitantemente com outras vacinas não orais, por exemplo com vacinas parenterais adequadas para a população de vacinas pediátricas tais como as vacinas DTPw ou DTPa (vacinas contra *Bordetella pertussis* - coqueluche, difteria, tétano), vacinas contra meningite induzida por *Haemophilus influenza* B, hepatite B, ou sarampo, caxumba, rubéola (MMR), vacinas contra *Streptococcus pneumoniae*, de modo a otimizar o número de visitas ao médico.

[0096] Em uma outra forma de realização, a invenção também fornece um método de tratar ou prevenir doenças associadas ao rotavírus em seres humanos, especialmente em crianças jovens tais como recém-nascidos ou bebês, administrando-se ao dito paciente humano em necessidade deste uma quantidade eficaz de uma formulação líquida, em particular uma composição imunogênica ou uma vacina, como reivindicado aqui. Em particular as composições reivindicadas prevenirão infecções por rotavírus. Em uma forma de realização específica, as composições reivindicadas aqui são capazes de fornecer proteção contra gastroenterite por rotavírus, em particular contra gastroenterite severa. Uma gastroenterite severa é definida como um episódio que requer hospitalização e/ou terapia de reidratação (equivalente a WHO plano B ou C) em uma instalação médica, ou um episódio com uma contagem > 11 na escala de Vesikari 20 pontos (Ruuska T e Vesikari T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for severity of diarrheal episodes. Scand J Infect Dis 1990, 22:259-67).

[0097] Ainda em uma outra forma de realização, a invenção leva em

consideração o uso de um antígeno de rotavírus, um carboxilato e um açúcar na fabricação de uma composição imunogênica, por exemplo uma vacina, para o tratamento ou prevenção de doenças associadas ao rotavírus em seres humanos, em que a dita composição imunogênica tem um pH entre pH 5,0 e pH 8,0 e compreende menos do que 5 mM de fosfato. Em particular, a prevenção de infecções por rotavírus, e/ou proteção contra gastroenterite e mais especialmente contra gastroenterite severa é especialmente considerada.

[0098] Em uma outra forma de realização específica, a invenção também leva em consideração o uso de um rotavírus atenuado vivo humano para a fabricação de uma composição imunogênica como reivindicado aqui para o tratamento ou prevenção de doenças associadas ao rotavírus sem causar intussuscepção. Em particular, o dito tratamento ou prevenção compreendem administrar duas doses orais, ou mais, de uma quantidade segura e eficaz da composição de rotavírus atenuado vivo humano a um bebê dentro de 4 a 14 ou 15 semanas de idade no momento da dose 1. Tipicamente o bebê estará com 6 a 14 semanas de idade no momento da primeira dose. Dentro do contexto da presente invenção um bebê humano é tomado para significar um bebê da idade de 4 a 14 ou 15 semanas depois do nascimento.

[0099] Em uma outra forma de realização, a invenção também leva em consideração uma composição imunogênica líquida compreendendo um antígeno de rotavírus, um açúcar, fosfato e um carboxilato, em que a dita composição tem um pH entre cerca de 5,0 a cerca de 8,0 e em que o dito carboxilato é selecionado da lista que consiste de: adipato, malato, acetato, propionato, butirato, malonato, glutarato, glicolato, gluconato, pimelato, e qualquer combinação de dois ou mais destes. Em uma forma de realização específica o dito carboxilato é o adipato. Tipicamente fosfato será presente em uma concentração de 10 mM a 1 M. O presente inventor descobriu que estes carboxilatos específicos, que não foram associados com o desenvolvimento de formulações de vacina oral, têm cumprido todas as necessidades desejadas de

estabilidade, resistência a ácido, imunogenicidade e formulação em um volume de dose pequeno, como apresentado na presente descrição para o desenvolvimento de uma vacina oral contra rotavírus adequada para bebês humanos. Em particular os ditos carboxilatos não têm nenhum efeito prejudicial no título de rotavírus na formulação. Estes carboxilatos podem agir adequadamente como alternativas para carboxilatos convencionais tais como succinato, glutamato e citrato por exemplo em formulações contendo fosfato de rotavírus. Todas as outras formas de realização específicas como descrito acima aplicam-se igualmente a este aspecto da presente invenção. Tipicamente a faixa do pH da composição é como definida aqui, como são a capacidade antiácida e estabilidade de vida de prateleira. A invenção também leva em consideração o método de preparação da dita composição, para usos e métodos de prevenção ou tratamento de bebês humanos usando a dita composição.

[00100] A invenção será descrita ainda por referência aos exemplos não limitantes seguintes:

Exemplo I - Formulação de uma vacina líquida contra rotavírus atenuado vivo humano i) na ausência de fosfato e carboxilato adicionados, e ii) na presença de citrato como um carboxilato na ausência de fosfato adicionado

1.1. Preparação das formulações

1.1.1. Composição do meio DMEM (para preparar 1 litro de DMEM):

Água para injeção: 0,8 litros

Dissolver sucessivamente os compostos seguintes:

Cloreto de sódio: 6,40 g

Cloreto de potássio: 0,40 g

Sulfato de magnésio.7 H₂O: 0,20 g

Adicionar solução de nitrato de ferro a 0,1 g/L: 1,00 ml

NaH₂PO₄.2H₂O: 0,1412 g

Piruvato de sódio: 0,11 g

Glicose anidra: 4,50 g

Solução de vitamina (500x concentrada): 2,00 ml

Água para injeção: 1,50 ml

Ácido clorídrico (concentrado): 0,083 ml

L-Cistina: 0,048 g

L-Tirosina: 0,072 g

Água para injeção: 2,00 ml

Solução de aminoácidos: 20,00 ml

L-Glutamina: 0,5846

Cloreto de cálcio.2H₂O: 0,2649 g

Bicarbonato de sódio: 3,70 g

Água para injeção até 1 litro

DMEM representa 5 %, 6 % ou 8 % das formulações detalhadas no Exemplo II. Isto corresponde a:

- uma concentração de fosfato final de 0,059 mM, 0,071 mM e 0,094 mM respectivamente, e

- uma concentração de piruvato final de 0,065 mM, 0,078 mM e 0,104 mM respectivamente.

Solução de vitamina (500x concentrada):

Água para injeção: 80,00 L

Ácido fólico: 200,10 g

Pantenoato de cálcio: 200,10 g

Cloreto de colina: 200,10 g

Inositol: 350,00 g

Nicotinamida: 200,00 g

Cloridrato de piridoxina: 200,10 g

Cloridrato de tiamina: 200,10 g

Riboflavina: 20,002 g

Água para injeção até 100 litros.

Solução de aminoácido:

Água para injeção: 144,00 L

L-Arginina: 755,70 g

Glicina: 270,10 g

L-Histidina: 378,00 g

L-Isoleucina: 943,40 g

L-Leucina: 943,50 g

L-Lisina 2 HCl: 1.315,80 g

L-Metionina: 270,00 g

L-Fenilalanina: 594,10 g

L-Treonina: 856,30 g

L-Triptofano: 144,00 g

L-Serina: 377,90 g

L-Valina: 842,00 g

Água para injeção: até 180 Litros.

Solução de nitrato de ferro

Água para injeção: 1.035,000 ml

Nitrato de ferro.9H₂O: 0,115 g

Água para injeção: até 1,150 litros

I.1.2. Preparação das formulações de rotavírus na ausência de fosfato e carboxilato adicionados

[00101] A formulação 60 apresentada na Tabela 2 foi fabricada na estala total de 325 g (250 ml), representando 166,6 doses de 1,5 ml (1,95 g) cada.

[00102] Formulação n° 60: a 143 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g) é adicionado: 162,5 g de sacarose (50 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 19,5 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter 10^{6,0}

ffu por dose são adicionados. Neste caso o volume de dose é de 1,5 ml. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6 % p/p.

[00103] Os resultados da capacidade antiácida, título viral inicial e estabilidade viral são mostrados nas Tabelas 2 a 4.

Tabela 2: Volume de dose de 1,5 ml

Nº	Sacarose % p/p	DMEM % p/p	pH de BRR* t = 0	Tempo de BRR* > 4 (min)	Título Viral em t = 0 (log ₁₀ ffu por dose de vacina)	Título Viral depois de 1w 37°C	Perda Viral depois de 1w 37°C
60	50,0 %	6 %	7,82	< 1	6,3	5,4	0,9

*avaliado pelo teste de Baby Rossett Rice (BRR) como adaptado de acordo com o Exemplo III.2.2

Tabela 3: Volume de dose de 1,5 ml - Estabilidade viral na temperatura ambiente

Nº	Titulação viral depois do armazenamento na temperatura ambiente (log ₁₀ ffu por dose de vacina)									
	1 m*	2 m*	3 m*	4 m*	5 m*	6 m*	7 m*	8 m*	9 m*	10 m*
60	5,6	5,6	5,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*= mês(s); ND = não determinado

Tabela 4: Volume de dose de 1,5 ml - Estabilidade viral a 4°C

Nº	Titulação viral depois do armazenamento a 4°C (log ₁₀ ffu por dose de vacina)							
	T = 0	depois de 1w 37°C	1 m* 4°C	2 m* 4°C	4 m* 4°C	6 m* 4°C	9 m* 4°C	12 m* 4°C
60	6,3	5,4	6,2	5,8	6,0	5,5	ND	ND

*= mês(s); ND = não determinado

I.1.3. Preparação das formulações de rotavírus contendo um carboxilato

[00104] Ácido cítrico (quando presente) e citrato sal são misturados nas proporções e condições ilustradas nas Tabelas 5 e 6. A estabilidade do rotavírus e capacidade antiácida das formulações são medidas de acordo com os métodos fornecidos nos Exemplos III.1 e III.2, respectivamente.

[00105] As formulações 110 a 115 e 128 a 130 foram preparadas. O volume de dose foi de 2,5 ml para as formulações 110 a 115 e 1,5 ml para as

formulações 128 a 130. As formulações 110 a 115 apresentadas na Tabela 5 foram fabricadas na escala total de 325 g (250 ml), representando 100 doses de 2,5 ml (3,25 g) cada.

[00106] A formulação 110 foi preparada como segue. A 123,71 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g) são consecutivamente adicionados: 19,29 g de citrato de tri-sódio ($\text{Na}_3\text{Citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Mw 294) (correspondendo a uma concentração final de 262 mM) e 162,50 g de sacarose (50 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 μm . Sob condições estéreis 19,5 g de meio DMEM, contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter $10^{6,0}$ ffu por dose, são adicionados. Neste caso o volume de dose única é de 2,5 ml ou 3,25 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado.

[00107] Neste exemplo meio DMEM representa 6 % p/p, correspondendo a uma concentração de fosfato final de 0,059 mM.

[00108] As formulações 111 a 115 são preparadas de acordo com um procedimento similar àquele explicado em relação à formulação 110, exceto que a quantidade de ingredientes é adaptada como detalhado na Tabela 5. Por exemplo, a formulação 111 foi preparada misturando-se os ingredientes seguintes: 123,73 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g), 19,07 g de citrato de tri-sódio ($\text{Na}_3\text{Citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Mw 294) (correspondendo a uma concentração final de 259 mM), 0,197 g de ácido cítrico (Mw 192) (correspondendo a uma concentração final de 4 mM) e 162,50 g de sacarose (50 % p/p). O restante do procedimento foi feito como para a formulação 110.

[00109] Os resultados da capacidade antiácida, título viral inicial e estabilidade viral são mostrado nas Tabelas 5 a 8.

Tabela 5: Volume de dose de 2,5 ml

Nº	Ácido Cítric	$\text{Na}_3\text{Citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (M)	Sacarose % p/p	DMEM % p/p	pH de BRR* em t = 0	Tempo de BRR* no pH > 4	Título Viral em t = 0	Título viral depois de 1w 37°C	Perda Viral depois de 1w 37°C
----	--------------	---	----------------	------------	---------------------	-------------------------	-----------------------	--------------------------------	-------------------------------

	o (M)					(min)	(log ₁₀ ffu por dose de vacina)		
110	0	0,262	50 %	6 %	8,15	14	5,7	4,8	0,9
111	0,004	0,259	50 %	6 %	6,95	14	5,3	5,4	0
112	0,010	0,256	50 %	6 %	6,51	12 a 13	5,6	5,6	0
113	0,014	0,249	50 %	6 %	6,34	12	5,6	5,4	0,2
114	0,034	0,283	50 %	6 %	5,94	12 a 13	5,6	5,3	0,3
115	0,093	0,333	50 %	6 %	5,37	14	5,7	5,6	0,1

*avaliado pelo teste de Baby Rossett Rice (BRR) como adaptado de acordo com o Exemplo III.2.2

[00110] As formulações apresentadas na Tabela 6 foram fabricadas em escala total de 325 g (250 ml), representando 166,6 doses de 1,5 ml (1,95 g) cada. Materiais antiácidos: Ácido cítrico.1H₂O (Mw 210), Na₃Citrato.2H₂O (Mw 294).

[00111] A formulação 128 foi preparada misturando-se 110,89 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g) com os ingredientes seguintes: 31,78 g de citrato de tri-sódio (Na₃Citrato.2H₂O, Mw 294) (correspondendo a uma concentração final de 432 mM), 0,328 g de ácido cítrico (Ácido cítrico.1H₂O, Mw 210) (correspondendo a uma concentração final de 6 mM) e 162,50 g de sacarose (50 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm.

[00112] Sob condições estéreis 19,5 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter 10^{6,0} ffu por dose são adicionados. Neste caso a dose é de 1,5 ml ou 1,95 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo meio DMEM representa 6 % p/p, correspondendo a uma concentração de fosfato final de 0,059 mM.

[00113] As formulações 129 e 130 foram preparadas similarmente ao procedimento descrito para a formulação 128 embora adaptando as quantidades dos ingredientes de acordo com a Tabela 6. Brevemente, a formulação 129 foi preparada misturando-se 0,77 g de ácido cítrico (Ácido cítrico.1H₂O, Mw 210) (correspondendo a uma concentração final de 15 mM)

e 31,36 g de citrato de tri-sódio ($\text{Na}_3\text{Citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Mw 294) correspondendo a uma concentração final de 426 mM). A formulação 130 foi preparada misturando-se 2,75 g de ácido cítrico ($\text{Ácido cítrico} \cdot 1\text{H}_2\text{O}$, Mw 210) (correspondendo a uma concentração final de 52 mM) e 34,7 g de citrato de tri-sódio ($\text{Na}_3\text{Citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Mw 294) correspondendo a uma concentração final de 472 mM). O restante dos ingredientes e proporções estão na Tabela 6.

Tabela 6: Volume de dose de 1,5 ml

Nº	Ácido Cítrico. $1\text{H}_2\text{O}$ (M)	$\text{Na}_3\text{Citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (M)	Sacarose % p/p	DMEM % p/p	pH de BRR* em t = 0	Tempo de BRR* pH > 4= 0 (min)	Título Viral em t=0 (log ₁₀ ffu por dose de vacina)	Título Viral depois de 1w 37°C	Perda Viral depois de 1w 37°C
128	0,006	0,432	50,0 %	6 %	6,97	13	6,1	5,8	0,3
129	0,015	0,426	50,0 %	6 %	6,55	12	5,9	5,8	0,1
130	0,052	0,472	50,0 %	6 %	5,92	13	5,9	5,8	0,1

*avaliado pelo teste de Baby Rossett Rice (BRR) como adaptado de acordo com o Exemplo III.2.2

Tabela 7: Volume de dose de 1,5 ml - Estabilidade viral na temperatura ambiente

nº	Titulação viral depois do armazenamento na temperatura ambiente (log ₁₀ ffu por dose de vacina)									
	1 m*	2 m*	3 m*	4 m*	5 m*	6 m*	7 m*	8 m*	9 m*	10 m*
128	ND	ND	ND	ND	5,4	5,1	ND	ND	ND	ND
129	ND	ND	ND	ND	5,4	5,0	ND	ND	ND	ND
130	ND	ND	ND	ND	5,6	5,0	ND	ND	ND	ND

*= mês(s); ND = não determinado

Tabela 8: Volume de dose de 1,5 ml - Estabilidade viral a 4°C

n°	Titulação viral depois do armazenamento a 4°C (log ₁₀ ffu por dose de vacina)							
	T = 0	depois de 1w 37°C	1 m* 4°C	2 m* 4°C	4 m* 4°C	6 m* 4°C	9 m* 4°C	12 m* 4°C
128	6,1	5,8	ND	ND	ND	5,8	ND	5,7
129	5,9	5,8	ND	ND	ND	5,8	ND	5,6
130	5,9	5,8	ND	ND	ND	5,9	ND	5,4

*= mês(s); ND = não determinado

I.2 Estabilidade do rotavírus e capacidade antiácida - resultados

[00114] A titulação viral de rotavírus em pontos no tempo diferentes foi avaliada de acordo com o procedimento fornecido no Exemplo III.1 e a capacidade antiácida da formulação foi avaliada seguindo o protocolo fornecido no Exemplo III.2. Os resultados são ilustrados nas Tabelas 2 a 8.

[00115] O pH para a formulação de controle 60, que foi desprovido de carboxilato e fosfato adicionado, não teve nenhuma capacidade antiácida e exibiu ainda um pH próximo ao limite superior do pH 8,0 para a estabilidade viral.

[00116] Para todas as formulações experimentais testadas nas Tabelas 5 a 8, o pH foi mantido em uma faixa de cerca de 5,0 a 7,0 exceto para a formulação 110, que exibiu um pH acima de 8,0. Como pode ser observado a partir dos resultados do título viral e perda viral, a estabilidade do rotavírus na formulação líquida é relacionado ao pH desta formulação. Na faixa de cerca do pH 5,4 (isto é, formulação 115) ao pH 7,0 (isto é, formulações 111 e 128), a perda viral depois de 7 dias a 37°C foi mantida em um nível baixo (isto é, abaixo de 0,5 log), e isto contrastou com o resultado obtido para a formulação 110 (pH > 8, com uma perda de título viral de 0,9 log).

[00117] Além disso, as formulações 111 a 115 e 128 a 130, elas apresentaram uma capacidade antiácida similar àquela da formulação 110, como avaliado pelo ensaio de Baby Rossett-Rice (ver o Exemplo III.2.2). Esta capacidade antiácida excedeu bastante o limite inferior de 8 min para 2,5 ml

assim como para as formulações de volume de dose de 1,5 ml, e na verdade alcançou um mínimo de 12 minutos, e foi considerada portanto altamente satisfatória.

[00118] Carboxilatos alternativos também foram testados visto que estes podem representar alternativas tecnicamente possíveis quando quantidades relativamente baixas de carboxilatos podem ser desejáveis, por exemplo quando do trabalho com volumes de dose muito pequenos.

[00119] Os exemplos de formulações contendo tais carboxilatos alternativos são fornecidos no Exemplo II e Tabelas 10 a 39.

Exemplo II - Formulações com um sal de carboxilato alternativo na ausência de fosfato adicionado

[00120] Os sais de carboxilato seguintes foram usados para criar uma capacidade de tampão: acetato, malonato, succinato, glutarato, adipato e malato. De acordo com o pK_a de um ácido carboxílico dado, e dependendo de seu peso molecular, é possível encontrar quantidades a serem formuladas para obter a capacidade antiácida alvo de pelo menos 8 minutos, apropriadamente pelo menos 12 minutos como avaliado pelo teste de BRR, embora estando em uma janela do pH entre o pH 5,0 ao pH 8,0.

[00121] Quimicamente falando, um efeito “tampão” é obtido quando da mistura de um ácido forte (como HCl) e um sal derivado de um ácido fraco (como acetato de sódio). O valor do pH correspondendo à metade do platô do tampão é igual ao pK_a do ácido fraco. O pK_a do ácido carboxílico é uma medida da força ácida, em outras palavras um indicador da faixa de tamponamento eficaz do composto.

[00122] Visto que o rotavírus é rapidamente degradado abaixo do pH 4 (C. Weiss e H.F. Clark, 1985 J. Gen. Virol., 66, 2725-2730), um platô do tampão acima do pH 4 é desejável, isto é, apropriadamente carboxilatos com $pK_a > 4$ ou di-carboxilatos com um pK_a médio > 4 . Os carboxilatos adequados são fornecidos na Tabela 9. Os valores de pK_a médio numérico são

fornecidos.

