

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2000.08.15	(73) Titular(es): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA RUE DE L'INSTITUT 89 1330 RIXENSART BE
(30) Prioridade(s): 1999.08.17 GB 9919468	
(43) Data de publicação do pedido: 2006.07.05	(72) Inventor(es): ISABELLE KNOTT BE ANNICK POLISZCZAK BE GEORGES THIRY BE VINCENT VANDE VELDE* BE BRIGITTE DESIREE A. COLAU BE
(45) Data e BPI da concessão: 2010.01.06 066/2010	(74) Mandatário: ELSA MARIA MARTINS BARREIROS AMARAL CANHÃO RUA DO PATROCÍNIO 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MÉTODOS PARA SEPARAR VARIANTES DO ROTAVÍRUS E VACINA DE ROTAVÍRUS VIVO ATENUADO**

(57) Resumo:

RESUMO

"MÉTODOS PARA SEPARAR VARIANTES DO ROTAVÍRUS E VACINA DE ROTAVÍRUS VIVO ATENUADO"

A invenção proporciona uma população de rotavírus atenuado compreendendo uma única variante ou substancialmente uma única variante que é definida por uma sequência nucleotídica codificando, pelo menos, uma das principais proteínas virais designadas como VP4 e VP7. A invenção proporciona, particularmente, uma população de rotavírus designada como P43. A invenção proporciona ainda uma nova formulação para uma vacina de rotavírus que está na forma de um comprimido de dissolução rápida, para dissolução imediata quando colocado na língua.

DESCRIÇÃO

"MÉTODOS PARA SEPARAR VARIANTES DO ROTAVÍRUS E VACINA DE ROTAVÍRUS VIVO ATENUADO"

Esta invenção refere-se a novas formulações de vacina, métodos para as preparar e sua utilização em terapia. Em particular, a presente invenção refere-se a novas formulações de vacinas de rotavírus.

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

Os rotavírus têm sido reconhecidos como uma das causas mais importantes da diarreia grave 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). Estima-se que a doença por rotavírus seja responsável por mais de um milhão de mortes anualmente. A doença induzida por rotavírus afecta, mais normalmente, crianças entre os 6 e os 24 meses de idade e o pico de prevalência da doença ocorre, geralmente, durante os meses mais frescos em climas temperados e ao longo do ano em áreas tropicais. Os rotavírus são, tipicamente, transmitidos de pessoa para pessoa pela via fecal-oral com um período de incubação de cerca de 1 a cerca de

3 dias. Ao contrário da infecção na faixa etária dos 6 meses aos 24 meses, os recém nascidos são, geralmente, assintomáticos ou têm apenas uma doença moderada. Em contraste com a doença grave normalmente encontrada em crianças jovens, a maioria dos adultos estão protegidos como resultado de infecção prévia por rotavírus, por esse motivo, a maioria das infecções em adultos são moderadas ou assintomáticas (Offit, P.A. *et al.* Comp. Ther. 8 (8): 21-26, 1982).

Os rotavírus são geralmente esféricos e os seus nomes derivam da estrutura distintiva da sua cápside interna e externa ou em dupla camada. Tipicamente, a estrutura da cápside de um rotavírus em dupla camada envolve uma camada ou núcleo proteico interno que contém o genoma. O genoma de um rotavírus é constituído por 11 segmentos de ARN de cadeia dupla que codifica, pelo menos, 11 proteínas virais distintas. Duas dessas proteínas virais, designadas por VP4 e VP7, estão organizadas no exterior da estrutura em dupla camada da cápside. A cápside interna do rotavírus apresenta uma proteína, que é a proteína do rotavírus designada por VP6. A importância relativa destas três proteínas rotavirais específicas em induzir a resposta imunitária que se segue a uma infecção por rotavírus, não é ainda evidente. Contudo, a proteína VP6 determina o grupo e o subgrupo do antigénio e as proteínas VP4 e VP7 são determinantes da especificidade do serotipo.

A proteína VP7 é uma glicoproteína com 38000 PM (34000 PM quando não glicosilada) que é o produto de tradução do segmento genómico 7, 8 ou 9, dependendo da estirpe. Esta proteína estimula a formação do anticorpo de neutralização principal, após a infecção por rotavírus. A proteína VP4 é uma proteína não glicosilada com, aproximadamente, 88000 PM que é o produto de

tradução do segmento genómico 4. Esta proteína estimula também o anticorpo de neutralização após a infecção por rotavírus.

Uma vez que as proteínas VP4 e VP7 são as proteínas virais contra as quais são dirigidos os anticorpos de neutralização, acredita-se que sejam as principais candidatas para o desenvolvimento de vacinas de rotavírus, proporcionando protecção contra doença por rotavírus.

A infecção natural por rotavírus durante a infância é conhecida por promover imunidade protectora.

Uma vacina de rotavírus vivo atenuado é, assim, altamente desejável. De um modo preferido, deverá ser uma vacina oral, uma vez que esta é a via natural de infecção do vírus.

Os primeiros desenvolvimentos na vacina para prevenir infecções por rotavírus começaram nos anos 70 após a descoberta do vírus. Inicialmente, foram estudadas estirpes atenuadas de animais e humanos e apresentavam resultados mistos ou desapontantes. Mais recentemente, foram centrados esforços em reassociações humano-animal que tiveram mais sucesso.