Tabela 9: Características de vários carboxilatos

Ácidos carboxílicos	MW	pK _{a1}	pK _{a2}	pK _{a3}	pK _a médio	Toxicidade (LD50 oral, em rato)
Cítrico*	192	6,39	4,76	3,13	4,76	3,0 g/kg
Outros ácidos carboxílicos com pK _a > 4						
Propínico*	74	4,88				2,6 g/kg
Butírico	88	4,82				
Acético*	60	4,76				3,3 g/kg
Ácidos dicarboxílicos com um pK _a médio > 4						
Maléico	116	6,23	1,92		4,07	
Malônico	104	5,7	2,83		4,26	1,31 g/kg
Succínico	118	5,6	4,21		4,90	2,26 g/kg
Adípico*	146	5,4	4,43		4,91	5,7 g/kg
Glutárico	132	5,22	4,34		4,78	
Málico*	134	5,05	3,40		4,22	1,6 g/kg

*Cinco ácidos carboxílicos têm o estado de “aditivo alimentício”: Cítrico E330, Acético E260, Propiônico E280, Málico E296 e Adípico E355.

[00123] Uma curva de titulação ácido-base padrão para quatro carboxilatos (malato de sódio, acetato de sódio, citrato de sódio e adipato de sódio) é ilustrada na Figura 1. Ela mostra que a capacidade antiácida útil entre o pH 4,0 e pH 7,0 por exemplo, é de 72,50 %, 68,75 %, 57,70 % e 41,25 % para adipato de sódio, acetato de sódio, citrato de sódio e malato de sódio, respectivamente.

[00124] As formulações foram preparadas com os carboxilatos seguintes: acetato, malonato, succinato, glutarato, adipato e malato. Todas as formulações mostradas neste exemplo foram preparadas em um volume de dose de 1,5 ml.

II.1. Formulações com acetato

II.1.1. As formulações apresentadas na Tabela 10 foram fabricadas em escala de 325 g (250 ml) representando 166,6 doses de 1,5 ml (1,95 g) cada. Materiais antiácidos: Ácido acético (Mw 60), NaOH (Mw 40).

[00125] Formulação 36: a 148,84 g de água (quantidade suficiente para alcançar uma preparação final de 325 g) são sucessivamente adicionados: 10,66 g de NaOH, ácido acético glacial até o pH 7,16 e 130 g de sacarose (40 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração

em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 19,5 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus são adicionados à solução, para obter 10^{6,0} ffu por dose. Neste caso a dose é de 1,5 ml ou 1,95 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6 % p/p.

[00126] Formulações 37 e 42: ela é procedida como para a formulação 36 mas as quantidades são ajustadas de acordo com a Tabela 10.

[00127] Formulação 87: a 75,00 g de água são sucessivamente adicionados: 8,00 g de NaOH, 15,00 g de ácido acético glacial, solução de NaOH 1N o bastante para alcançar um pH de 7,00 (neste caso 2 g de NaOH 1N foram adicionados), água adicional para alcançar a quantidade suficiente de 325 g (neste caso 43,00 g de água foram adicionados), e 162,50 g de sacarose (50 % p/p). O restante do procedimento é realizado como para a formulação 36.

[00128] Exemplo para as formulações 88 a 90: ele foi procedido como para a formulação n° 87 exceto que as quantidades são adaptadas como mencionado na Tabela 10.

[00129] Exemplo para as formulações 33 a 35: ele foi procedido como para a formulação n° 36 exceto que as quantidades são adaptadas como mencionado na Tabela 10 e que NaOH é substituído por Ca(OH)₂. As formulações 33 a 35 não foram incluídas no estudo de estabilidade de baixo prazo devido à falha para cumprir o teste de estabilidade de 1 semana a 37°C. Resultados satisfatórios na presença de íon cálcio adicional entretanto são apresentados na série adipato (ver o Exemplo II.5.4, e Tabela 26).

Tabela 10

Nº	NaOH (M)	Ácido Acético (M)	Sacarose % p/p	DMEM % p/p	pH de BRR* em t = 0	Tempo de BRR* no pH > 4 (min)	Título Viral em t = 0 (log ₁₀ ffu por dose de vacina)	Título viral depois de 1w 37°C per vacina	Perda viral depois de 1w 37°C dose)
36	1,07	Até o pH 7,16	40 %	6 %	7,2/7,23°	13/14°	5,8	5,3	0,5
37	1,07	acima do pH 7,55	50 %	6 %	7,62/7,63°	13/15°	5,8	5,4	0,4
42	1,05	acima do pH 7,7	50 %	6 %	8,06/8,03°	15/16°	5,9	5,1	0,8
87	acima do pH 7,0	1	50 %	6 %	7,24	13	6,2	6,1	0,1
88	acima do pH 6,5	1	50 %	6 %	6,7	13	5,8	5,9	0
89	acima do pH 6,0	1	50 %	6 %	6,14	12	5,9	5,5	0,4
90	acima do pH 6,0	1	55 %	6 %	6,10	13	6,0	5,5	0,5
	Ca(OH) ₂								
33	0,540	Até o pH 7,32	40 %	6 %	7,66	12	5,8	4,3	> 1
34	0,540	Até o pH 7,55	45 %	6 %	8,09	13	5,9	< 3,8	> 1
35	0,540	Até o PH 7,35	50 %	6 %	7,76	13	6,3	< 3,8	> 1

*avaliado pelo teste de Baby Rossett Rice (BRR) como adaptado de acordo com o Exemplo III.2.2;

° = repetições

II.1.2. Formulações apresentadas na Tabela 11 foram fabricadas em escala de 325 g (250 ml) representando 166,6 doses de 1,5 ml (1,95 g) cada. Materiais antiácidos: Acetato de sódio.3H₂O (Mw 136).

[00130] Exemplo para a formulação 58: a 113,00 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g) são sucessivamente adicionados: 30,00 g acetato de sódio 3 H₂O e 162,50 g de sacarose (50 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 19,5 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus são adicionados à solução, para obter 10^{6,0} ffu por dose. Neste caso a dose é

de 1,5 ml ou 1,95 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6 % p/p.

[00131] Formulações 59, 66, 69, e 70: Ela é procedida similarmente à formulação 58 com quantidades ajustadas (ver a Tabela 11).

Tabela 11

Nº	Acetato de Na.3H ₂ O (M)	Sacarose % p/p	DMEM % p/p	pH BRR* em t = 0	Tempo de BRR* no pH > 4 (min)	Título Viral em t = 0 (log ₁₀ ffu por dose de vacina)	Título viral depois de 1w 37°C	Perda viral depois de 1w 37°C
58	0,882	50 %	6 %	7,98	11	6,3	5,6	0,7
59	0,706	50 %	6 %	7,94	7	6,2	5,4	0,8
66	0,941	54 %	6 %	8,13/8,14°	13	5,9	5,3	0,6
69	0,753	55 %	6 %	8,15	8	6,0	5,3	0,7
70	1,338	50 %	6 %	8,23	20	6,0	5,4	0,6

*como avaliado pelo teste de Baby Rossett Rice (BRR) como adaptado de acordo com o Exemplo III.2.2.;

° = repetição

II.1.3. Estabilidade do rotavírus e capacidade antiácida - resultados

[00132] A titulação viral de rotavírus em pontos no tempo diferentes foi avaliada de acordo com o procedimento fornecido no Exemplo III.1 e a capacidade antiácida da formulação foi avaliada seguindo o protocolo fornecido no Exemplo III.2.2. Os resultados são ilustrados nas Tabelas 10, 11, 12 e 13.

[00133] Em conclusão, a estabilidade do rotavírus em uma formulação de acetato líquida é relacionada ao pH. Um faixa de trabalho adequada está entre o pH 6,0 a 7,5.

Tabela 12 - Estabilidade viral na temperatura ambiente

nº	Titulação viral depois do armazenamento na temperatura ambiente (log ₁₀ ffu por dose de vacina)									
	1 m*	2 m*	3 m*	4 m*	5 m*	6 m*	7 m*	8 m*	9 m*	10 m*
36	5,8	5,2	4,7							
37	5,8	5,5	5,3	5,0	5,0	4,4				
42	5,2	5,4	5,1							
87		6,0	5,9			5,6		5,3	5,3	4,7
88		5,9	5,6							
89		5,2	4,7							

90		4,8	4,6							
58	5,6	5,4	4,9							
59	5,7	5,5	4,9							
66	5,8	5,4	5,5							
69	5,9	5,5	5,5							
70	5,9	5,5	5,4							

* = mês(s); Caixas em branco = critérios não determinados

Tabela 13 - Estabilidade viral a 4°C

n°	Titulação viral depois do armazenamento a 4°C (log ₁₀ ffu por dose de vacina)								
	T = 0	Depois de 1w 37°C	1 m* 4°C	2 m* 4°C	4 m* 4°C	6 m* 4°C	9 m* 4°C	12 m* 4°C	15 m* 4°C
36	5,8	5,4	5,9	5,8	5,8	5,7			
37	5,9	5,1	5,9	5,7	5,7				
42	6,2	6,1		6,3		6,1			6,1
87	5,8	6,0		6,0					
88	5,9	5,5		5,8					
89	6,0	5,5		5,7					
90	6,3	5,6	6,2	5,8	6,0				
58	6,2	5,4	6,2	5,7	6,0				
59	5,9	5,3	5,9	5,8					
66	6,0	5,3	6,0	5,9					
69	6,0	5,4	6,0	5,9					
70	6,0	5,4	6,0	5,9					

* = mês(s); Caixas em branco = critérios não determinados

II.2. Formulações com malonato

II.2.1. A formulação 67 (ver a Tabela 14) foi fabricada em escala total de 325 g (250 ml) representando 166,6 doses de 1,5 ml (1,95 g) cada. Materiais antiácidos: Ácido malônico (Mw 104), NaOH (Mw 40).

[00134] A Formulação 54 (ver Tabela 14) foi fabricada em escala total de 44 g (35 ml) representando 20 doses de 1,75 ml (2,2 g) cada. Materiais antiácidos: Ácido malônico (Mw 104), NaOH (Mw 40).

[00135] Formulação n° 67: a 110,70 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g) são sucessivamente adicionados: 14,00 g de NaOH, 18,230 g de ácido malônico e 162,5 g de sacarose (50 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é

esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 19,5 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter 10^{6,0} ffu por dose são adicionados. Neste caso a dose é de 1,5 ml ou 1,95 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6 % p/p.

[00136] Formulação n° 54: a 16,64 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 44 g) são sucessivamente adicionados: 2,4 g de NaOH, 3,1213 g de ácido malônico e 19,5 g de sacarose (44 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 2,34 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter 10^{6,0} ffu por dose são adicionados. Neste caso a dose é de 1,75 ml ou 2,2 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6 % p/p.

Tabela 14

Nº	NaOH (M)	Ácido Malônico (M)	Sacarose % p/p	DMEM % p/p	pH de BRR* em t = 0	Tempo de BRR* no pH > 4 (min)	Título Viral em t = 0 (log ₁₀ ffu por dose de vacina)	Título viral depois de 1w 37°C	Perda viral depois de 1w 37°C
67	1,4	0,701	50 %	6 %	6,53	11-12	6,0	5,7	0,3
54	1,71	0,857	44 %	6 %	8,36	23	°°	°°	°°

*avaliado pelo teste de Baby Rossett Rice (BRR) como adaptado de acordo com o Exemplo III.2.2.

°° A Formulação 54 foi descartada do estudo de estabilidade a longo prazo por causa de seu pH inicial acima de 8,0

II.2.2. A formulação apresentada na Tabela 15 foi fabricada em escala total de 325 g (250 ml) representando 147,7 doses de 1,75 ml (2,20 g) cada. Material antiácido: malonato de dissódio (Mw 148).

[00137] Formulação n° 62: a 138,50 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g) são sucessivamente adicionados: 23,00 g de malonato de dissódio e 144,00 g de sacarose (44 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada

por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 19,5 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus são adicionados à solução, para obter $10^{6,0}$ ffu por dose. Neste caso a dose é de 1,75 ml ou 2,20 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6 % p/p.

Tabela 15

Nº	Malonato de Na (M)	Sacarose % p/p	DME M % p/p	pH de BRR* em t = 0	Tempo de BRR* no pH > 4 (min)	Título Viral em t = 0 (log ₁₀ ffu por dose de vacina)	Título viral depois de 1w 37°C	Perda viral depois de 1w 37°C
62	0,601	44 %	6 %	8,21	12	6,1	5,0	0,9

* avaliado pelo teste de Baby Rossett Rice (BRR) como adaptado de acordo com o Exemplo III.2.2.

II.2.3. Estabilidade do rotavírus e capacidade antiácida - resultados

[00138] Em conclusão, a estabilidade do rotavírus em uma formulação de malonato líquida é relacionada ao pH: o pH 6,5 fornece uma boa estabilidade durante 1 semana a 37°C enquanto mais do que 0,9 log de perda é observada no pH 8,2.

II.3 Formulações com succinato

II.3.1. A Formulação 127 (ver a Tabela 16) foi fabricada em escala de 325 g (250 ml) representando 166,6 doses de 1,5 ml (1,95 g) cada. Materiais antiácidos: Ácido succínico (Mw 118), NaOH (Mw 40).

[00139] A Formulação 51 (ver a Tabela 16) foi fabricada em escala de 44 g (35 ml) representando 20 doses de 1,75 ml (2,2 g) cada. Materiais antiácidos: Ácido succínico (Mw 118), NaOH (Mw 40).

[00140] Formulação 127: a 120,16 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g) são sucessivamente adicionados: 9,10 g de NaOH, 13,74 g de ácido succínico e 162,5 g de sacarose (50 % p/p). O restante das etapas de formulação são idênticas às aquelas descritas para a formulação 67. Neste exemplo DMEM representa 6

% p/p.

[00141] Formulação 51: a 16,22 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 44 g) são sucessivamente adicionados: 2,4 g de NaOH, 3,5414 g de ácido succínico e 19,5 g de sacarose (44 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 2,34 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter 10^{6,0} ffu por dose são adicionados. Neste caso a dose é de 1,75 ml ou 2,2 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6 % p/p.

Tabela 16

Nº	NaOH (M)	Ácido Succínico (M)	Sacarose % p/p	DMEM % p/p	pH de BRR* em t = 0	Tempo de BRR* no pH > 4 (min)	Título Viral em t = 0 (log ₁₀ ffu por dose de vacina)	Título viral depois de 1w 37°C	Perda viral depois de 1w 37°C
127	0,91	0,466	50 %	6 %	6,33	9	5,9	5,7	0,2
51	1,71	0,857	44 %	6 %	7,20	> 29	°°	°°	°°

* avaliado pelo teste de Baby Rossett Rice (BRR) como adaptado de acordo com o Exemplo III.2.2.

°° A formulação 51 foi descartada do estudo de estabilidade a longo prazo visto que sua capacidade antiácida foi determinada ser muito longa

II.3.2. A formulação 56 é apresentada na Tabela 17 e foi fabricada em escala total de 325 g (250 ml) representando 166,6 doses de 1,5 ml (1,95 g) cada. Materiais antiácidos: Succinato de dissódio (Mw 162).

[00142] Formulação 56: A 122,50 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g) são sucessivamente adicionados: 20,50 g de succinato de dissódio e 162,50 g de sacarose (50 % p/p). O restante das etapas de formulação são idênticas às aquelas descritas para a formulação 62. Neste exemplo DMEM representa 6 % p/p.

Tabela 17

Nº	Succinato de dissódio (M)	Sacarose % p/p	DMEM % p/p	pH de BRR* em t = 0	Tempo de BRR* no pH > 4 (min)	Título Viral em t = 0 (log ₁₀ ffu por dose de vacina)	Título viral depois de 1w 37°C	Perda viral depois de 1w 37°C
56	0,506	50 %	6 %	8,12/8,30°	13	6,3	5,5	0,8

* avaliado pelo teste de Baby Rossett Rice (BRR) como adaptado de acordo com o Exemplo III.2.2.;

° = repetição

II.3.3. Estabilidade do rotavírus e capacidade antiácida - resultados

[00143] Em conclusão, a estabilidade do rotavírus em uma formulação de succinato líquida é relacionada ao pH: o pH 6,3 fornece boa estabilidade durante 1 semana a 37°C enquanto 0,8 log de perda é observado no pH 8,1.

II.4. Formulações com glutarato

II.4.1. Formulações com glutarato são apresentadas na Tabela 18.

[00144] A formulação 65 foi fabricada em escala total de 320,8 g (246 ml) representando 164 doses de 1,5 ml (1,95 g) cada. Materiais antiácidos: Ácido glutárico (Mw 132), NaOH (Mw 40). A 114,1 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 320,8 g) são sucessivamente adicionados: 9,3 g de NaOH, 15,40 g de ácido glutárico e 162,5 g de sacarose. (50,6 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 19,5 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter 10^{6,0} ffu por dose são adicionados. Neste caso a dose é de 1,5 ml ou 1,95 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6,08 % p/p.

[00145] A formulação 50 foi fabricada em escala total de 44 g (35 ml) representando 20 doses de 1,75 ml (2,2 g) cada. Materiais antiácidos: Ácido glutárico (Mw 132), NaOH (Mw 40).

[00146] A 15,8 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 44 g) são sucessivamente adicionados: 2,4 g de NaOH, 3,964 g de ácido glutárico e 19,5g de sacarose. (44 % p/p). Depois da

dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 2,34 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter 10^{6,0} ffu por dose são adicionados. Neste caso a dose é de 1,75 ml ou 2,2 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6 % p/p.

[00147] As formulações 125 e 126 foram fabricadas em escala total de 325 g (250 ml) representando 166,6 doses de 1,5 ml (1,95 g) cada. Materiais antiácidos: Ácido glutárico (Mw 132), NaOH (Mw 40).

[00148] Formulação 125: a 100,35 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g) são sucessivamente adicionados: 9,10 g de NaOH, 15,40 g de ácido glutárico e 162,5g de sacarose. O restante das etapas de formulação são idênticas àquelas descritas para a formulação 67. Neste exemplo DMEM representa 6 % p/p.

[00149] Formulação 126: ela foi procedida como para a formulação 125 mas com quantidades ajustadas (ver a Tabela 18).

Tabela 18

Nº	NaOH (M)	Ácido Glutárico (M)	Sacarose % p/p	DMEM % p/p	pH de BRR* em t = 0	Tempo de BRR* no pH > 4 (min)	Título Viral em t = 0 (log ₁₀ ffu por dose de vacina)	Título viral depois de 1w 37°C	Perda viral depois de 1w 37°C
125	0,910	0,467	50 %	6 %	6,17	10 a 11	5,8	5,7	0,1
65	0,945	0,474	50,6 %	6 %	6,49	11	6,0	5,6	0,4
126	0,950	0,467	50 %	6 %	8,13	12	6,1	5,4	0,7
50	1,71	0,858	44 %	6 %	8,45	> 29	∞	∞	∞

* avaliado pelo teste de Baby Rossett Rice (BRR) como adaptado de acordo com o Exemplo III.2.2.

∞ A Formulação 50 foi descartada do estudo de estabilidade a longo prazo por causa de seu pH inicial (acima de 8,0) e sua capacidade antiácida (determinada ser muito longa)

II.4.2. Estabilidade do rotavírus e capacidade antiácida - resultados

[00150] Em conclusão, a estabilidade do rotavírus em uma formulação de glutarato líquida é relacionada ao pH: o pH 6,17 fornece boa estabilidade

durante 1 semana a 37°C enquanto 0,7 log de perda é observado no pH 8,1.

II.5. Formulações com adipato

II.5.1. As formulações contendo adipato apresentadas na Tabela 19 foram fabricadas na escala de 325 g (250 ml) representando 166,6 doses de 1,5 ml (1,95 g) cada, exceto a formulação n° 45 que foi preparada na escala de 44 g (35 ml) representando 20 doses de 1,75ml (2.2 g) cada, e n° 63 que foi preparada na escala de 320,8 g (247 ml) representando 164 doses de 1,5 ml (1,95 g) cada. Materiais antiácidos: Ácido adípico (Mw 146), NaOH (Mw 40).

[00151] Formulação 45: a 15,38 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 44 g) são sucessivamente adicionados: 2,4 g de NaOH, 4,3809 g de ácido adípico e 19,5 g de sacarose (44 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 2,34 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter 10^{6,0} ffu por dose são adicionados. Neste caso a dose é de 1,75 ml ou 2,2 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6 % p/p.

[00152] Formulação 63: a 112,50 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 320,8 g) são sucessivamente adicionados: 9,3 g de NaOH, 17,00 g de ácido adípico e 162,5 g de sacarose. Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 19,5 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter 10^{6,0} ffu por dose são adicionados. Neste caso a dose é de 1,5 ml ou 1,95 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6,08 % p/p.

[00153] Formulação 81: a 116,70 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g) são sucessivamente

adicionados: 9,28 g de NaOH, 17,00 g de ácido adípico e 162,5 g de sacarose (50 % p/p). O restante das etapas de formulação são idênticas às aquelas descritas para a formulação 67. Neste exemplo DMEM representa 6 % p/p.

[00154] Formulações 82, 83, 91 a 97, 100 a 109, 122 a 124, 131 a 134, 136 a 145, 147, 148: À água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g) são sucessivamente adicionados: NaOH, ácido adípico e sacarose em quantidades como descrito nas Tabelas 19 e 23. Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 19,5 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter 10^{6,0} ffu por dose são adicionados. Neste caso a dose é de 1,5 ml ou 1,95 g. A mistura resultante é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6 % p/p.

[00155] Vários parâmetros, mostrados em negrito na Tabela 19, foram variados para testar o desempenho das formulações resultantes com respeito à capacidade antiácida e estabilidade viral.

Tabela 19

Nº	NaOH (M)	Ácido adípico (M)	Sacarose % p/p	DMEM % p/p	pH de BRR* em t = 0	Tempo de BRR* em pH > 4 (min)	Título viral em t = 0 (log ₁₀ ffu por dose de vacina)	Título viral depois de 1w 37°C	Perda viral depois de 1w 37°C
45	1,71	0,857	44 %	6 %	7,29	> 29	∞		
Efeito do açúcar %									
63	0,945	0,472	50,6 %	6 %	6,49	12	6,0	5,6	0,4
81	0,917	0,460	50 %	6 %	6,2	11 a 12	5,9	5,7	0,2
82	0,899	0,451	45 %	6 %	6,39	11 a 12	5,9	5,7	0,2
83	0,928	0,466	55 %	6 %	6,38	12	5,9	5,8	0,1
Formulações com capacidade antiácida diferente									
91	0,71	0,358	50 %	6 %	6,37	8	6,0	5,7	0,3
92	0,925	0,464	50 %	6 %	6,24	11 a 12	6,0	5,7	0,3
93	1,100	0,553	50 %	6 %	6,5	15 a 16	6,1	5,8	0,3
94	1,324	0,664	50 %	6 %	6,11	19 a 20	5,9	5,8	0,1
Três repetições									
95	0,928	0,466	55 %	6 %	6,3	12	6,0	5,9	0,1
96	0,928	0,466	55 %	6 %	6,55	12 a 13	6,1	6,0	0,1
97	0,928	0,466	55 %	6 %	6,3	12 a 13	5,9	5,8	0,1
Efeito do pH									
103	até o pH	0,466	55 %	6 %	4,94	∞	∞	∞	∞

	5,09								
104	0,610	0,466	55 %	6 %	4,94	°°	°°	°°	°°
105	0,69	0,466	55 %	6 %	5,15	6	5,8	5,5	0,3
106	0,928	0,466	55 %	6 %	6,09/6,10°	12	6,1	6,0	0,1
107	0,928	0,466	55 %	6 %	°°	12	°°	°°	°°
108	0,69	0,630	53,15 %	6 %	°°	°°	°°	°°	°°
109	0,69	0,630	55 %	6 %	°°	°°	°°	°°	°°
131	0,93	0,466	55 %	6 %	6,45	12	ND	ND	ND
132	0,94	0,466	55 %	6 %	6,76	13	6,1	5,8	0,3
136	0,94	0,463	55 %	6 %	9,36	°°	°°	°°	°°
137	0,94	0,460	55 %	6 %	9,37	°°	°°	°°	°°
138	0,94	0,457	55 %	6 %	°° 9,67	°°	°°	°°	°°
139	0,94	0,455	55 %	6 %	°° 9,92	°°	°°	°°	°°
140	0,94	0,452	55 %	6 %	°° 10,25	°°	°°	°°	°°
141	0,93	0,466	55 %	6 %	°°	°°	°°	°°	°°
142	0,93	0,471	55 %	6 %	°°	°°	°°	°°	°°
145	0,93	0,463	55 %	6 %	7,66/7,55°	13	6,1	5,8	0,3
144	0,93	0,460	55 %	6 %	7,73/7,80°	12 a 13	6,1	6,0	0,1
143	0,93	0,458	55 %	6 %	7,96/7,90°	13 a 14	6,0	5,5	0,5
124	0,95	0,466	55 %	6 %	9,48	13	5,9	< 2,85	> 3
Fontes diferentes de adipato comercial									
122	0,92	0,466	55 %	6 %	6,36	12	6,0	5,9	0,1
123	0,92	0,466	55 %	6 %	6,32	13	5,8	5,7	0,1
Fontes diferentes de sacarose comercial									
133	0,92	0,466	55 %	6 %	6,34	13	5,8	5,8	0
147	0,92	0,466	55 %	6 %	6,32	11 a 12	6,0	5,7	0,3
134	0,92	0,466	55 %	6 %	6,34	13	6,3	5,8	0,5
148	0,92	0,466	55 %	6 %	6,34	11 a 12	5,8	5,9	0

* avaliado pelo teste de Baby Rossett Rice (BRR) como adaptado de acordo com Exemplo III.2.2; ND = não determinado; ° = repetição

°° Formulação 45 foi descartada porque a capacidade antiácida foi muito longa

°° Formulações 103, 104 e 108, 109 foram descartadas porque o ácido adípico recristaliza no repouso a 4 a 8°C

°° Formulações nº 107, 141 e 142 foram descartadas porque elas foram similares à formulação já sob avaliação

°° Formulações nº 136 a 140 foram descartadas porque o pH inicial foi muito alto

II.5.2. Estabilidade de rotavírus e capacidade antiácida - resultados

[00156] A titulação viral de rotavírus em pontos no tempo diferentes

foi avaliada de acordo com o procedimento fornecido no Exemplo III.1 e a capacidade antiácida da formulação foi avaliada seguindo o protocolo fornecido no Exemplo III.2.2. Os resultados são ilustrados nas Tabelas 19, 20, 21 e 22.

Tabela 20 - Estabilidade viral na temperatura ambiente

Nº	Titulação viral depois do armazenamento na temperatura ambiente (log ₁₀ ffu por dose de vacina)							
	1 m*	2 m*	3 m*	4 m*	5 m*	6 m*	7 m*	8 m*
63	5,8	5,8	5,5	5,5	5,0			
81		5,5				4,9		
82		5,4				4,9		
83		5,6				5,1	5,0	
91		5,6			5,4	5,3	5,0	
92		5,5			5,3	5,2	5,0	
93		5,6			5,5	5,5	5,2	4,9
94		5,6			4,6			
95		5,6		5,5	5,4	5,4	5,4	5,1
96		5,8		5,8	5,5	5,7	5,7	5,2
97		5,7		5,5	5,4	5,3	5,4	4,9
105					4,8			
106						5,2	4,7	
132				5,8	5,8	5,5		

* = mês(es); Caixas em branco = não determinado

Tabela 21 - Estabilidade viral a 4°C

nº	Titulação viral depois do armazenamento a 4°C (log ₁₀ ffu por dose de vacina)								
		depois	1 m*	2 m*	4 m*	6 m*	9 m*	12 m*	15 m*
	T = 0	1w 37°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C
63	6,0	5,6	6,0	5,9	6,1	6,0		5,8	
81	5,9	5,7		5,6		5,4		6,0	
82	5,9	5,7		5,7		5,4		5,8	
83	5,9	5,8		5,8		5,7		5,9	
91	6,0	5,7		5,8		5,8		5,8	
92	6,0	5,7		5,9		5,9		5,8	
93	6,1	5,8		5,7		6,1		5,7	
94	5,9	5,8		6,1		6,2		5,8	
95	6,0	5,9		5,9		5,8		5,8	
96	6,1	6,0		5,7		5,9		5,9	
97	5,9	5,8		5,7		5,8		5,8	
105	5,8	5,5				5,9		5,7	
106	6,1	6,0				6,0		5,8	
132	6,1	5,8				5,8		5,8	
122	6,0	5,9				5,8		5,9	
123	5,8	5,7				5,9		5,8	
133	5,8	5,8				6,0		5,8	
134	6,3	5,8				6,0		5,7	
143	6,0	5,5						5,5	
144	6,1	6,0						5,4	
145	6,1	5,8						5,4	

* = mês(s); Caixas em branco = não determinado

[00157] A capacidade antiácida das formulações 91 a 94 foi medida pelo ‘método de Baby Rossett-Rice’ (ver o Exemplo III.2.2) e mostra as possibilidades para alcançar 8, 12, 16, ou 20 min em um pH > 4. Os resultados são mostrados na Tabela 22 e na Figura 2A.

Tabela 22

Tempo (min)	Formulação 94	Formulação 93	Formulação 92	Formulação 91
	pH	pH	pH	pH
0	6,11	6,5	6,24	6,37
1	5,11	5,07	4,93	4,79
2	5,03	4,98	4,84	4,67
3	4,96	4,9	4,75	4,56
4	4,90	4,83	4,67	4,45
5	4,85	4,76	4,58	4,34
6	4,79	4,69	4,51	4,23
7	4,74	4,62	4,42	4,12
8	4,68	4,56	4,34	4,00
9	4,63	4,49	4,26	3,86
10	4,57	4,42	4,17	3,70
11	4,51	4,36	4,08	
12	4,46	4,29	3,98	
13	4,40	4,22	3,87	
14	4,35	4,15	3,75	
15	4,29	4,07	3,6	
16	4,23	3,98		
17	4,17	3,88		
18	4,11	3,78		
19	4,05	3,66		
20	3,98			
21	3,91			
22	3,83			
23	3,75			
24	3,65			

[00158] Em conclusão, como foi observado para as outras formulações de carboxilato, na série de adipato, um valor de pH alto não forneceu bons dados de estabilidade (ver por exemplo a formulação 124 que tem um pH de 9,5 e exibe mais do que 2,85 log de perda viral depois do armazenamento de 1 semana a 37°C).

[00159] O valor limite de aceitabilidade mais alto do pH é cerca de 8,0 (ver por exemplo o valor do pH de 7,96 obtido para a formulação 143) para o qual uma perda viral de 0,5 log é observada depois de 1 semana a 37°C.

[00160] Uma faixa adequada de pH está entre cerca de pH 5,5 e cerca de pH 8 para estas formulações, com uma faixa mais adequada entre pH 6,0 e pH 7,7.

[00161] A formulação de adipato (um material aditivo alimentício) é um bom compromisso com valores de pKa ideais (pK_{a1} de 5,4 e pK_{a2} de 4,43) que permite que a capacidade antiácida alvo (por exemplo $t = 12$ min) seja alcançada usando quantidades razoáveis de material (cerca de 100 mg por dose). Além disso, estas quantidades são compatíveis com parâmetros de solubilidade desse modo permitindo formular a vacina em um volume de dose de 1,5 ml. Isto não é possível com as formulações de citrato fosfato clássicas devido às impraticidades técnicas tais como a cristalização de fosfato (ver Exemplo comparativo IV). Elas também são compatíveis com parâmetros de toxicidade visto que os dados de toxicidade são um tanto baixos (LD_{50} oral em rato: 5,7 g/kg) para adipato quando comparado a outros carboxilatos.

II.5.3. Efeito do título de vírus na dose de vacina em estabilidade viral

[00162] O experimento seguinte foi realizado para avaliar o efeito do título de rotavírus inicial (de $10^{6,0}$, $10^{6,5}$, $10^{5,2}$) em uma dose de vacina de 1,5 ml na estabilidade do rotavírus.

[00163] A titulação viral de rotavírus em pontos no tempo diferentes foi avaliada de acordo com o procedimento fornecido no Exemplo III.1 e a capacidade antiácida da formulação de acordo com o protocolo fornecido no Exemplo III.2.2. Os resultados são ilustrados nas Tabelas 23, 24, e 25.

Tabela 23

Nº	NaOH (M)	Ácido adípico (M)	Título viral alvo $\log_{10}$ ffu	Sacarose % p/p	pH de BRR* em t = 0	Tempo de BRR* em pH > 4 (min)	Título viral em t = 0 ($\log_{10}$ ffu por dose de vacina)	Título viral depois de 1w 37°C	Perda viral depois de 1w 37°C
100	0,928	0,466	6,0	55 %	6,59	12	6,0	5,7	0,3
101	0,928	0,466	6,5	55 %	6,96	12	6,7	6,5	0,2
102	0,928	0,466	5,2	55 %	6,45	12	5,4	5,4	0

* avaliado pelo teste de Baby Rossett Rice (BRR) como adaptado de acordo com o Exemplo III.2.2.

Tabela 24: Estabilidade viral na temperatura ambiente

Nº	Titulação viral depois do armazenamento na temperatura ambiente ($\log_{10}$ ffu por dose de vacina)									
	1 m*	2 m*	3 m*	4 m*	5 m*	6 m*	7 m*	8 m*	9 m*	10 m*
100					5,4	5,0				
101					6,0	5,5				
102					4,9	4,4				

* = mês(es); caixas em branco = não determinado

Tabela 25: Estabilidade viral a 4°C

Nº	Título Viral em t = 0	Título viral depois de 1w 37°C	1 m*	2 m*	3 m*	4 m*	6 m*	12 m*
100	6,0	5,7					6,0	5,8
101	6,7	6,5					6,6	6,4
102	5,4	5,4					5,3	5,2

* = mês(es); caixas em branco = não determinado

[00164] Em conclusão, na faixa avaliada, a estabilidade do rotavírus permanece similar e aceitável qualquer que seja o título de vírus inicial.

II.5.4. Formulações com adipato na presença de íons cálcio

[00165] Foi relatado que o cálcio pode influenciar a estabilidade e conformação da glicoproteína VP7 de rotavírus SA11 expressada em *Dictyostelium discoideum* (K.R. Emslie *et al.*, 1996, *Journal of Biotechnology* 50, 149 a 159). Pode ser benéfico adicionar íons cálcio à formulação líquida de rotavírus de adipato da invenção, visto que eles podem contribuir para a estabilização do rotavírus dentro da formulação.

Consequentemente, várias quantidades de íons cálcio foram testadas na formulação de adipato (Tabela 26). Duas alternativas foram testadas: CaCl_2 e $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

[00166] Formulações 98, 116 a 118: a 9,28 g de NaOH são sucessivamente adicionados: água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g), 17,00 g de ácido adípico, CaCl_2 como especificado na Tabela 26, (uma precipitação ocorre, mas o precipitado redissolve depois de uma hora de agitação na temperatura ambiente, exceto na formulação nº 117), e 178,75 g de sacarose. O restante das etapas de formulação são idênticas àquelas descritas para a formulação 82. Nesta formulação DMEM representa 6 % p/p.

[00167] Formulação 99: à água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g) são sucessivamente adicionados: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ como especificado na Tabela 26, 17,00 g de ácido adípico, 9,02 g de NaOH e 178,75 g de sacarose. O restante das etapas de formulação são idênticas àquelas descritas para a formulação 82. Nesta formulação DMEM representa 6 % p/p. Titulação viral de rotavírus em pontos no tempo diferentes foi avaliada de acordo com o procedimento fornecido no Exemplo III.1 e a capacidade antiácida da formulação foi avaliada seguindo o protocolo fornecido no Exemplo III.2.2. Os resultados são ilustrados nas Tabelas 26, 27 e 28.

[00168] Formulações 119 a 121: ao CaCl_2 como especificado na Tabela 26 são sucessivamente adicionados: água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g), 9,28 g de NaOH (neste caso precipitação de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ocorre, mas o precipitado redissolve depois da adição do ácido adípico exceto na formulação nº 121), 17,00 g de ácido adípico e 178,75 g de sacarose. O restante das etapas de formulação são idênticas àquelas descritas para a formulação 82. Nesta formulação DMEM representa 6 % p/p.

Tabela 26

Nº	NaOH (M)	Ácido adípico (M)	CaCl ₂ (M)	Sacarose % p/p	pH de BRR* em t = 0	Tempo de BRR* em pH > 4 (min)	Título viral em t = 0 (log ₁₀ ffu por dose de vacina)	Título viral depois de 1w 37°C	Perda viral depois de 1w 37°C
98	0,928	0,466	0,013	55 %	6,59	12 a 13	6	5,8	0,2
118	0,928	0,466	0,004	55 %	6,96	12	6,1	5,8	0,3
116	0,928	0,466	0,0129	55 %	6,45	12	5,9	5,8	0,1
119	0,928	0,466	0,0132	55 %	6,36	12	5,9	6	0
117	0,928	0,466	0,018	55 %	∞	∞	∞	∞	∞
120	0,928	0,466	0,019	55 %	6,18	11 a 12	6	5,8	0,2
121	0,928	0,466	0,051	55 %	∞	∞	∞	∞	∞
		Ca(OH) ₂ (M)							
99	0,902	0,466	0,0086	55 %	6,54	13 a 14	5,8	5,7	0,1

* avaliado pelo teste de Baby Rossett Rice (BRR) como adaptado de acordo com o Exemplo III.2.2.

∞ Formulações 117 e 121 foram descartadas porque alguma precipitação de material insolúvel ocorreu durante suas preparações

Tabela 27: Estabilidade viral na temperatura ambiente

Nº	Titulação viral depois de armazenamento na temperatura ambiente (log ₁₀ ffu por dose de vacina)									
	1 m*	2 m*	3 m*	4 m*	5 m*	6 m*	7 m*	8 m*	9 m*	10 m*
98					5,5	5,7	5,5	5,2		
118					6,0	5,7				5,0
116					5,9	5,6				5,1
119					5,8	5,3				
120					5,7	5,1				
99					5,4	5,4	5,2	4,9		

* = mês(es); caixas em branco = não determinado

Tabela 28: Estabilidade viral a 4°C

Nº	Título Viral em t = 0	Título viral depois de 1w 37°C	1 m*	2 m*	3 m*	4 m*	6 m*	12 m*
98	6	5,8					5,8	6,0
118	6,1	5,8					6,2	6,1
116	5,9	5,8					5,9	6,1
119	5,9	6					5,9	5,9
120	6	5,8					5,9	5,9
99	5,8	5,7					5,9	5,9

* = mês(es); caixas em branco = não determinado

[00169] Conclusão: a estabilidade de rotavírus na presença de íons cálcio é ilustrada: não mais que perda de 0,3 log é experimentado depois de 1 semana a 37°C, que é similar ao resultado obtido para as formulações fabricadas nas mesmas condições e contendo os mesmos ingredientes exceto os íons cálcio adicionados (ver por exemplo a formulação 83 nas Tabelas 19 a 21).

II.5.5 Formulações com adipato na presença de Vírus da Poliomielite Orais

[00170] Alguns esquemas de imunização de rotina podem associar-se ao mesmo ponto no tempo às vacinações contra poliomielite e rotavírus orais. O objetivo do experimento seguinte foi avaliar se ambas as vacinações foram compatíveis. Uma vacina combinada contra poliomielite/rotavírus oral experimental portanto foi preparada.

[00171] Composição de meio OPV usado para as formulações 149, 151 a 155

Água para injeção: 80,00 L

Lactalbumina hidrolisada: 1500,00 g

Água para injeção: 200,00 L

Cloreto de sódio: 2040,00 g

Cloreto de potássio: 120,00 g

Sulfato de magnésio 7.H₂O: 30,00 g

KH₂PO₄: 38,00g

Glicose anidra: 1200,00 g

Sulfato de neomicina: 15,00 g

Tween 80: 6,00 g

Cloreto de cálcio.2H₂O: 80,00 g

Hidróxido de sódio: 30,00 g

Bicarbonato de sódio: 660,00 g

Vermelho de fenol: 6,00 g

L-cistina: 30,00 g

Ácido clorídrico 1 N: 550,00 g

Sulfato de polimixixina B: 30,00 g

Água para injeção até 300,00 L

[00172] Formulações 149 a 155: À água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g) são sucessivamente adicionados: NaOH e ácido adípico em quantidades como descrito na Tabela 29, e 178,75 g de sacarose. Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis, e seguindo as quantidades como descrito na Tabela 29, o meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter $10^{6,5}$ de CCID50 por dose e o meio OPV contendo as quantidades necessárias de vírus da poliomielite para obter $10^{6,6}$ do tipo I, $10^{5,6}$ do tipo II, $10^{6,1}$ do tipo III de CCID50 por dose foram adicionados. Neste caso a dose é de 1,5 ml ou 1,95 g. A mistura resultante é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Nestes exemplos DMEM representa 6 % p/p, sacarose está em 55 % p/p, NaOH é 0,92 M, ácido adípico é 0,466 M.

Tabela 29

	NaOH	Ácido Adípico	Água	Meio DMEM de Rota	Rota-vírus	Meio OPV	OPV Tipo I	OPV Tipo II	OPV Tipo III
	g	g	g	g	g	g	g	g	g
149	9,2	17	92,55	19,5	-	8,00	-	-	-
150	9,2	17	100,55	14,24	5,26	-	-	-	-
151	9,2	17	92,55	- 14,24	5,26	8,00	-	-	-
152	9,2	17	92,55	19,5	-	0,07	5,30	0,53	2,10
153	9,2	17	92,55	19,5	-	2,70	5,30	-	-
154	9,2	17	92,55	19,5	-	7,47	-	0,53	-
155	9,2	17	92,55	19,5	-	5,90	-	-	2,10

[00173] A titulação viral de rotavírus em pontos no tempo diferentes foi avaliada de acordo com o procedimento fornecido no Exemplo III.1 e a capacidade antiácida da formulação foi avaliada seguindo o protocolo fornecido no Exemplo III.2.2. Os resultados são ilustrados na Tabela 30.

Tabela 30 (Nesta tabela: todos os títulos virais em CCID50/dose)**

	BRR* min	Rota Alvo	OPV Tipo I Alvo	OPV Tipo II Alvo	OPV Tipo III Alvo	Título de Rota t = 0 4°C	Título de Rota 1w 37°C	Título de OPV I	Título de OPV II	Título de OPV III
149	12	nenhu m	nenhum	nenhum	nenhum					
150		10 ^{6,5}	nenhum	nenhum	nenhum	10 ^{6,2}	10 ^{6,2}			
151		10 ^{6,5}	nenhum	nenhum	nenhum	10 ^{6,3}	10 ^{6,3}			
152		nenhu m	10 ^{6,6}	10 ^{5,6}	10 ^{6,1}			10 ^{6,7}	10 ^{5,6}	10 ^{6,2}
153		nenhu m	10 ^{6,6}	nenhum	nenhum					
154		nenhu m	nenhum	10 ^{5,6}	nenhum					
155		nenhu m	nenhum	nenhum	10 ^{6,1}					

* avaliado pelo teste de Baby Rossett Rice (BRR) como adaptado de acordo com o Exemplo III.2.2.

** Pode ser estimado que a correspondência entre ffu e CCID50 é de cerca de 0,5 log (por exemplo 10^{6,0} como expressado em CCID50 é equivalente a aproximadamente 10^{5,5} como expressado em ffu por dose).

Caixas em branco: não determinado

“nenhum” significa que o vírus correspondente não foi incorporado na fórmula

[00174] Conclusões:

1) Meio de poliomielite é compatível com a capacidade antiácida (BRR 12 min na formulação n° 149).

2) Meio de poliomielite é compatível com Rotavírus (comparando a formulação n° 150 à formulação n° 151, onde pode ser observado que os mesmos títulos são obtidos para ambas as formulações, tanto em t = 0 4°C quanto depois de uma semana a 37°C).

3) Composição de rotavírus é compatível com poliovírus (título viral de poliomielite esperado obtido na formulação n° 152).

II.5.6 Estabilidade das formulações de adipato durante um evento de congelamento

II.5.6.1. Congelamento a -20°C

[00175] A formulação de rotavírus n° 95, depois de 6 meses armazenada entre +4°C e +8°C, foi submetida a 3 eventos de congelamento (-20°C) sucessivos de acordo com a cronometragem seguinte (Tabela 31)

II.5.6.2. Congelamento a -70°C

[00176] A formulação de rotavírus n° 95, depois de 14 meses armazenada entre +4°C e +8°C, foi submetida a um congelamento no evento de -70°C de acordo com a cronometragem seguinte (Tabela 31):

Tabela 31

Duração a -20°C	T = +4°C	T = -20°C	T = -70°C
t = 0 (depois de 6 meses a 4 a 8°C)		9 frascos	
t = 120 dias	Novamente de -20: 9 frascos		
t = 120 dias	3 frascos: 1x -20°C	6 frascos	
t = 196 dias	Novamente de -20: 6 frascos		
t = 197 dias	3 frascos: 2x -20°C	3 frascos	
t = 224 dias	Novamente de -20: 3 frascos: 3x -20°C		
Duração a -70°C			
t = 0 (depois de 14 meses a 4 a 8°C)			3 frascos
t = 15 dias	Novamente de -70: 3 frascos 1x -70°C		

[00177] As amostras foram analisadas e comparadas ao título viral em t = 0 (4°C) e também ao título viral de amostras da mesma idade armazenadas na temperatura de refrigerador usual (15 meses a + 4°C neste caso). Os resultados são mostrados na Tabela 32.

Tabela 32

	t = 0, 4°C	t = 15 meses, 4°C
N° 95	6,0	5,9
N° 95 1x -20°C		5,8
N° 95 2x -20°C		5,9
N° 95 3x -20°C		5,9
N° 95 1x -70°C		5,9

[00178] Em conclusão, a composição da formulação n° 95 (formulação de adipato) é compatível com pelo menos 3 eventos de congelamento sucessivos a -20°C. Ela também é compatível com pelo menos um evento de

congelamento a -70°C.

II.6. Formulações com malato como um carboxilato

II.6.1. As Formulações apresentadas na Tabela 33 (exceto as formulações 46, 64, 84, 85 e 86) foram fabricadas em escala de 325 g (250 ml) representando 166,6 doses de 1,5 ml (1,95 g) cada. Materiais antiácidos: Ácido D,L-málico (Mw 146), NaOH (Mw 40).

[00179] A formulação n° 46 foi fabricada em escala de 44 g (35 ml) representando 20 doses de 1,75 ml (2,2 g) cada. Materiais antiácidos: Ácido D,L-málico (Mw 146), NaOH (Mw 40). Formulação 46: a 15,74 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 44 g) são sucessivamente adicionados: 2,4 g de NaOH, 4,0211 g de ácido málico e 19,5 g de sacarose (44 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 2,34 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter $10^{6,0}$ ffu por dose são adicionados. Neste caso a dose é de 1,75 ml ou 2,2 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6. % p/p.

[00180] A formulação n° 64 foi fabricada em escala de 318,4 g (244,5 ml) representando 163 doses de 1,5 ml (1,95 g) cada. Materiais antiácidos: Ácido D,L-málico (Mw 146), NaOH (Mw 40). A formulação n° 84 foi fabricada em escala de 130 g (100 ml) representando 66,6 doses de 1,5 ml (1,95 g) cada. Materiais antiácidos: Ácido D-málico (Mw 146), NaOH (Mw 40). A formulação n° 85 foi fabricada em escala de 130 g (100 ml) representando 66,6 doses de 1,5 ml (1,95 g) cada. Materiais antiácidos: Ácido L-málico (Mw 146), NaOH (Mw 40). A formulação n° 86 foi fabricada em escala de 130 g (100 ml) representando 66,6 doses de 1,5 ml (1,95 g) cada. Materiais antiácidos: Ácido D,L-málico (Mw 146), NaOH (Mw 40).

[00181] Formulação 64: a 97,3 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 318,4 g) são sucessivamente

adicionados: 14,6 g de NaOH, 24,50 g de ácido málico e 162,5 g de sacarose (51 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 19,5 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter $10^{6,0}$ ffu por dose são adicionados. Neste caso a dose é de 1,5 ml ou 1,95 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6,12 % p/p.

[00182] Formulação 71: a 103,9 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g) são sucessivamente adicionados: 14,90 g de NaOH, 25,00 g de ácido adípico e 162,5 g de sacarose (50 % p/p). O restante das etapas de formulação são idênticas às aquelas descritas para a formulação 67. Neste exemplo DMEM representa 6 % p/p.

[00183] Formulações 72 a 77, 84 a 86: ela foi procedida como para a formulação 71 mas com quantidades ajustadas (ver a Tabela 33).

[00184] Formulação 78: a 75,00 g de água são sucessivamente adicionados: 8,00 g de NaOH, 25,00 g de ácido málico, solução de NaOH 1N o bastante para alcançar um pH de 6,48, água adicional para alcançar 325 g e 162,50 g de sacarose (50 % p/p). O restante das etapas de formulação são idênticas às aquelas descritas para a formulação 67. Neste exemplo DMEM representa 6 % p/p.

[00185] Formulações 79 e 80: ela foi procedida como para a formulação 78 mas com quantidades ajustadas (ver a Tabela 33).

Tabela 33

Nº	NaOH (M)	Ácido Málico (M)	Sacaros e % p/p	DMEM % p/p	pH de BRR* em t = 0	Tempo de BRR* no pH > 4 (min)	Título Viral em t = 0	Título viral depois de 1w 37°C	Perda viral depois de 1w 37°C
							(log ₁₀ ffu por dose de vacina)		
46	1,71	0,787	44 %	6 %	6,92	20	6,0	5,9	0,1
64	1,490	0,747	51 %	6,12 %	6,08	11-12	6,0	5,9	0,1
71	1,490	0,746	50 %	6 %	5,67	11	5,9	5,8	0,1
72	1,240	0,621	50 %	6 %	6,15/6,16°	8	5,8	5,8	0
73	2,00	0,918	50 %	6 %	0°	∞	∞	∞	∞
74	1,490	0,746	53 %	6 %	5,19	8	5,8	5,8	0
75	1,490	0,746	56 %	6 %	00	,0	00	,0	00
76	1,79	0,896	47 %	6 %	5,21	14	5,7	5,8	0
77	1,79	0,896	44 %	6 %	5,35	15	5,8	5,9	0
78	Até o pH 6,48	0,746	50 %	6 %	7,1/7,05°	9	5,9	5,6	0,3
79	Até o pH 5,98	0,746	50 %	6 %	6,42/6,41°	9	5,9	5,5	0,4
80	Até o pH 7,05	0,746	50 %	6 %	7,43	9 a 10	6,0	5,4	0,6
86	1,490	0,746	50 %	6 %	5,82	11	6,1	5,8	0,3
84	1,490	0,746	50 %	6 %	5,82	11	5,8	5,8	0
85	1,490	0,746	50 %	6 %	6,03	11	5,7	5,7	0

*avaliado pelo teste de Baby Rossett Rice (BRR) como adaptado de acordo com o Exemplo III.4.4

= repetição

∞ A formulação 73 foi descartada por causa de dificuldades durante a filtração estéril devido à viscosidade alta da solução

∞ A formulação 75 foi descartada por causa da solubilização lenta da sacarose

[00186] A titulação viral de rotavírus em pontos no tempo diferentes foi avaliada de acordo com o procedimento fornecido no Exemplo III.1 e a capacidade antiácida da formulação foi avaliada seguindo o protocolo fornecido no Exemplo III.2.2. Os resultados são ilustrados nas Tabelas 33, 34 e 35.

Tabela 34: Estabilidade viral na temperatura ambiente

Nº	Titulação viral depois do armazenamento na temperatura ambiente ($\log_{10}$ ffu por dose de vacina)									
	1 m*	2 m*	3 m*	4 m*	5 m*	6 m*	7 m*	8 m*	9 m*	10 m*
64	5,8	5,9	5,6	5,7	5,2	ND	ND	ND	ND	ND
85	ND	5,7	5,2	ND	ND	4,7	ND	ND	ND	ND

* = mês(s); ND = não determinado

Tabela 35 - Estabilidade viral a 4°C

Nº	Título Viral em t = 0	Título viral depois de 1w 37°C	1 m*	2 m*	3 m*	4 m*	6 m*	12 m*
64	6,0	5,9	5,8	5,8	ND	5,8	ND	5,5
85	5,7	5,8	ND	5,8	ND	ND	5,6	5,7

* = mês(s); ND = não determinado

II.6.2. Estabilidade do rotavírus e capacidade antiácida - resultados

[00187] A estabilidade do rotavírus em uma formulação de malato líquida é relacionada ao pH. A faixa do pH que foi investigada, isto é, faixa do pH de 6,0 a 7,0 fornece uma boa estabilidade durante 1 semana a 37°C.

II.7. Formulações com glutamato

[00188] Aspartato e glutamato são aminoácidos com um grupo carboxilato em sua cadeia lateral. Os valores do pKa deste ácido carboxílico de cadeia lateral são 3,65 e 4,25 respectivamente. Assim, glutamato com pKa mais alto que 4 pode ser usado como tampão para formar a capacidade antiácida. Ver a Tabela 36.

[00189] Formulações 41: À água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g) são sucessivamente adicionados: NaOH, ácido glutâmico e sacarose em quantidades como descrito na Tabela 36. Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 μ m. Sob condições estéreis 19,5 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter $10^{6,0}$ ffu por dose são adicionados. Neste caso a dose é de 1,5 ml ou 1,95 g. A mistura resultante é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo

DMEM representa 6 % p/p.

[00190] Formulação 43: À água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 44 g) são sucessivamente adicionados: 7,1 g de glutamato monossódico 1H₂O e 19,50 g de sacarose (44 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 2,64 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus são adicionados à solução, para obter 10^{6,0} ffu por dose. Neste caso a dose é de 1,75 ml ou 2,2 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6 % p/p.

[00191] Formulação 61: À água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g) são sucessivamente adicionados: 52,43 g de glutamato monossódico 1H₂O e 144 g de sacarose (44 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 19,5 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus são adicionados à solução, para obter 10^{6,0} ffu por dose. Neste caso a dose é de 1,75 ml ou 2,2 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6 % p/p.

[00192] Formulação 68: À água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 250 g) são sucessivamente adicionados: 0,2 g de glutamato monossódico 1H₂O, 2,5 g de albumina sérica bovina, 0,250 g de Na₂HPO₄.2H₂O, 0,125 g de KH₂PO₄, 0,5 g de EDTA e 18,75 g de sacarose (7,5 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 19,5 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus são adicionados à solução, para obter 10^{6,0} ffu por dose. Neste caso a dose é de 1,5 ml ou próximo a 1,5 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 7,8 % p/p.

[00193] A titulação viral de rotavírus em pontos no tempo diferentes foi avaliada de acordo com o procedimento fornecido no Exemplo III.1 e a capacidade antiácida da formulação foi avaliada seguindo o protocolo fornecido no Exemplo III.2.2. Os resultados são ilustrados nas Tabelas 36, 37 e 38.

Tabela 36

Nº	NaOH (M)	Ácido glutâmico (M)	Sacarose % p/p	DME M % p/p	pH de BRR* em t = 0	Tempo de BRR* no pH > 4 (min)	Título Viral em t = 0	Título viral depois de 1w 37°C	Perda viral depois de 1w 37°C
41	1,06	0,542	51 %	6 %	10,36	15	∞	∞	
	glutamato de Na (M)								
43	1,088		44 %	6 %	6,92	12	6,0	5,8	0,2
61	1,085		44 %	6 %	6,93	11-12	6,1	6,1	0
68	0,0043		7,5 %	7,8 %	6,85	< 1	6,0	< 3	> 3

*avaliado pelo teste de Baby Rossett Rice (BRR) como adaptado de acordo com o Exemplo III.2.2.

∞ A formulação 41 foi descartada porque seu pH inicial foi muito alto

∞ A formulação 68 foi descartada do estudo de estabilidade a longo prazo por causa de seu resultado de perda viral insatisfatório obtido depois de 1 semana a 37°C

Tabela 37: Estabilidade viral na temperatura ambiente

Nº	Titulação viral depois do armazenamento na temperatura ambiente (log ₁₀ ffu por dose de vacina)									
	1 m*	2 m*	3 m*	4 m*	5 m*	6 m*	7 m*	8 m*	9 m*	10 m*
41										
43										
61	6,1	5,7	5,6							
68										

* = mês(es); caixas em branco = não determinado

Tabela 38: Estabilidade viral a 4°C

Nº	Título Viral em t = 0	Título viral depois de 1w 37°C	1 m*	2 m*	18 m*
41					
43					
61	6,1	6,1	6,1	6,0	5,6
68					

* = mês(s); caixas em branco = não determinado

[00194] A estabilidade do rotavírus em uma formulação de glutamato líquida é similar à estabilidade obtida com outros carboxilatos descritos aqui acima. Em resumo:

- a estabilidade é melhor no pH em torno de 7 (6,93 na formulação nº 61) comparada ao meio mais básico (pH 10,36 na formulação nº 43)

- a estabilidade também é melhor na porcentagem alta de sacarose (44 % de sacarose na formulação nº 61 comparado a 7,5 % de sacarose na formulação nº 68)

- as curvas de perfil da estabilidade em 1 semana a 37°C, na temperatura ambiente, e a 4 a 8°C são similares a outros carboxilatos descrito aqui acima.

II.8. Formulações com fumarato

[00195] Formulação 44: a 16,28 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 44 g) são sucessivamente adicionados: 2,4 g de NaOH, 3,4811 g de ácido fumárico e 19,5 g de sacarose (44 % p/p). Depois de uma hora de agitação na temperatura ambiente o material insolúvel permanece em suspensão. A preparação foi descartada.

II.9. Formulações com lactobionato

[00196] Formulação 47: a 16,02 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 44 g) são sucessivamente adicionados: 1,2 g de NaOH, 10,7414 g ácido lactobiônico e 13,7 g de sacarose (31 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada

por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 2,34 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter $10^{6,0}$ ffu por dose são adicionados. Neste caso a dose é de 1,75 ml ou 2,2 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6. % p/p.

II.10. Formulações com maleato

[00197] Formulação 48: a 16,88 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 44 g) são sucessivamente adicionados: 2,4 g de NaOH, 2,8821 g de anidrido maléico e 19,5 g de sacarose (44 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 2,34 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter $10^{6,0}$ ffu por dose são adicionados. Neste caso a dose é de 1,75 ml ou 2,2 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6. % p/p.

[00198] Formulação 57: a 110,3 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g) são sucessivamente adicionados: 32,7 g de maleato de dissódio e 162,5 g de sacarose (50 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 19,5 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter $10^{6,0}$ ffu por dose são adicionados. Neste caso a dose é de 1,5 ml ou 1,95 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6. % p/p.

II.11. Formulações com glicoronato

[00199] Formulação 49: a 16,14 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 44 g) são sucessivamente adicionados: 1,2 g de NaOH, 5,8211 g de ácido glicurônico e 18,5 g de sacarose (42 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada

por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 2,34 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter 10^{6,0} ffu por dose são adicionados. Neste caso a dose é de 1,75 ml ou 2,2 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6. % p/p.

II.12. Formulações com galacturonato

[00200] Formulação 52: a 16,14 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 44 g) são sucessivamente adicionados: 1,2 g de NaOH, 5,8218 g de ácido galacturônico e 18,5 g de sacarose (42 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 2,34 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter 10^{6,0} ffu por dose são adicionados. Neste caso a dose é de 1,75 ml ou 2,2 g. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6. % p/p.

II.13. Formulações com galactarato

[00201] Formulação 53: a 15,96 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 44 g) são sucessivamente adicionados: 2,4 g de NaOH, 6,3008 g de ácido galactárico e 17,0 g de sacarose (38 % p/p). Depois de uma hora de agitação na temperatura ambiente o material insolúvel permanece em suspensão. A preparação foi descartada.

II.14. Formulações com tartarato

[00202] Formulação 55: a 15,26 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 44 g) são sucessivamente adicionados: 2,4 g de NaOH, 4,4996 g de ácido tartárico e 19,5 g de sacarose (44 % p/p). Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 µm. Sob condições estéreis 2,34 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus para obter 10^{6,0} ffu por dose são adicionados. Neste caso a dose é de 1,75 ml ou 2,2 g. A mistura é

homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriado. Neste exemplo DMEM representa 6. % p/p.

II.15. Conclusão global para as formulações contendo um carboxilato na ausência de fosfato adicionado

[00203] Várias formulações estáveis foram preparadas com vários carboxilatos, na ausência de fosfato adicionado. O único fosfato presente nestas formulações experimentais originou-se do tampão de DMEM e nunca excedeu 0,059 mM (5 % p/p de DMEM), 0,071 mM (6 % p/p de DMEM), ou 0,094 mM (8 % p/p de DMEM). Todos os carboxilatos testados mostraram a capacidade para agir como agentes tamponantes em neutralizar a acidez estomacal deste modo prevenindo ou minimizando a inativação do ingrediente ativo, isto é, o antígeno de rotavírus, presente na formulação. Todas as formulações testadas, fabricadas em vários volumes de dose de administração (isto é, 1,5 ml, 2,0 ml e 2,5 ml), exibiram um pH entre cerca do pH 5,0 a cerca do pH 8,0, e para a maioria das formulações um pH de cerca do pH 5,5 a cerca de 7,5. Estas formulações realizaram bem durante o teste de estabilidade nas três temperaturas de armazenamento testadas (isto é, 37°C, temperatura ambiente ou 4°C). Além disso, estas formulações exibiram uma capacidade antiácida satisfatória, isto é, uma capacidade antiácida de pelo menos 8 minutos, e para a maioria das formulações de pelo menos 12 minutos, como avaliado pelo teste de BRR (ver o procedimento no Exemplo III.2.2).

[00204] Na Tabela 39 seguinte é apresentado um resumo curto dos dados de estabilidade obtidos para formulações de adipato selecionadas de acordo com o pH da formulação. Os critérios seguintes foram avaliados: i) perda viral depois do armazenamento durante uma semana a 37°C (estabilidade acelerada) (*), ii) tempo expressado em meses dentro do qual a perda de título viral permanece abaixo de 1,0 log (depois do armazenamento na temperatura ambiente) juntamente com o título viral alcançado no período

de tempo mencionado (**), iii) título viral em ffu/dose de vacina alcançado depois do armazenamento durante um ano (12 meses) a 4°C (***).

Tabela 39

	pH ^{\$}	Perda viral depois* de 1 w 37°C			T° ambiente < 1 log	**	4°C 12M	***		****
sacarose a 45 %										
82	6,39	0,2			6M 4,9		5,8			
sacarose a 50 %										
63	6,49	0,4			5M 5,0		5,8			
81	6,2	0,2			6M 4,9		6			
sacarose a 55 %										
124	9,48	> 3			não feito					
143	8	0,5			não feito		5,5			
144	7,75	0,1			não feito		5,4			
145	7,35	0,3			não feito		5,4			
132	6,76	0,3			6M 5,5		5,8			
96	6,55	0,1			8M 5,2		5,9			
83	6,38	0,1			7M 5,0		5,9			
95	6,3	0,1			8M 5,1		5,8			
97	6,3	0,1			8M 4,9		5,8			
106	5,97	0,1			6M 5,2		5,8			
105	5,98	0,3			5M 4,8		5,7			
104	5,12	0,2		cristaliza						
103	5,09	0,4		cristaliza						

M = meses

\$ = pH como avaliado em T = 0 (4°C) pelo teste de BRR de acordo com o Exemplo III.2.2

* melhores resultados com base no teste de estabilidade a 37°C de 1 semana - uma perda de título viral máxima de 0,5 log é tolerada

** melhores resultados com base no teste de estabilidade na temperatura ambiente - uma perda de título viral máxima de 1,0 log é tolerada

*** melhores resultados com base no teste de estabilidade a 4 a 8°C - uma perda de título viral máxima de 0,5 log é tolerada

**** melhores resultados cumulativos - tanto uma perda de título viral $\geq 0,5$ log mas $< 1,0$ log, quanto uma perda de título de $< 0,5$ log são toleradas e ambas aceitáveis de acordo com estes critérios

[00205] Sombreado cinza: formulação aceitável para os critérios avaliados (*, **, *** ou ****) com uma perda viral $< 0,5$ log; caixa tracejada: formulação aceitável para os critérios avaliados (*, **, *** ou ****) com uma

perda viral $\geq 0,5$ log mas $< 1,0$ log; sombreado preto: formulação inaceitável visto que a cristalização ocorre.

[00206] Claramente, nas formulações de adipato testadas, a faixa do pH de cerca de 6,0 a cerca de 8,0 (6 a 8) exibiu um perfil de estabilidade bom, aceitável, compatível com uma perda de título viral máxima de 1,0 log, e a sub-faixa do pH de cerca de 6,0 a 6,8 (6 a 6,8) um perfil de estabilidade bom, aceitável, compatível com uma perda de título viral máxima de 0,5 log.

Exemplo III - Métodos

III.1 Titulação viral de rotavírus

[00207] A detecção de rotavírus infecciosos é feita por incubação da formulação contendo o rotavírus e vários componentes em células MA104 tolerantes (ATCC CRL 2378).

[00208] O Rotavírus (por exemplo rotavírus P43, ECACC 99081301) foi formulado como descrito nos exemplos acima. Depois da inoculação de amostras virais, as células são incubadas durante 16 a 18 horas. As células depois são fixadas e permeabilizadas com acetona a 80 %. As células infectadas são identificadas por imunofluorescência indireta usando um anticorpo anti-rotavírus monoclonal específico da proteína VP6 (Mab 9F6) detectado por IgG conjugada à fluoresceína e examinado sob microscópio UV. Quaisquer anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis contra a proteína VP6 de rotavírus são adequados, e diluições de trabalho apropriadas serão determinadas por experimentação de rotina. Por exemplo os monoclonais seguintes são adequados:

- RV 11-2 (IgG2a, líquido ascítico conjugado com isotiocianato de fluoresceína) da Rural Technologies Inc (www.ruraltechinc.com)

- 5F8 F9 (IgG1, catálogo número RVM-1601A-5) ou 2F2 I9 (IgG2b, catálogo número RVM1601B-5) da Austral Biologicals (www.australbiologicals.com)

- MABR10 (fração de IgG) da Immunological and Biochemical testsystems GmbH (www.afsbio.com)

- Anticorpos policlonais de rotavírus anti-Vp6, por exemplo AB1129F da Chemicon (www.chemicon.com) também são adequados.

[00209] Cada um dos focos fluorescentes corresponde a um vírus infeccioso. Os títulos são expressados como o logaritmo de unidade de formação de focos por ml ($\log(\text{ffu/ml})$). A precisão da titulação viral é em torno de + ou - 0,2 log. Os resultados da titulação viral em ffu/ml são convertidos a ffu/dose de acordo com a dose de volume de amostra inicial. Todos os dados apresentados nas Tabelas são em log de base 10 ($\log_{10}$) ffu por dose.

[00210] Bons resultados são aqueles em que uma diminuição de $< 0,5$ log durante o (teste de estabilidade acelerada) de “1 semana a 37°C” é obtida. Formulações, que exibem uma perda viral de 1 log ou acima, são descartadas de outros testes de estabilidade.

III.2 Método para a medição de antiácido: Titulação de Baby Rossett-Rice (BRR)

III.2.1. Introdução

[00211] O teste de Titulação de Baby Rossett-Rice (BRR) foi adaptado a uma população infantil do teste de Titulação de Rossett-Rice originalmente desenvolvido para uma população adulta.

[00212] A titulação de Rossett-Rice é um teste bem conhecido usado no domínio de antiácido (ver N.E. Rossett e Marion L. Rice in Gastroenterology, 1954 volume 26 páginas 490-495: ‘An in vitro evaluation of the efficacy of the more frequently used antacids with particular attention to tablets’). A titulação de Rossett-Rice mede a taxa de reação da substância antiácida sob teste com ácido clorídrico 0,1 N e a duração do pH elevado. Para estimular as condições no estômago vazio, ácido clorídrico fresco é adicionado de uma vez no começo da medição. Para estimular as condições

no estômago durante o processo de digestão, ácido clorídrico fresco é adicionado em uma taxa constante à mistura de reação sob teste.

[00213] Brevemente, a titulação de Rossett-Rice em adultos é dividida em duas partes:

- a adição inicial de 30 ml de HCl 0,1 N, que representam o teor ácido do bolo de um estômago vazio;

- seguido pela adição contínua, em uma taxa de 4 ml/min, de HCl 0,1 N, que é um mimetismo da secreção estomacal ácida durante a digestão.

[00214] Estas são as condições experimentais usualmente consideradas como representativas de um estômago de adulto médio.

III.2.2. Ensaio de titulação de BabyRossett-Rice

[00215] Com base nas condições de Rossett-Rice padrão como descrito no procedimento original, o teste foi adaptado para ser representativo de um estômago de bebê de seis meses de idade e é referido abaixo para o ensaio de titulação de 'Baby Rossett-Rice (BRR).

[00216] De acordo com as Tabelas Científicas de Geigy (Volume 1 página 126, Ciba-Geigy 1981, eds), os dados seguintes são de interesse no que diz respeito à excreção de HCl no estômago (ver a Tabela 40):

Tabela 40

	Produção de ácido basal		Produção de ácido máxima	
Crianças	Média	Faixa extrema	Média	Faixa extrema
9 a 11 semanas	0,149 mmol/h	0,05 a 0,30 mmol/h	0,56 mmol/h	0,39 a 0,84 mmol/h
6 a 7 meses	0,193 mmol/h	0,07 a 0,40 mmol/h	2,08 mmol/h	1,33 a 2,88 mmol/h

[00217] Assim, com base nesses dados, nós escolhemos as condições mais severas para abranger todas as situações:

- Quantidade de HCl inicial: 0,40 mmol (4 ml de HCl 0,1N)
 - Adição contínua de quantidade de HCl 0,1N: 2,90 mmol/h (ou 0,048 mmol/min). Na prática uma taxa de 0,5 ml/min de HCl 0,1N é usada.

[00218] Um esboço da configuração experimental do BRR é mostrado na Figura 2B. A Tabela 41 resume a diferença entre o BRR quando comparado ao procedimento publicado original.

Tabela 41

Nome do teste:	Rossett-Rice	Baby-Rossett-Rice
Referência	- Gastroenterology 1954 vol. 26 páginas 490-495. - ver também Antacid test in Pharmacopeae	- dados não publicados de GSK - Valores das taxas de secreção de HCl no estômago para recém-nascidos são de Tabelas Científicas de Geigy (1981) Volume 1 página 126.
Aplicando para:	Adultos	recém-nascidos de 6 meses
Temperatura aplicada durante o teste	37°C	37°C
Volume do béquer	400 ml	50 ml
Volume de água inicial	70 ml	8,5 ml se a amostra antiácida for 1,5 ml 8,0 ml se a amostra antiácida for 2,0 ml 7,5 ml se a amostra antiácida for 2,5 ml
Quantidade de antiácido	Equivalente a 0,330 g de Al ₂ O ₃	Variável de acordo com a amostra testada e volume de dose; usualmente entre 0,8 e 1,8 mili-equivalente de HCl
Quantidade adicionada de HCl 0,1 N inicial em t = 0	30 ml	4 ml
Taxa de HCl 0,1N adicionada durante a medição	4 ml/min	0,5 ml/min
Medição de tempo para que o pH alcance:	pH = 3	pH = 4
Resultados típicos	3 a 4 horas acima do pH 3	8 a 20 min acima do pH 4

III.2.2.1. Procedimento de trabalho para o ensaio BRR

[00219] A configuração experimental está apresentada na Figura 2B.

1° Usando um béquer de 50 ml, coloca-se o bastante de água para injeção nele de modo a ter, depois da etapa n° 4 (aqui depois de) um volume líquido final de 10 ml.

2° Instalar o béquer em um banho de água.

3° A temperatura do banho de água é ajustada de modo a obter 37°C dentro do béquer.

4° A amostra do antiácido a ser medida é adicionada ao béquer.

5° Medição do valor do pH neste estágio representa o “pH inicial” (o $t = 0$ na tabela de dados).

6° Adicionar de uma vez, 4 ml de HCl 0,1N (0,40 mmol), e ao mesmo tempo ligar o relógio e ligar a bomba (adição contínua de 0,5 ml/min de HCl 0,1 N). Essas três ações devem todas ocorrer dentro dos 5 primeiros segundos do ponto de partida do relógio.

7° Registrar os valores do pH ao longo do tempo, até que o pH 4 seja obtido. Na opção do operador, a diminuição do pH pode ser deixada progredir até que o pH 3 (como no método original de Rossett-Roce) seja obtido, mas os valores da capacidade antiácida relevantes são registrados depois que o pH 4 é atingido.

8° Parar o relógio e a bomba.

III.2.2.2. Apresentação dos dados experimentais

[00220] Os dados experimentais são apresentados na Tabela por exemplo ver a Tabela 22, a partir da qual uma apresentação gráfica pode ser tirada: por exemplo ver Figura 2A.

III.2.2.3. Interpretação dos resultados

[00221] O rotavírus é destruído quando colocado no pH abaixo de 4. Por tanto de modo a preservar o vírus, o tempo acima do pH 4 é de consideração. O resultado da titulação de Baby Rossett-Rice é expressado em unidades de tempo (minutos). Ele é o tempo para o qual o valor do pH foi medido acima de 4, isto é, a assim chamada capacidade antiácida da formulação. Em alguns exemplos dois valores são registrados (por exemplo, 11 a 12 minutos como na Tabela 22 formulação n° 92 onde em 11 min o pH foi 4,08 e em 12 min o pH foi 3,98, indicando que a passagem no pH 4,00 foi

mais próxima a 12 min do que a 11 min.).

III.2.2.4. Calibração

[00222] A temperatura é medida com um termômetro calibrado (escala de -10°C - $+50^{\circ}\text{C}$). O medidor do pH é calibrado usando tampões padrão no pH 7 e pH 4 que são comercialmente disponíveis.

[00223] A taxa da bomba é ajustada por medições do volume contra o tempo de modo a obter 0,5 ml/min. A bomba peristáltica é um modelo de 8 cilindros da Ismatec S.UM. Model MS-Reglo. De modo a evitar formação de gotas a extremidade da tubulação é colocada ao longo da parede do béquer acima do nível do líquido.

[00224] Ácido clorídrico 0,1N é a solução de titulação padrão comercial.

[00225] Uma solução tampão padrão conhecida é usada para verificar a configuração experimental antes da análise de amostras antiácidas desconhecidas. Esta solução tampão padrão é fabricada de 24,066 g de dodecaidrato de trissódiofosfato (Merck produto n° 1.06578.1000) dissolvido em água o bastante para obter 1 litro de solução. Tipicamente, 10 ml desta solução fornecerá um pH de 9,0 ocorrendo entre minutos n° 6 e 7 (primeiro salto do pH de fosfato) e um pH de 4,0 ocorrendo entre minutos n° 19 e 20 (segundo salto do pH de fosfato) na assim descrita configuração de titulação de Baby Rossett-Rice. Resultados são mostrados na Tabela 42.

Tabela 42

		10 ml de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ em 24,066 g/litro	10 ml de água
	Tempo (min)		Nenhum antiácido
		pH	pH
	0	12,4	5,94
	1	11,7	1,31
	2	11,58	1,23
	3	11,44	1,18
	4	11,27	1,14
	5	11,02	1,11
primeiro salto do pH	6	10,6	1,10
	7	8,86	1,07
	8	7,95	1,05

	9	7,6	1,03
	10	7,38	1,01
	11	7,19	0,99
	12	7,03	0,98
	13	6,88	0,97
	14	6,74	0,96
	15	6,58	0,95
	16	6,41	0,95
	17	6,21	0,94
	18	5,93	0,93
segundo salto do pH	19	5,45	0,92
	20	3,47	0,91
	21	2,88	0,90
	22	2,62	0,89
	23	2,44	0,88
	24	2,3	0,87
	25	2,18	0,87
	26	2,09	0,86
	27	2,01	0,86
	28	1,93	0,86
	29	1,87	0,85
	30		

III.3 Medição do índice refrativo de uma formulação dada

[00226] Várias formulações ilustradas na presente invenção são preparadas em volume pequeno (volume de dose de 1,5 ml por exemplo, e abaixo), contêm uma concentração de sacarose alta (por exemplo, 55 %) e ainda deve sujeitar-se às necessidades de capacidade antiácida e estabilidade. Portanto pode ser importante verificar que a formulação foi preparada com êxito, e que a solubilização completa de cada constituinte foi obtida. Um modo simples para fazer isto é medir o índice refrativo da formulação. O índice refrativo é uma medição simples bem conhecida que pode ser usada tanto no estágio do tampão de carboxilato (antes da adição de rotavírus) quanto também na etapa de formulação final (depois da adição de rotavírus).

III.3.1. Método

[00227] O índice de refração das soluções aquosas é um método padrão para determinar a concentração de sacarose na solução. A Tabela de índice refrativo *versus* concentrações de sacarose pode ser encontrada no manual de Chemistry e Physics 70^a edição 1989-1990 CRC Press página E 386.

[00228] Usando um instrumento GPR 11-37 Index Instrument

Automatic Refractometer, uma gota de solução é colocada no instrumento e o índice refrativo é registrado. Água é usada como um padrão para verificar o instrumento (índice refrativo de 1,3330).

[00229] Várias formulações de adipato contendo várias quantidades de sacarose foram preparadas e submetidas à medição de índice refrativo. Uma medição repetida foi feita.

III.3.2. Resultados

[00230] Os resultados destas medições são mostrados nas Figuras 3A e 3B. Em conclusão, na janela de concentrações testadas, existe uma correlação linear entre as concentrações de açúcar e outros ingredientes solúveis e o índice refrativo medido.

[00231] Por exemplo, na formulação n° 95, depois da dissolução completa dos ingredientes no estágio do tampão de carboxilato (antes da adição do rotavírus) um valor do índice refrativo de 1,4578 (concentração de sacarose alvo sendo 58,5 % pp neste caso) será obtido; enquanto no estágio final da formulação (depois de adição de rotavírus ou adição de 6 % p/p de DMEM no caso de preparação de placebo) um índice refrativo de 1,4480 (concentração de sacarose alvo sendo 55 % p/p neste caso) será obtido. Em ambos os casos, os valores de índice refrativo medido são mais altos que aqueles obtidos para uma solução única de sacarose em água 58,5 % (índice refrativo de 1,4385) ou 55 % (índice refrativo de 1,4307), indicando a contribuição do índice refrativo de outros ingredientes da preparação do tampão.

III.3.3. Conclusão

[00232] Assim, a medição de índice refrativo pode ser usada para verificar rapidamente, durante um controle do processo, a dissolução completa de todos os ingredientes adicionados da formulação.

Exemplo IV - Formulação com tampão de citrato fosfato - exemplo comparativo

IV.1. Preparação das formulações (Tabelas 43 & 44)

Tabela 43

Nº	NaH2 PO4 2H2O (M)	Na2 HPO4. 2H2O (M)	Na3 Citrato. 2H2O (M)	Sacarose % p/p	DMEM % p/p	pH de BRR ^{\$} em t = 0 t = 0	Tempo de BRR ^{\$} em pH > 4 min	Título viral em t = 0	Título viral depois de 1w 37°C	Perda viral depois de 1 W 37°C
(Log ¹⁰ ffu por dose de vacina)										
volume de dose de administração de 2,5 ml - concentração de fosfato = 0,390 M										
1	0,195	0,195	0,135	50 %	3,33 %	6,66	9	5,9	5,4	0,5
2	0,195	0,195	0,135	50 %	5 %	6,65	10	5,8	5,4	0,4
3	0,195	0,195	0,135	50 %	8 %	6,67	9	5,6	5,3	0,3
4	0,195	0,195	0,135	45 %	3,33 %	6,67	10	5,8	5,3	0,5
5	0,195	0,195	0,135	40 %	3,33 %	6,69	11	5,8	5,5	0,3
6	0,195	0,195	0,135	30 %	3,33 %	6,71	10	5,7	5,5	0,2
7	0,195	0,195	0,135	20 %	3,33 %	6,75	11	5,6	4,1	1,5
8	0,195	0,195	0,135	45 %	8 %	6,69	12	5,7	5,4	0,3
9	0,195	0,195	0,135	40 %	8 %	6,70	12	6,1	5,6	0,5
10	0,195	0,195	0,135	30 %	8 %	6,72	11	6,1	5,4	0,5
11	0,195	0,195	0,135	20 %	8 %	6,73	11	6,1	4,4	1,7
volume de dose de administração de 2 ml - concentração de fosfato = 0,488 M**										
17	0,244	0,244	0,162	50 %	6 %	6,68	10	5,7	5,5	0,2
volume de administração de 1,5 ml - concentração de fosfato = 0,650 M**										
12	0,325	0,325	0,216	40 %	6 %	oo	oo	oo	oo	oo
13	0,325	0,325	0,216	40 %	8 %	oo	oo	oo	oo	oo
14	0,325	0,325	0,216	40 %	10 %	oo	oo	oo	oo	oo
15	0,325	0,325	0,216	45 %	6 %	oo	oo	oo	oo	oo
16	0,325	0,325	0,216	45 %	8 %	oo	oo	oo	oo	oo

^{\$}avaliado pelo teste de Baby Rossett Rice (BRR) como adaptado de acordo com Exemplo III.2.2;

** Isto é equivalente a 0,390 M em um volume de dose de 2,5 ml;

oo Formulações 12 a 16 foram descartadas porque a recristalização ocorreu no repouso a 4 a 8°C

Tabela 44 - quantidade de fosfato reduzida em um volume de dose de 1,5 ml

Nº	NaH2 PO4 2H2O (M)	NaH2 HPO4 2H2O (M)	Na3 Citrato, 2H2O (M)	Sacarose % p/p	DMEM % p/p	pH de BRR ^{\$} em t = 0 t = 0	Tempo de BRR ^{\$} em pH > 4 min	Título viral em t = 0	Título viral depois de 1w 37°C	Perda viral depois de 1 W 37°C
volume de dose de administração de 1,5 ml - quantidade de fosfato reduzida (0,450 M para as formulações 25 a 29)**										
25	0,225	0,225	0,285	40 %	6 %	6,69	12	6,2	5,8	0,4
26	0,225	0,225	0,285	40 %	8 %	Ocorre cristalização - nenhum dado disponível				
27	0,225	0,225	0,285	40 %	10 %	6,67	12	6,2	6,0	0,2
28	0,225	0,225	0,285	45 %	6 %	Ocorre cristalização - nenhum dado disponível				
29	0,225	0,225	0,285	45 %	8 %	6,69/ 6,72°	12/ 12 a 13°	6,1	6,1	0
volume de dose de administração de 1,5 ml - quantidade de fosfato reduzida (0,0085 M para as formulações 30 a 32, 38 a 40)***										
30	0,0042 4	0,0042 4	0,438	40 %	6 %	7,75	12-13	6,2	5,3	0,8
31*	0,0042 4	0,0042 4	0,438	45 %	6 %	7,9	13	6,1	5,8	0,3
32*	0,0042 4	0,0042 4	0,438	50 %	6 %	7,76	13-14	6,0	5,7	0,3
38	0,0042	0,0042	0,435	45 %	6 %	7,76	14	5,7	5,2	0,5
39	0,0042 4	0,0042 4	0,446	50 %	6 %	7,74	14	5,6	5,3	0,3
40	0,0043	0,0043	0,448	54 %	6 %	7,73	15	5,6	5,4	0,2
volume de dose de administração de 1,5 ml - nenhum fosfato adicionado										
18	-	-	0,438	40 %	6 %	8,42	12	5,7	4,5	1,2
19			0,437	40 %	8 %	8,42	11	5,7	4,3	1,4
20			0,437	40 %	10 %	8,31	11	5,7	4,4	1,3
21			0,437	45 %	6 %	8,35	11	5,9	4,7	1,2
22			0,437	45 %	8 %	8,35	10	5,8	4,9	0,9
23			0,437	45 %	10 %	8,37	12	5,7	4,7	1,0
24	-	-	0,438	50 %	6 %	8,31	11	5,7	4,9	0,8

° = repetição

^{\$}avaliado pelo teste de Baby Rossett Rice (BRR) como adaptado de acordo com Exemplo III.2.2;

* formulações 31 & 32 foram repetidas em um teste diferente desde o início com uma data similar (formulações 38 & 39 respectivamente, não mostradas).

** Isto é equivalente a 0,271 M em um volume de dose de 2,5 ml; isto é, fosfato reduzido

*** Isto é equivalente a 0,0051 M em um volume de dose de 2,5 ml; isto é, fosfato reduzido

[00233] Nota para os resultados das formulações 18 a 24, 26 a 30 na

Tabela 44

[00234] As formulações 18 a 24 e 30 foram descartadas do estudo da estabilidade a longo prazo por causa de resultados insatisfatórios obtidos durante o teste de estabilidade de 1 semana a 37°C. As formulações 26 e 28 foram descartadas porque a cristalização ocorreu em 4 a 8°C no repouso. As formulações 25, 27 e 29 foram descartadas por causa de um risco alto de recristalização durante 4 a 8°C no repouso.

IV.1.1. Formulações 1 a 11: formulações do volume de dose de 2,5 ml

[00235] As formulações 1 a 11 (ver a Tabela 43) foram fabricadas na escala de 325 g (250 ml) representando 100 doses de 2,5 ml (3,25 g) cada. Materiais antiácidos: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Mw 156); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Mw 178); $\text{Na}_3\text{Citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Mw 294).

[00236] A formulação líquida 1 foi preparada como segue. A 125,84 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325g) são consecutivamente adicionados: 7,605 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8,677 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 9,555 g de $\text{Na}_3\text{citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 162,5 g de sacarose. Depois da dissolução completa a solução é esterilizada por filtração em uma membrana de 0,2 μm . 10,82 g de meio DMEM contendo a quantidade necessária de rotavírus é adicionado sob condições estéreis para obter $10^{6,0}$ ffu por dose. A mistura é homogeneizada e distribuída no recipiente de dose apropriada. Neste caso uma dose consiste de 2,5 ml ou 3,25 g da preparação formulada final. Neste exemplo meio DMEM representa 3,33 % p/p.

[00237] As formulações 2 a 11 foram preparadas similarmente (ver ingredientes e proporções na Tabela 43) Nesta série quantidades diferentes de sacarose e DMEM foram testadas. Resultados similares foram obtidos com a exceção das formulações 7 e 11 preparadas com uma concentração de sacarose baixa (20 %), que não estabilizou adequadamente o rotavírus.

IV.1.2. Formulação 17: formulação do volume de dose de 2,0 ml

[00238] A formulação 17 (ver a Tabela 43) foi fabricada na escala de

325 g (250 ml) representando 125 doses de 2,0 ml (2,60 g) cada. Materiais antiácidos: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Mw 156); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Mw 178); $\text{Na}_3\text{Citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Mw 294). Brevemente, 110,7 g de água (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325g) são pesados e 9,51 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10,84 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 11,94 g de $\text{Na}_3\text{citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 162,5 g de sacarose (50 % p/p) são adicionados consecutivamente. Neste exemplo 19,5 g de DMEM são usados, que representa 6 % p/p.

IV.1.3. Formulações 12 a 16: formulações de volume de dose de 1,5 ml

[00239] Outras tentativas para reduzir o volume de dose de administração destas formulações de citrato/fosfato (para detalhes ver a Tabela 43) a um volume abaixo de 2 ml falharam.

[00240] As concentrações de ingredientes usados para formulação 17 (volume de dose de 2 ml) foram ajustadas ao volume de dose de 1,5 ml. A recristalização do componente de fosfato rapidamente ocorreu no armazenamento da formulação a 4°C. Este fenômeno é devido à solubilidade um tanto baixa de Na_2HPO_4 dentro do componente de fosfato citrato (ver a Tabela 45).

Tabela 45 - Limites de solubilidade teóricos para fosfato e citrato

	Solubilidade em água
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5,44 M (20°C)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,52 M (20°C)
$\text{Na}_3\text{Citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,44 M (25°C)

[00241] De acordo com estes parâmetros, tentativas para formular a formulação 17 em um volume de dose de 1,5 ml teoricamente resultariam em uma concentração de fosfato final de 0,65 M $((0,244 \text{ M} + 0,244 \text{ M}) * 2/1,5)$, que é mais alta do que os dados de solubilidade de Na_2HPO_4 (0,52 M).

[00242] Para evitar este problema de solubilidade baixa de fosfato, é sugerido não usar fosfato adicional, e ajustar para o pH procedendo-se no equilíbrio entre a forma do ácido carboxílico (R-COOH) e a forma do sal de carboxilato (R-COO⁻). Um exemplo disto é fornecido em formulações 100 a

115 fabricadas em um volume de administração de 2,5 ml (ver a Tabela 5) ou formulações 128 a 130 realizadas em um volume de administração de 1,5 ml (ver a Tabela 6).

IV.1.4. Formulações 25 a 32 e 38 a 40: formulações de volume de dose de 1,5 ml e quantidade diminuída de fosfato

[00243] Várias formulações (ver a Tabela 44 para detalhes) contendo uma quantidade reduzida de fosfato foram preparadas na escala de 325 g (250 ml) representando 166,6 doses de 1,5 ml (1,95 g) cada. De modo a compensar quanto a esta diminuição no fosfato embora mantendo uma capacidade antiácida aceitável, a concentração de citrato foi aumentada. Brevemente, a formulação 25 foi preparada misturando-se 8,76 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10,00 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 21,00 g de $\text{Na}_3\text{citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 130 g de sacarose (40 % p/p) são adicionados consecutivamente. Neste exemplo DMEM representa 6 % p/p. As formulações 26 a 29 foram fabricadas similarmente, esperou-se que as concentrações de sacarose e DMEM fossem levemente modificadas (ver a Tabela 44). A formulação 30 foi preparada misturando-se 0,1653 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1884 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 32,16 g de $\text{Na}_3\text{citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 130 g de sacarose (40 % p/p) são adicionados consecutivamente. Neste exemplo DMEM representa 6 % p/p. As formulações 31 e 32 foram fabricadas similarmente, esperou-se que as concentrações de sacarose e DMEM fossem levemente modificadas (ver a Tabela 44).

[00244] Apesar do fato de que, nas formulações 25 a 29, a concentração de fosfato total foi 0,45 M, isto é, abaixo do limite de solubilidade teórico de 0,52 M para Na_2HPO_4 , algumas das formulações (por exemplo formulações 26 e 28) exibiram recristalização durante o armazenamento de +4°C. Esta diferença prática entre o valor de solubilidade teórico e o único prático é provavelmente devido à presença de outros compostos dissolvidos no meio (sacarose, citrato ou outros importados por intermédio do meio DMEM), embora resultados incompatíveis fossem

obtidos para formulações similares (comparar por exemplo as formulações 26 e 27). A variabilidade experimentada com tais formulações não é compatível com a confiabilidade necessária quando da preparação de formulações em grande escala que têm que permanecer fisicamente estáveis durante um período mínimo de tempo.

[00245] Diminuindo ainda mais a quantidade de fosfato na fórmula (ver n° 30 a 32 e 38 a 40 na Tabela 44) fornece resultados insatisfatórios na estabilidade viral a 4 a 8°C (ver a Tabela 47).

[00246] Outras formulações de volume de dose de 1,5 ml (18 a 24) também foram fabricadas na ausência de fosfato adicionado (ver a Tabela 44 para detalhes). A capacidade antiácida para estas formulações foi mantida no valor alvo de 12 min usando tricitrato de sódio em uma concentração mais alta (438 mM). Brevemente, a formulação 18 foi preparada misturando-se água 143,34 g (quantidade determinada de modo a alcançar uma preparação final de 325 g), 32,16 g de Na₃citrato.2H₂O e 130 g de sacarose (40 % p/p) são adicionados consecutivamente. Para as formulações n° 19 a 23 várias quantidades de sacarose e DMEM foram testadas (ver a Tabela 44). Para a formulação 24, sacarose foi usada em uma concentração de 50 % p/p (162,5 g). Nestas formulações, DMEM representa 6 % p/p.

[00247] O pH destas formulações (n° 18 a 24) excedeu 8,3, no qual a estabilidade do rotavírus é afetada como evidenciado por uma perda viral mais alta do que 0,8 depois de uma semana de armazenamento a 37°C.

[00248] Fornecida a estabilidade insatisfatória destas formulações durante o teste rápido a 37°C, nenhum plano de estabilidade a médio prazo na temperatura ambiente ou a 4°C foi conduzido.

[00249] Estes resultados indicam que, quando menos e menos fosfato for incluído na formulação, com mais e mais citrato (para manter a capacidade antiácida), então, o pH resultante da formulação está aumentando mais e mais:

- pH em torno de 6,7 nas formulações 25 a 29
- pH em torno de 7,7 nas formulações 30 a 32 e 38 a 40, e
- pH em torno de 8,3 nas formulações sem fosfato n° 18 a 24

[00250] Como mostrado daqui por diante (Tabela 46 e 47) aqueles valores mais altos do pH não são em favor de uma boa estabilidade do rotavírus.

[00251] Adicionalmente, estes resultados são de acordo com os resultados obtidos para as formulações 110 a 115 (ver a Tabela 5) e 128 a 130 (ver a Tabela 6) onde o pH foi corrigido ajustando-se apenas a razão de ácido cítrico/citrato de sódio (assim sem fosfato adicional).

IV.2. Titulação viral de rotavírus e capacidade antiácida

[00252] A titulação viral de rotavírus em pontos no tempo diferentes foi avaliada de acordo com o procedimento fornecido no Exemplo III.1 e a capacidade antiácida da formulação foi avaliada seguindo o protocolo fornecido no Exemplo III.2. Os resultados são ilustrados nas Tabelas 46 e 47.

Tabela 46 - Estabilidade viral na temperatura ambiente

n°	Titulação viral depois do armazenamento na temperatura ambiente (20 a 22°C) (log ₁₀ ffu por dose de vacina)					
	1 mês	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses	6 meses
1	6,0	6,0	5,8	5,6		5,1
2	6,3	5,9	6,0	5,6		5,0
3	6,2	6,0	5,9	5,5		5,0
4	6,0	6,0	5,5	5,0		
5	6,0	5,7	5,3	4,5		
6	5,5	5,1	4,8			
7	oo	oo	oo	oo	oo	oo
8	6,0	5,6	5,5	4,9		
9	5,9	5,6	5,1			
10	5,6	5,1	4,6			
11	oo	oo	oo	oo	oo	oo
17	6,0	5,8	5,8	5,7		5,0
25	5,9	5,5	4,8			
27	5,8	5,1	4,7			
29	6,1	5,7	5,5	5,4		3,9
31	5,7	5,3	4,7			
32	5,9	5,5	5,0			
38	oo	oo	oo	oo	oo	oo
39		5,3	5,5	4,5		
40		5,5	5,2	4,8		4,6

Caixas em branco = não determinado

°° Formulações 7, 11 e 38 descartadas da estabilidade a longo prazo por causa de resultados insatisfatórios obtidos durante o teste de 1 semana a 37°C

Tabela 47 - Estabilidade viral a 4°C

n°	Titulação viral depois do armazenamento a 4°C (log ₁₀ ffu por dose de vacina)								
	T = 0	Depois de 1 w 37°C	1 m* 4°C	2 m* 4°C	4 m* 4°C	6 m* 4°C	7 m* 4°C	9 m* 4°C	12 m* 4°C
1	5,9	5,4	5,9	6,0	6,1	6,1		5,9	5,9
2	5,8	5,4	5,9	6	6	6		5,9	5,8
3	5,6	5,3	6	6	6,2	6		6	5,9
4	5,8	5,3	5,7	6,0	6,1		5,9	5,9	5,7
5	5,8	5,5	6,1	6,1	6,1		5,8	6,0	5,7
6	5,7	5,5	6,0	6,0	5,9		5,4	5,6	4,9
7	5,6	4,1							
8	5,7	5,4	5,9	6,0	5,9		5,8	5,9	5,6
9	6,1	5,6	6,1	6,1	5,8		5,7	5,6	5,5
10	6,1	5,4	6,0	5,5	5,5				
11	6,1	4,4							
17	5,7	5,5	5,7	5,9	6	5,8		5,9	5,9
25	6,2	5,8	5,9	5,9	NA*	NA*		NA*	NA*
27	6,2	6,0	6	5,8	NA*	NA*		NA*	
29	6,1	6,1	6,1	5,9	5,9	6,2			
31	6,1	5,8	5,7	5,7	5,6	5,6			
32	6,0	5,7	6	5,8	5,6	5,6			
38	5,7	5,2							
39	5,6	5,3		5,7	5,4				
40	5,6	5,4		5,7	5,3				

* NA = não disponível - falhou durante o teste de estabilidade na temperatura ambiente

Caixas em branco = não determinado

IV.3. Resultados e conclusões

[00253] Formulações 2 a 3 (volume de dose de 2,5 ml) e formulação 17 (volume de dose diminuiu de 2,5 ml para 2 ml):

[00254] Como mostrado nas Tabelas 46 e 47, uma perda de 1-log no título viral resultou de um armazenamento de 6 meses na temperatura ambiente para as formulações 2, 3 e 17. A 4°C, nenhuma perda significativa de título viral foi experimentada durante um período de armazenamento de até 12 meses.

[00255] Formulações 25, 27, 29 e 31 a 32 (volume de dose diminuiu

para 1,5 ml):

[00256] Na temperatura ambiente, uma perda de 1-log na titulação viral no geral foi alcançada em 3 meses ou mais cedo, exceto para a formulação 29 que passou o período de tempo de 4 meses. As formulações 25 a 27 recrystalizaram durante o período de armazenamento a 4°C, indicando assim que a diminuição na concentração de fosfato não é suficiente, como dito acima. Portanto tais formulações não são adequadas para períodos de armazenamento que seriam de pelo menos um ano a 4°C.

[00257] Quando da diminuição da concentração de fosfato ainda mais (formulações 30 a 32), o pH da formulação final aumenta devido à quantidade relativamente crescente de citrato, que é necessária para manter o mesmo valor da capacidade antiácida. Este aumento de pH afeta a estabilidade do rotavírus e pode ser detectado rapidamente durante o estudo de estabilidade na temperatura ambiente. Estas tendências são confirmadas quando retirando-se completamente o fosfato da formulação (formulações 18 e 24).

Conclusão global do Exemplo IV

[00258] Estes resultados indicam que, de modo a alcançar um volume de dose abaixo de 2 ml, comparado a um volume de dose de 2,5 ml, a quantidade de fosfato presente na formulação deve ser reduzida, devido à sua solubilidade em água um tanto baixa e sua propensão a recrystalizar. Como uma consequência, de modo a manter o mesmo valor alvo de capacidade antiácida (isto é, um mínimo de pelo menos 8 min, apropriadamente pelo menos 12 min como avaliado pelo teste de BRR), a quantidade de sal de citrato deve ser aumentada. Isto gera um aumento no pH final da formulação, que é prejudicial para a estabilidade do rotavírus na formulação líquida.

Exemplo V - Formulações adicionais

[00259] As formulações seguintes foram preparadas (Tabela 48), mas não foram incluídas no planejamento de estabilidade a longo prazo por falha para satisfazer pelo menos um dos critérios de ajuste. Razões específicas para

descartar algumas formulações são esboçadas na coluna comentários da Tabela 48.

Tabela 48

Nº	Breve descrição da formulação	Formulação de referência + Tabela	Comentários
7	2,5 ml; Citrato; fosfato; 20 % de sacarose	IV.1 tabela 43	perda > 1 log em 1 semana 37°C
11	2,5 ml; Citrato; fosfato; 20 % de sacarose	IV.1 tabela 43	perda > 1 log em 1 semana 37°C
12	1,5 ml; Citrato; fosfato; 40 % de sacarose	IV.1 tabela 43	Cristalizam no repouso a +4°C
13	1,5 ml; Citrato; fosfato; 40 % de sacarose	IV.1 tabela 43	Cristalizam no repouso a +4°C
14	1,5 ml; Citrato; fosfato; 40 % de sacarose	IV.1 tabela 43	Cristalizam no repouso a +4°C
15	1,5 ml; Citrato; fosfato; 45 % de sacarose	IV.1 tabela 43	Cristalizam no repouso a +4°C
16	1,5 ml; Citrato; fosfato; 45 % de sacarose	IV.1 tabela 43	Cristalizam no repouso a +4°C
18	1,5 ml; Citrato; 40 % de sacarose; pH 8,42	IV.1 tabela 44	perda > 1 log em 1 semana 37°C
19	1,5 ml; Citrato; 40 % de sacarose; pH 8,42	IV.1 tabela 44	perda > 1 log em 1 semana 37°C
20	1,5 ml; Citrato; 40 % de sacarose; pH 8,31	IV.1 tabela 44	perda > 1 log em 1 semana 37°C
21	1,5 ml; Citrato; 45 % de sacarose; pH 8,35	IV.1 tabela 44	perda > 1 log em 1 semana 37°C
22	1,5 ml; Citrato; 45 % de sacarose; pH 8,35	IV.1 tabela 44	perda > 1 log em 1 semana 37°C
23	1,5 ml; Citrato; 45 % de sacarose; pH 8,37	IV.1 tabela 44	perda > 1 log em 1 semana 37°C
24	1,5 ml; Citrato; 50 % de sacarose; pH 8,31	IV.1 tabela 44	perda > 1 log em 1 semana 37°C
25	1,5 ml; Citrato; fosfato; 40 % de sacarose	IV.1 tabela 44	Risco de cristalização a +4°C
26	1,5 ml; Citrato; fosfato; 40 % de sacarose	IV.1 tabela 44	Cristalizam no repouso a +4°C
27	1,5 ml; Citrato fosfato; 40 % de sacarose	IV.1 tabela 44	Risco de cristalização a +4°C
28	1,5 ml; Citrato fosfato; 45 % de sacarose	IV.1 tabela 44	Cristalizam no repouso a +4°C
29	1,5 ml; Citrato fosfato; 45 % de sacarose	IV.1 tabela 44	Risco de cristalização a +4°C
30	1,5 ml; Citrato fosfato 40 % de sacarose	IV.1 tabela 44	perda de 0,8 log em 1 semana 37°C
33	1,5 ml; Acetato + Cálcio	II.1 tabela 10	perda > 1 log em 1 semana 37°C
34	1,5 ml; Acetato + Cálcio	II.1 tabela 10	perda > 1 log em 1 semana 37°C
35	1,5 ml; Acetato + Cálcio	II.1 tabela 10	perda > 1 log em 1 semana 37°C
41	1,5 ml de Glutamato; 50 % de sacarose	II.7 tabela 36	pH muito alto: 10,36
44	1,75 ml; Fumarato; 44 % de sacarose	II.8	Materiais insolúveis
45	1,75 ml; Adipato; 44 % de sacarose	II.5 tabela 19	BRR muito longo: > 29 min.
47	1,75 ml; Lactobionato; 31 % de sacarose	II.9	BRR muito curto: < 1 min.
48	1,75 ml; Maleato; 44 % de sacarose	II.10	pH muito alto: 10,4, BRR muito longo: 24 min.
49	1,75 ml; Glicuronato; 42 % de sacarose	II.11	pH muito alto: 8,45; BRR muito curto: < 1 min.
50	1,75 ml; Glutarato; 44 % de sacarose	II.4 tabela 18	BRR muito longo: > 29 min.
51	1,75 ml; Succinato; 44 % de sacarose	II.3 tabela 16	BRR muito longo: > 29 min.
52	1,75 ml; Galacturonato; 42 % de sacarose	II.12	pH muito alto: 10,69, BRR muito curto: < 1 min.
53	1,75 ml; Galactarato; 38 % de sacarose	II.13	Materiais insolúveis
54	1,75 ml; Malonato; 44 % de sacarose	II.2 tabela 14	pH muito alto: 8,36
55	1,75 ml; Tartrarato; 44 % de sacarose	II.14	BRR muito curto: < 1 min.
57	1,75 ml; Maleato; 44 % de sacarose	II.10	perda > 1 log em 1 semana 37°C
68	1,5 ml; Glutamato; 7,5 % de sacarose	II.7 tabela 36	perda > 1 log em 1 semana 37°C
73	1,5 ml; Malato 0,597M; 50 % de sacarose	II.6 tabela 33	Filtração estéril muito difícil
75	1,5 ml; Malato; 56 % de sacarose	II.6 tabela 33	Dificuldades na solubilização de sacarose
103	1,5 ml; Adipato; 55 % de sacarose; pH 5,09	II.5.1 tabela 19	Ácido adípico cristaliza no repouso a +4°C

104	1,5 ml; Adipato; 55 % de sacarose; pH 5,12	II.5.1 tabela 19	Ácido adípico cristaliza no repouso a +4°C
107	1,5 ml; Adipato 0,466M; 55 % de sacarose	II.5.1 tabela 19	Ok mas dados de estabilidade similares já em andamento
108	1,5 ml; Adipato 0,63M; 53,15 % de sacarose; pH 5,38	II.5.1 tabela 19	Ácido adípico cristaliza no repouso a +4°C
109	1,5 ml; Adipato 0,63M; 55 % de sacarose; pH 5,38	II.5.1 tabela 19	Ácido adípico cristaliza no repouso a +4°C
117	1,5 ml; Adipato; 55 % de sacarose; Ca ⁺⁺	II.5.4 tabela 26	Precipitação do adipato de cálcio
121	1,5 ml; Adipato; 55 % de sacarose; Ca ⁺⁺	II.5.4 tabela 26	Precipitação do adipato de cálcio
135	1,5 ml, adipato; 55 % de sacarose	como n° 134	Placebo sem rotavírus
136	1,5 ml; Adipato; 55 % de sacarose	II.5.1 tabela 19	pH muito alto: 9,36
137	1,5 ml; Adipato; 55 % de sacarose	II.5.1 tabela 19	pH muito alto: 9,37
138	1,5 ml; Adipato; 55 % de sacarose	II.5.1 tabela 19	pH muito alto: 9,67
139	1,5 ml; Adipato; 55 % de sacarose	II.5.1 tabela 19	pH muito alto: 9,92
140	1,5 ml; Adipato; 55 % de sacarose	II.5.1 tabela 19	pH muito alto: 10,25
141	1,5 ml; Adipato; 55 % de sacarose; pH 6,47	II.5.1 tabela 19	Ok mas dados de estabilidade já em andamento
142	1,5 ml; Adipato; 55 % de sacarose; pH 6,30	II.5.1 tabela 19	Ok mas dados de estabilidade similares já em andamento
146	1,5 ml, adipato; 50 % de sacarose	como n° 93	Placebo sem rotavírus
149	1,5 ml, adipato; 55 % de sacarose	como n° 151	Placebo sem vírus

Exemplo VI - Imunogenicidade de Fase II, reatogenicidade e segurança de duas doses orais de uma vacina líquida contra Rotavírus monovalente humano em bebês saudáveis

VI.1. Introdução

[00260] Um teste de fase II controlado por placebo, duplamente cego, randomizado na fase II, foi conduzido para avaliar a imunogenicidade, reatogenicidade e segurança de uma vacina contendo uma cepa de rotavírus G1 P8 atenuado humano (depositado em ECAAC sob o número de depósito 99081301 - ver a WO 01/12797), para a imunização infantil. O estudo foi realizado em centros múltiplos na Finlândia. Uma visão geral do projeto de estudo é fornecida na Figura 4.

[00261] Durante este teste, uma primeira dose da vacina, a formulação líquida da vacina contra HRV candidato (rotavírus humano) (N = 100) ou a formulação liofilizada da vacina contra HRV (N = 100) e placebo respectivo (2 grupos com cada N = 25) foi administrada em torno de 2,5 meses de idade (entre 6 e 12 semanas de idade), no momento de uma primeira visita ao médico. Uma segunda dose foi administrada em torno de 3,5 meses de idade

(durante a segunda visita ao médico, tipicamente 4 semanas depois da primeira dose). Uma visita de acompanhamento foi realizada 1 mês depois da segunda dose, em torno de 4,5 meses de idade para uma sucção sanguínea e avaliação de imunogenicidade.

[00262] A experiência clínica foi randomizada, controlada por placebo e auto-contida. Um total de 250 pacientes, 100 por grupo de HRV e 25 por grupo de placebo, foram registrados. Ela foi conduzida em uma maneira duplamente cega entre cada formulação de vacina contra HRV e seu placebo respectivo. Entretanto, entre as 2 formulações diferentes o estudo cego não foi tecnicamente possível.

[00263] Vacinações na infância de rotina foram fornecidas de acordo com a prática local, mas pelo menos 14 dias além de cada dose da vacina contra HRV.

VI.2. Descrição da vacina

[00264] Especificamente a vacina usada compreende como o componente de rotavírus a cepa humana G1 atenuada depositada como ECACC depósito 99081301 (WO 01/12797).

[00265] A vacina é uma vacina candidata contra rotavírus humano atenuado (HRV) derivada da cepa 89-12 HRV que pertence ao sorotipo G1P1A e genótipo [P8] que foi isolado das fezes de uma criança de 15 meses de idade em Cincinnati, USA. A infecção natural com a cepa 89-12 mostrou fornecer proteção contra a doença subsequente e contra reinfecção em um estudo prospectivo de dois anos (Bernstein DI, *et al.* Protection from rotavirus reinfection: 2 years prospective study. J Infect Dis. 1991;164: 277-83).

[00266] O antiácido impedirá a inativação do HRV durante a passagem através do estômago.

[00267] A Tabela 49 compara as composições da formulação de adipato líquida e uma formulação liofilizada preparada de acordo com a WO 01/12797 e demonstrada ser eficaz em uma experiência clínica em grande

escala (De Vos *et al.* Pediatr Infect Dis J. 23 de Out de 2004 (10 Suppl): S179-82).

Tabela 49 Composição quantitativa da formulação de adipato líquida e da formulação liofilizada da vacina contra HRV (dose nominal)

	Formulação de adipato líquida	Formulação liofilizada (depois da reconstituição)
Substância ativa	cepa P43 - pelo menos $10^{6,0}$ CCID ₅₀ por dose no final da vida de prateleira (volume de dose de 1,5 ml)	cepa P43 - pelo menos $10^{6,0}$ CCID ₅₀ por dose no final da vida de prateleira (volume de dose de 1,0 ml)
Estabilizador	Sacarose 55 % p/p (1,073 g)	Sacarose 9 mg Dextrano 18 mg Sorbitol 13,5 mg Aminoácidos 9 mg
Antiácido	Adipato de Dissódio 132,74 mg	Carbonato de cálcio 60 mg
Agente espessante	-	Xantana 2,5 mg
Diluyente volumétrico	DMEM** 6 % p/p	DMEM** 2,25 mg
Solvente	Água para injeção q.s. ad 1,5 ml	Água para injeção q.s. ad 1 ml

** Meio de Eagle Modificado por Dulbecco

[00268] Um resumo do volume e capacidade antiácida das duas formulações da vacina contra HRV é apresentado na Tabela 50.

Tabela 50 Volume e capacidade antiácida da formulação de adipato líquida e da formulação liofilizada da vacina contra HRV

Formulação	Volume de enchimento por dose	Capacidade antiácida (BRR* em min)
Vacina contra HRV líquida de adipato	1,5 ml	12
Formulação liofilizada	1,3 ml	17

* BRR = teste de titulação de Baby Rossett-Rice (BRR): para medir a taxa de reação da substância antiácida com ácido clorídrico 0,1 N e a duração da manutenção a um pH acima de 4. Ver o procedimento no Exemplo III.2.2.

[00269] Monodoses da vacina contra HRV líquida de adipato formulada são enchidas de acordo com Good Manufacturing Practices (GMP), em seringas de vidro de monodose.

[00270] O título viral do rotavírus (isto é, potência do rotavírus) pode ser medido de acordo com o procedimento detalhado no Exemplo III.1, com células MA104 infectadas sendo identificadas por imunofluorescência

indireta. Alternativamente ele é medido por titulação *in vitro* do vírus em células MA104 com o vírus detectado por imunofluorescência direta usando anticorpos anti-rotavírus específicos. O método determina a dose que infecta 50 % da cultura celular e títulos de rotavírus são expressados em Dose Infeciosa de Cultura Celular mediana (CCID₅₀). A reprodutividade inter- e intra-ensaio foi avaliada e fornece resultados equivalentes (variabilidade é avaliada em 0,3 log).

VI.3. Administração

VI.3.1. Formulação liofilizada de vacina contra HRV ou placebo

[00271] Para preparar a vacina ou placebo para a administração, o conteúdo inteiro de uma seringa pré enchida contendo o tampão de carbonato de cálcio foi injetado no frasco do produto liofilizado (vacina ou placebo) e o produto recolocado em suspensão depois foi administrado suavemente como uma única dose oral.

VI.3.2. Formulação líquida de vacina contra HRV ou placebo

[00272] A seringa de vidro pré enchida foi agitada antes do uso. O produto (vacina ou placebo) depois foi administrado suavemente como uma única dose oral.

VI.4. Segurança e reatogenicidade

[00273] Os critérios seguintes de eventos adversos gerais aplicados:solicitados de segurança e reatogenicidade foram febre, irritabilidade/preocupação, diarreia, vômito, perda de apetite e tosse/muco nasal. Eles foram registrados durante 15 dias depois de cada dose de vacina do estudo, usando cartões diários fornecidos aos pais/tutores dos pacientes para registrar os sintomas observados. Todos os eventos de gastroenterite (diarreia) que ocorrem entre as visitas foram documentados, e as amostras de fezes foram coletadas (nos últimos 7 dias depois do início da gastroenterite). Eventos adversos não solicitados que ocorrem dentro de 31 dias depois de cada dose foram registrados. Eventos adversos sérios foram registrados

durante o período de estudo inteiro.

VI.5. Ensaio de Laboratório

VI.5.1. Análise das fezes

[00274] As amostras de fezes coletadas de todos os pacientes no dia de ou um dia antes de cada dose de vacina de estudo, no Dia 7 ± 1 e no Dia 15 ± 1 depois de cada dose, e no dia de ou um dia antes da Visita 3 estão sendo analisadas em GSK Biologicals ou um laboratório designado por GSK Biologicals para detectar a presença de RV na vacina usando Ensaio Imunossorvente Ligado à Enzima (ELISA - ver a seção VI.6.1) para avaliar a propagação viral.

[00275] A presença de antígeno de rotavírus demonstrado por ELISA em quaisquer fezes coletadas nos pontos no tempo predeterminados depois da Dose 1 até a Visita 3 é considerada como a propagação do vírus da vacina e tomada como evidência de uma resposta da vacina (isto é, recepção de vacina), se o paciente foi negativo para o rotavírus no dia da Dose 1 de vacina contra HRV ou placebo. Para pacientes com placebo o seqüenciamento é realizado neste caso.

[00276] Um paciente inicialmente negativo para o rotavírus é definido como um paciente que foi negativo para anticorpos IgA anti-rotavírus no soro e para antígeno de rotavírus em uma amostra de fezes em um ponto no tempo de pré vacinação, se ambos os resultados estiverem disponíveis, ou negativo para pelo menos um destes marcadores se apenas um resultado estiver disponível.

[00277] Também, amostras de fezes coletadas durante cada episódio de GE da Visita 1 até a Visita 3 estão sendo testadas em GSK Biologicals ou um laboratório designado por GSK Biologicals usando ELISA para detectar RV. Se positivo, o tipo G é determinado usando métodos com base em PCR. Estes métodos moleculares alvejam regiões dentro do gene VP7 que são muito distintas entre tipos G diferentes e são altamente conservadas dentro de cada

tipo G dado. Por exemplo, o método de RT-PCR desenvolvido por Gouvea *et al.* (1990, J Clin Microbiol., 28:276-282) usa um coquetel de iniciadores específicos de genótipo diferentes, localizados em regiões diferentes do gene VP7. O tamanho dos produtos de PCR resultantes estimado por eletroforese em gel fornece a informação para identificar os genótipos G correspondentes. Se qualquer RV G1 for detectado, o vírus da vacina é diferenciado do sorotipo do tipo selvagem por análise de sequência ou um método equivalente.

[00278] Qualquer detecção do vírus da vacina em quaisquer fezes coletadas até a Visita 3 é tomada como evidência de uma resposta da vacina (isto é, recepção de vacina).

VI.5.1. Análise do soro

[00279] O soro obtido de amostras de sangue total coletadas de pacientes em cada visita de estudo foi testado por ELISA em GSK Biologicals' o laboratório designado para medir concentrações de anticorpo IgA anti-rotavírus séricas. A interrupção do ensaio é 20 U/ml. Um paciente soronegativo para anticorpos IgA anti-rotavírus foi definido como um paciente que teve concentração de anticorpo abaixo do valor de interrupção do ensaio. Um paciente soropositivo para anticorpos IgA anti-rotavírus foi definido como um paciente que teve concentração de anticorpo maior do que ou igual ao valor de interrupção do ensaio.

VI.6. Imunogenicidade: Análise do soro

VI.6.1. Medição dos Anticorpos IgA por ELISA

[00280] Este ensaio permite a detecção de IgA de rotavírus no soro humano e foi inicialmente designado por R. Ward (1, 2) e foi adaptado por GSK Biologicals. Ele foi usado para medir a resposta imune depois da vacinação e/ou infecção. As amostras foram analisadas em GSK Biologicals, Rixensart, Belgium (ou laboratório designado).

Descrição do Ensaio ELISA

[00281] Placas de 96 reservatórios são revestidas por incubação

noturna com diluições do anticorpo anti-rotavírus. Os reservatórios são lavados e um lisato de células infectadas com cepa de vacina (reservatórios positivos) ou não infectado (reservatórios negativos) é adicionado. A seguir da incubação em uma plataforma giratória, as placas são lavadas e as diluições de amostras de soro ou soro padrão são incubadas em ambos os tipos de reservatórios (positivo e negativo). O uso de reservatórios negativos permite a avaliação de ligação de IgA não específica.

[00282] As placas são lavadas e IgA humana ligada é detectada por adição de IgA anti-humana de coelho (30 minutos sob agitação). Depois de lavar as placas, avidina-biotina conjugado em peroxidase em uma concentração ideal é adicionado a cada reservatório e incubada (30 minutos, RT sob agitação). As placas são novamente lavadas e ortofenilenodiamina (OPD) é adicionado. As placas depois são incubadas (30 minutos, temperatura ambiente (RT) no escuro) antes que a reação seja interrompida com H₂SO₄ 2N. A absorção óptica é medida a 490/620 nm. As densidades ópticas específicas são calculadas para cada amostra/padrão medindo-se a diferença entre os reservatórios positivos e negativos. As concentrações das amostras são determinadas usando-se a função logística de quatro parâmetros gerada pela curva padrão. A parte mais exata da curva padrão (faixa de trabalho) para o cálculo dos resultados é determinada. Concentrações de anticorpo em unidades por mililitro (U/ml) são calculadas em relação ao padrão (concentração = 1000 U/ml) ponderando-se os valores para cada desconhecido que cai dentro da faixa de trabalho da curva padrão e depois corrigidas para o fator de diluição. Cada experimento inclui controles negativos e positivos. Para todos os reagentes a concentração ideal é predeterminada.

Referências

1. Bernstein DI, Smith VE, Sherwood JR *et al.* Safety and immunogenicity of a live attenuated human rotavirus 89-12 vaccine. Vaccine.

1998; 16:381-7.

2. Bernstein DI, Sack DA, Rothstein E *et al.* Efficacy of live attenuated human rotavirus vaccine 89-12 em infants: a randomised placebo-controlled trial. Lancet. 1999; 354:287-90.

VI.7. Resultados: Resposta do anticorpo IgA anti-rotavírus

[00283] A Tabela 51 apresenta a GMC de anticorpo IgA anti-rotavírus e taxas de soroconversão (Grupo vacinado total para imunogenicidade). A Tabela 52 apresenta o GMC de anticorpo IgA anti-rotavírus calculada em pacientes soropositivos para anticorpos IgA anti-rotavírus calculados no grupo vacinado total.

[00284] A resposta do anticorpo à vacina contra HRV em termos de taxas de soroconversão foi similar em ambos os grupos de vacina um mês depois da segunda dose (82,2 % no grupo HRV_Lyo e 90,1 % no grupo HRV_Liq). No grupo de placebo misturado, 0 % de pacientes soroconverteram um mês depois de segunda dose, indicando que o estudo foi conduzido em um tempo quando não houve nenhuma infecção do tipo selvagem na comunidade.

Tabela 51 GMC de anticorpo IgA anti-rotavírus e taxas de soropositividade - Grupo vacinado total para imunogenicidade

			≥ 20 U/ML				GMC		
					95 % CI			95 % CI	
Grupo	Cronometragem	N	n	%	LL	UL	valor	LL	UL
HRV_LYO	PRE	98	0	0,0	0,0	3,7	< 20	-	-
	PI(M1)	96	68	70,8	60,7	79,7	191,3	122,7	298,2
	PII(M2)	90	74	82,2	72,7	89,5	330,4	217,5	502,0
HRV_LIQ	PRE	98	0	0,0	0,0	3,7	< 20	-	-
	PI(M1)	87	66	75,9	65,5	84,4	172,9	112,1	266,7
			≥ 20 U/ML				GMC		
					95 % CI			95 % CI	
Grupo	Cronometragem	N	n	%	LL	UL	valor	LL	UL
	PII(M2)	81	73	90,1	81,5	95,6	292,3	199,3	428,8
PL POOL	PRE	49	0	0,0	0,0	7,3	< 20	-	-
	PI(M1)	46	0	0,0	0,0	7,7	< 20	-	-
	PII(M2)	48	0	0,0	0,0	7,4	< 20	-	-

1. N = número de pacientes com resultados disponíveis

2. n/% = número/porcentagem de pacientes com concentração acima da interrupção

3. 95 % de CI = intervalo de confiança de 95 %; LL = Limite inferior, UL = Limite superior

4. PRE = pré vacinação

5. PI(M1) = um mês depois da primeira dose de vacina contra HRV ou placebo (visita 2)

6. PII(M2) = um mês depois da segunda dose de vacina contra HRV ou placebo (visita 3)

7. Liberação da base de dados = 07DEC2005

Tabela 52 GMC de anticorpo IgA anti-rotavírus calculada em pacientes soropositivos para anticorpos IgA anti-rotavírus - Grupo vacinado total para imunogenicidade

			GMC		
				95 % CI	
Grupo	Cronometragem	N	Valor	LL	UL
HRV_LYO	PI(M1)	68	644,7	471,4	881,8
	PII(M2)	74	703,8	525,0	943,6
HRV_LIQ	PI(M1)	66	428,1	302,1	606,8
	PII(M2)	73	423,1	305,9	585,2

1. N = número de pacientes que foram soropositivos para anticorpos IgA anti-rotavírus

2. 95 % CI = intervalo de confiança de 95 %; LL = Limite inferior, UL = Limite superior

3. PI(M1) = um mês depois da primeira dose de vacina contra HRV ou placebo (visita 2)

4. PII(M2) = um mês depois da segunda dose de vacina contra HRV ou placebo (visita 3)

5. Liberação da base de dados = 07DEC2005

VI.8. Conclusões

[00285] A imunogenicidade em termos de taxas de soroconversão foi similar entre as duas formulações de vacina.

[00286] A formulação líquida da vacina foi muito imunogênica quando

administrada a crianças de acordo com o programa de 0, 1 meses.

[00287] Visto que IgA é um bom marcados para a eficácia de uma vacina contra rotavírus, estes dados sustentam o efeito protetivo da formulação testada nas clínicas.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogênica de rotavírus líquida adequada para a administração oral a um bebê humano, caracterizada pelo fato de que compreende um antígeno de rotavírus, um açúcar e um carboxilato em que a dita formulação tem um pH entre cerca do pH 5,0 e cerca do pH 8,0 e compreende menos do que 1 mM de fosfato, em que dito carboxilato é derivado de um ácido dicarboxílico com um $pK_a > 4$.

2. Composição líquida de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a dita composição compreende menos do que 0,1 mM de fosfato.

3. Composição líquida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 2, caracterizada pelo fato de que a dita composição é isenta de fosfato.

4. Composição líquida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o pH da dita composição está entre cerca do pH 5,5 a cerca do pH 7,5.

5. Composição líquida de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o pH da dita composição está entre cerca do pH 6,0 e cerca do pH 7,0.

6. Composição líquida de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que o dito carboxilato é selecionado do grupo que consiste de: adipato, malato, succinato, malonato, glutarato, maleato, fumarato, tartarato e quaisquer combinações de dois ou mais dos mesmos.

7. Composição líquida de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o dito carboxilato é adipato.

8. Composição líquida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizada pelo fato de que o dito carboxilato está presente em uma concentração entre cerca de 50 mM e entre cerca de 2 M.

9. Composição líquida de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o dito carboxilato está presente em uma concentração entre cerca de 100 mM e entre cerca de 1 M.

10. Composição líquida de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o dito carboxilato está presente em uma concentração entre cerca de 400 mM e entre cerca de 700 mM.

11. Composição líquida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, caracterizada pelo fato de que o dito açúcar é selecionado da lista que consiste de: glicerol, eritrose, eritriol, xilitol, arabitól, ribose, xilose, arabinose, glicose, tagalose, manose, galactose, frutose, inositol, sorbitol, manitol, galactitol, uma combinação de glicose e frutose, maltose, soforose, lactose, celobiose, melibiose, trealose, sacarose, palatinose, maltulose, lactulose, maltitol, lactitol, rafinose, maltotriose, melezitose, celotriose, ciritol, maltotetraose, estaquiose, celotetraose, maltopentaose, celopentaose, maltoexaose, celoexaose, oligossacarídeos.

12. Composição líquida de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que o dito açúcar é sacarose ou dextrose.

13. Composição líquida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, caracterizada pelo fato de que a concentração do dito açúcar está entre cerca de 1 % p/p e entre cerca de 70 % p/p.

14. Composição líquida de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a concentração do dito açúcar está entre cerca de 25 p/p e entre cerca de 60 % p/p.

15. Composição líquida de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que a concentração do dito açúcar é de 50 % p/p ou 55 % p/p.

16. Composição líquida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 15, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente um ácido carboxílico.

17. Composição líquida de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que o dito ácido carboxílico é selecionado da lista que consiste de: ácido adípico, ácido cítrico, ácido málico, ácido acético, ácido succínico, ácido carbônico, ácido propiônico, ácido butírico, ácido malônico, ácido glutárico, ácido maléico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido glucônico, ácido fumárico, ácido tartárico.

18. Composição líquida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 17, caracterizada pelo fato de que compreende ainda íons cálcio.

19. Composição líquida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 18, caracterizada pelo fato de que o dito antígeno de rotavírus é um rotavírus vivo, tal como um rotavírus atenuado vivo.

20. Composição líquida de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que o dito rotavírus atenuado vivo é um rotavírus atenuado vivo humano.

21. Composição líquida de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que o dito rotavírus atenuado vivo humano é selecionado do grupo que consiste de: cepa HRV 89-12C2 depositada sob número de acesso ATCC VR 2272, progenia, recontaminantes e derivados imunologicamente ativos destes; cepa HRV P43 depositada sob número de acesso ECACC 99081301, progenia, recontaminantes e derivados imunologicamente ativos destes.

22. Composição líquida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 21, caracterizada pelo fato de que a dita composição tem uma capacidade antiácida de pelo menos 8 minutos como avaliado pelo ensaio de Baby Rosett-Rice.

23. Composição líquida de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que a dita composição tem uma capacidade antiácida de pelo menos 12 minutos como avaliado pelo ensaio de Baby

Rosett-Rice.

24. Composição líquida de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que a dita composição tem uma capacidade antiácida entre 8 e 23 minutos como avaliado pelo ensaio de Baby Rosett-Rice.

25. Composição líquida de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que a dita composição tem uma capacidade antiácida entre 12 e 23 minutos como avaliado pelo ensaio de Baby Rosett-Rice.

26. Composição líquida de acordo com a reivindicação 23 ou reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que a dita composição tem uma capacidade antiácida entre 12 e 20 minutos como avaliado pelo ensaio de Baby Rosett-Rice.

27. Composição líquida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 26, caracterizada pelo fato de que a dita composição é estável sob pelo menos uma das condições seguintes: durante 7 dias a 37°C, durante um ano a 4°C, durante dois anos a 4°C.

28. Composição líquida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 27, caracterizada pelo fato de que é uma vacina.

29. Composição líquida de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 28, caracterizada pelo fato de que a dita composição é fornecida em um volume de dose entre 0,2 ml e 2,0 ml.

30. Composição líquida de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que a dita composição é fornecida em um volume de dose entre 0,5 ml e 1,5 ml.

31. Composição líquida de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de que a dita composição é fornecida em um volume de dose de cerca de 1,5 ml.

32. Composição líquida de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 31, caracterizada pelo fato de ser para uso em medicina.

33. Uso de um antígeno de rotavírus, um açúcar e um carboxilato, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de uma composição imunogênica para o tratamento ou prevenção de doenças associadas ao rotavírus, em que dita composição imunogênica é definida em qualquer das reivindicações 1 a 31.

34. Uso de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que é para a prevenção de infecção por rotavírus em seres humanos.

35. Uso de acordo com a reivindicação 33 ou 34, caracterizado pelo fato de que é para a prevenção de gastroenterite por rotavírus em seres humanos.

36. Uso de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que é para a prevenção de gastroenterite severa por rotavírus em seres humanos.

37. Uso de acordo com a reivindicação 35 ou 36, caracterizado pelo fato de que a dita gastroenterite ou gastroenterite severa é causada por uma cepa de rotavírus de um sorotipo diferente àquele da cepa de rotavírus contido na dita formulação líquida.

38. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 37, caracterizado pelo fato de que a dita composição é fornecida em um volume de dose entre 0,2 ml e 2,0 ml.

39. Uso de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a dita composição é fornecida em um volume de dose entre 0,5 ml e 1,5 ml.

40. Uso de acordo com a reivindicação 38 ou reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que a dita composição é fornecida em um volume de dose de cerca de 1,5 ml.

41. Método para a preparação de uma composição de rotavírus líquida como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 31,

caracterizado pelo fato de que compreende misturar um antígeno de rotavírus, um açúcar e um carboxilato com um diluente farmacêuticamente aceitável.

FIG. 1 - curvas de titulação ácido base padrão de quatro carboxilatos

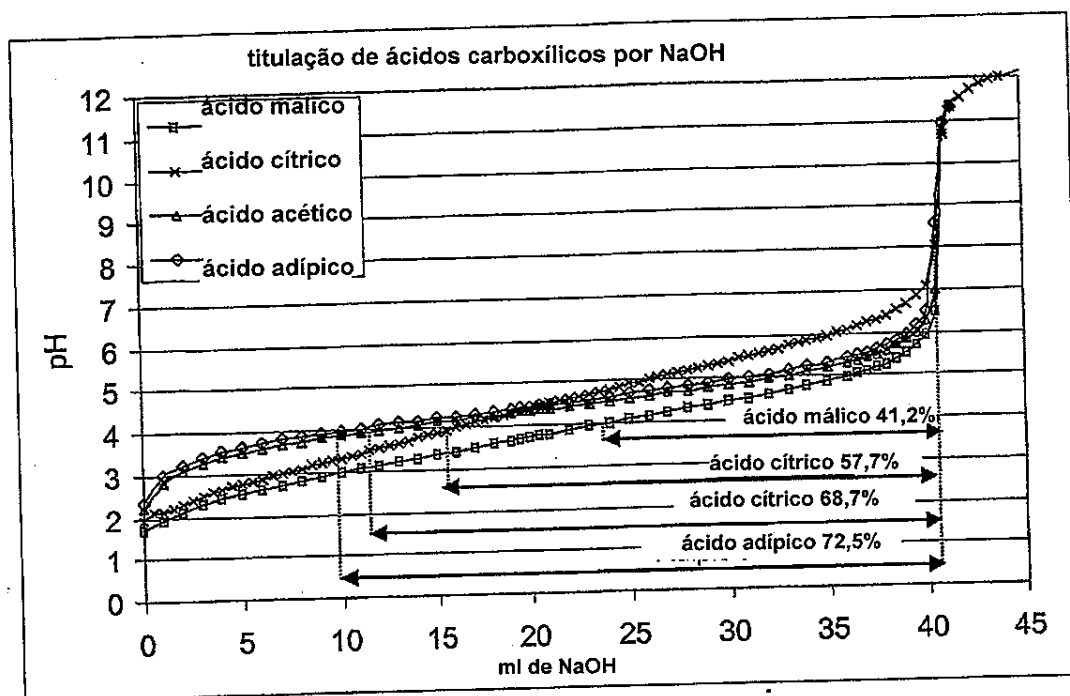


FIG. 2A - capacidade antiácida de várias formulações de adipato

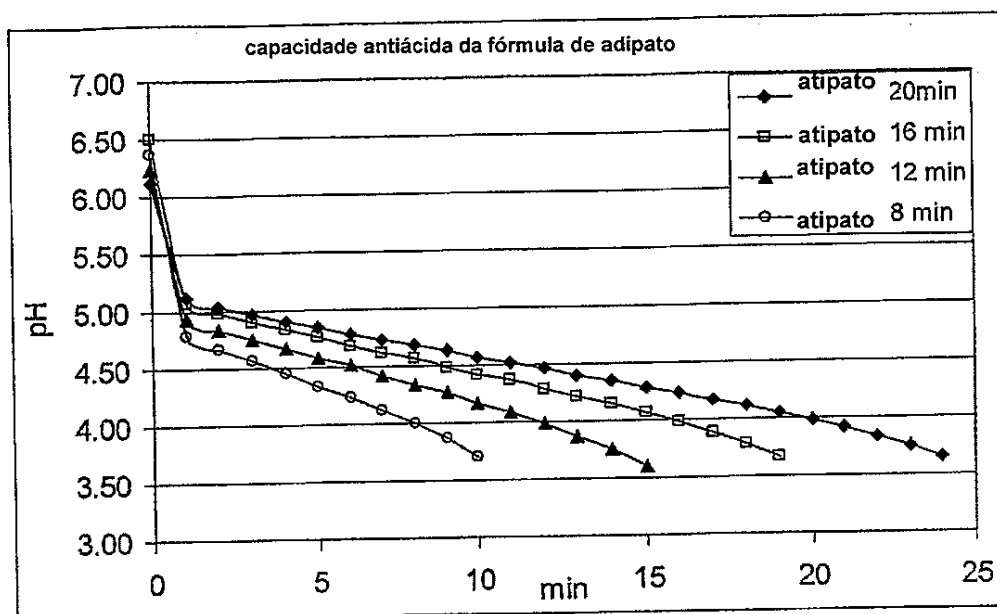


FIG. 2B - configuração experimental do teste de Baby Rossett-Rice

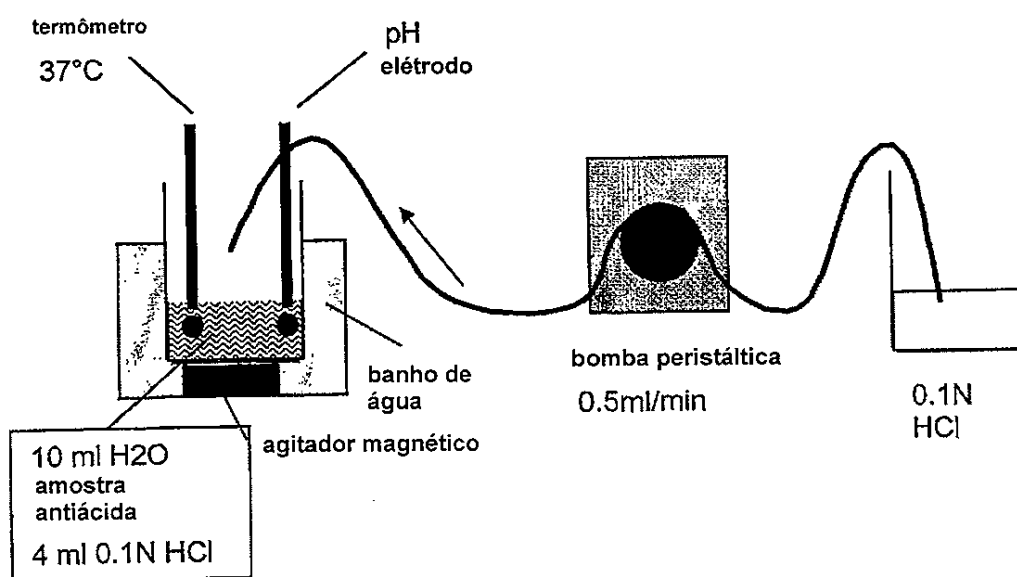


FIG. 3A - índice refrativo das formulações contendo adipato

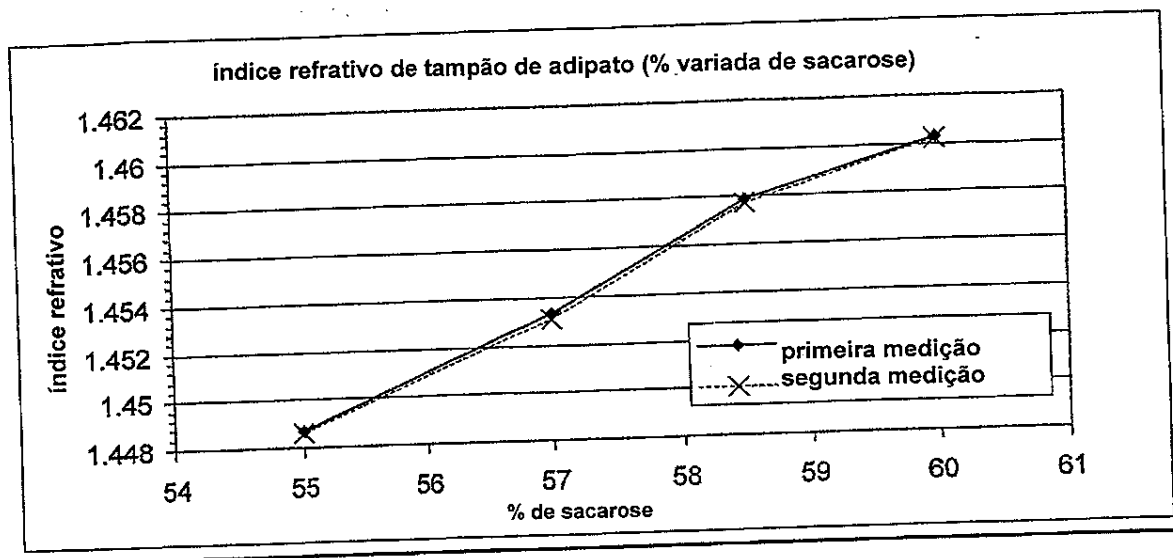


FIG. 3B - índice refrativo das formulações contendo adipato (placebo de rotavírus)

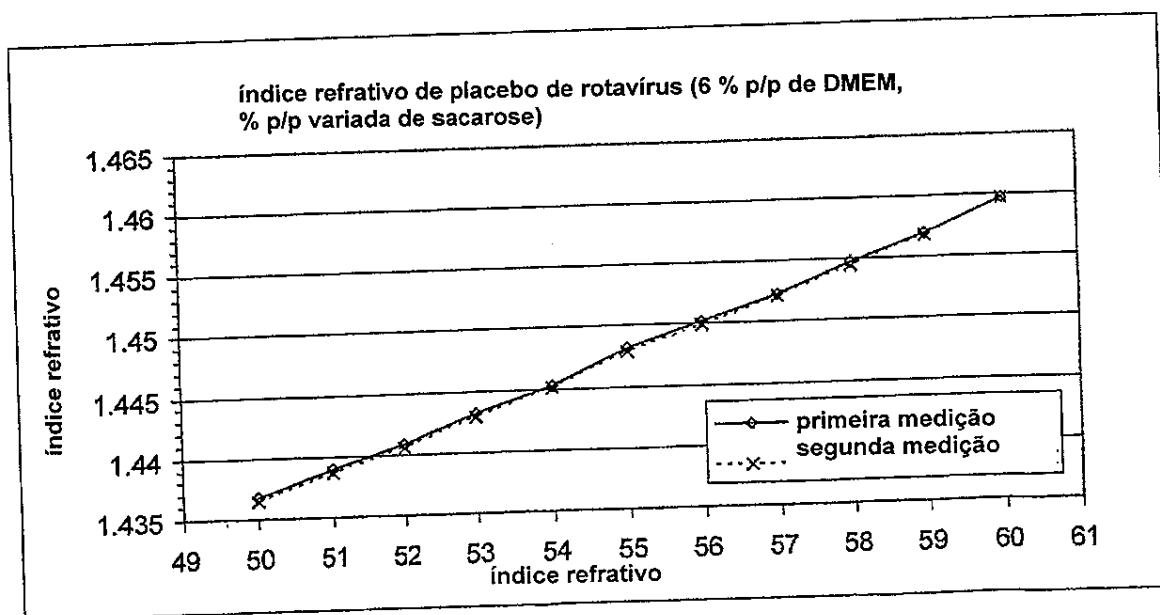
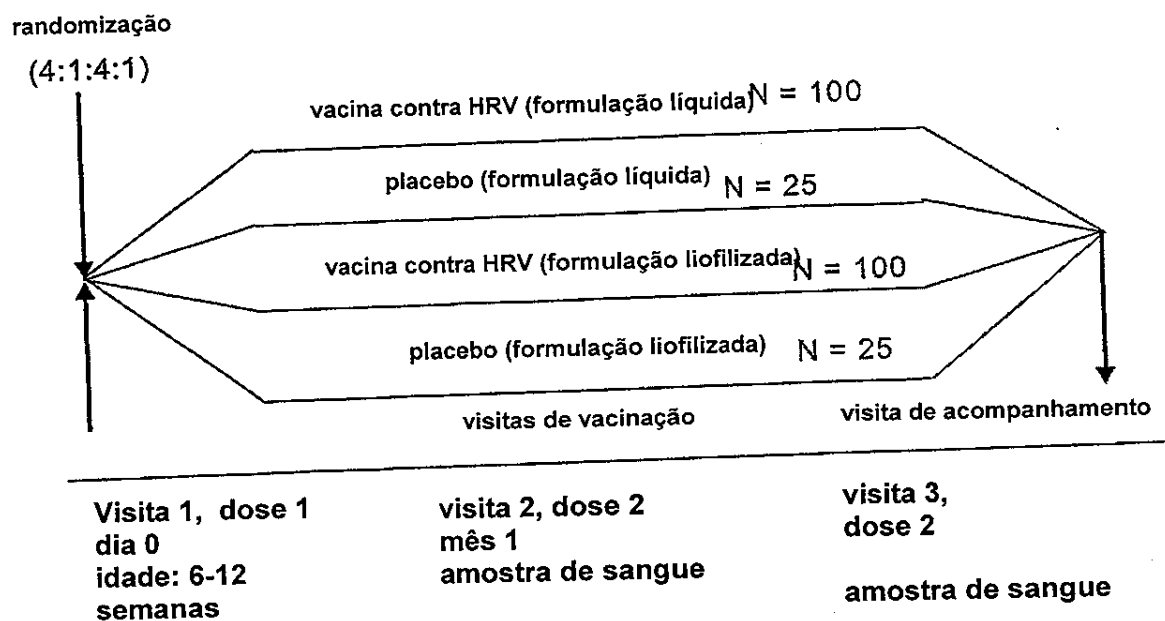


FIG. 4 - visão geral do projeto de estudo



N = número de pacientes planejados para serem registrados