Uma estirpe de rotavírus conhecida como 89-12 foi descrita por Ward; ver Patente US Número 5474773 e Bernstein, D.L. et al., *Vaccine*, 16 (4), 381-387, 1998. A estirpe 89-12 foi isolada de um espécime recolhido de fezes de uma criança de 14 meses com doença provocada por rotavírus natural em 1988. De acordo com a Patente US Número 5474773 o rotavírus humano HRV 89-12 foi, depois, adaptado para cultura por 2 passagens em células primárias de Rim de Macaco Verde Africano (AGMK) e 4 passagens em células MA-104, como descrito por Ward em *J. Clin. Microbiol.*

19, 748-753, 1984. Foi, depois, purificado 3 vezes, em placas, em células MA-104 (até à passagem 9) e crescido após 2 passagens adicionais nestas células. Foi efectuada uma passagem adicional (passagem 12) para depósito na ATCC sob o número de acesso ATCC VR 2272. A estirpe depositada é conhecida como 89-12C2.

A publicação de 1998 em Vaccine por Bernstein *et al.*, é referida abaixo como a publicação Vaccine (1998). A publicação descreve a segurança e imunogenicidade de um candidato a vacina de rotavírus humano vivo administrado oralmente. Esta vacina foi obtida da estirpe 89-12, atenuada por passagem, sem purificação em placa, 26 vezes em células primárias de AGMK e, depois, mais 7 vezes numa linha celular de AGMK estabelecida (33 passagens no total).

Daqui para a frente, o material mencionado anteriormente, que foi passado 26 vezes em série, será referido como P26 e o material que foi passado 33 vezes em série, será referido como P33. Em geral, o rotavírus derivado por passagens de 89-12 n vezes irá ser referido como Pn.

Nos exemplos que se seguem, o material P33 foi passado mais 5 vezes por células Vero. Este é referido como P38.

Os isolados P26 e P33 descritos na publicação Vaccine (1998), não foram depositados numa colecção de culturas, nem foram analisados para estabelecer a sua caracterização genética.

Verificou-se agora que a população P26, descrita na literatura, compreende uma mistura de variantes. Isto foi

determinado pela caracterização genética como aqui descrito abaixo (ver exemplos). A P26 não é, por isso, uma população consistente de confiança para passagens posteriores, em particular para produção de lotes de vacinas. De um modo semelhante, a P33 compreende uma mistura de variantes e não tem uma consistência de confiança para a produção de lotes de vacinas.

Verificou-se que o material P26 é uma mistura de, pelo menos, três variantes do gene VP4. A P33 e P38 são, de um modo semelhante, uma mistura de duas variantes. Estas variantes parecem ser antigenicamente diferentes, em termos de epitopos de neutralização da estirpe 89-12C2 depositada no ATCC, quando se avaliam os títulos de anticorpo de neutralização do soro de crianças vacinadas com P33 contra estas variantes. Isto é ilustrado na Figura 3.

Além disso, verificou-se que quando o material P33 é administrado a crianças, duas variantes identificadas são replicadas e excretadas. Das 100 crianças vacinadas, apenas 2 apresentaram sinais de gastroenterite devido a infecção por rotavírus, enquanto 20% de um grupo placebo foram infectadas. Estas verificações sugerem que as variantes identificadas estão associadas com a protecção da doença por rotavírus.

A presente invenção proporciona um método de separar variantes de rotavírus e uma vacina de rotavírus vivo atenuado melhorada, derivada de uma estirpe de rotavírus humano (homogénea) clonada.

Consequentemente, de acordo com um primeiro aspecto, a presente invenção proporciona uma população de rotavírus

atenuado (isolado), caracterizada por compreender uma única variante ou substancialmente uma única variante, sendo a referida variante definida pela sequência de nucleótidos codificando, pelo menos, uma das principais proteínas virais, designadas como VP4 e VP7.

De um modo preferido, a população de rotavírus de acordo com a invenção é uma variante clonada.

Por uma população compreendendo uma única variante ou substancialmente uma única variante, entende-se uma população de rotavírus que não contém mais de 10% e, de um modo preferido, menos do que 5% e, de um modo muito preferido, menos do que 1% de uma variante ou variantes diferentes. As populações de vírus podem ser purificadas até à homogeneidade ou homogeneidade substancial por passagem em tipos de células adequados ou efectuando uma série de um ou mais passos de clonagem.

Uma vantagem da invenção é que uma população compreendendo uma única variante é mais adequada para a formulação de um lote consistente de vacinas. As variantes em particular, definidas por sequências nucleotídicas que codificam a principal proteína viral, podem também estar associadas com eficácia melhorada na prevenção da infecção por rotavírus.

Num aspecto preferido, a única variante ou substancialmente única na população de rotavírus da invenção é uma variante na qual o gene VP4 compreende uma sequência nucleotídica compreendendo, pelo menos, um dos seguintes: uma base adenina (A) na posição 788, uma base adenina (A) na posição 802 e uma base timina (T) na posição 501 a partir do codão iniciador.

Num outro aspecto, a única variante ou substancialmente única na população da invenção é uma variante na qual o gene VP7 compreende uma sequência nucleotídica compreendendo, pelo menos, um dos seguintes: uma timina (T) na posição 605, uma adenina (A) na posição 897 ou uma guanina (G) na posição 897 a partir do codão iniciador. De um modo preferido, na posição 897 existe uma adenina (A).

Num aspecto preferido, a única variante na população de acordo com a invenção tem uma adenina (A) nas posições 788 e 802 e uma timina (T) na posição 501 a partir do codão iniciador na sequência do gene VP4.

Noutro aspecto preferido, a única variante na população de acordo com a invenção tem uma timina (T) na posição 605 e uma adenina/guanina (A/G) na posição 897 a partir do codão iniciador na sequência de VP7. De um modo muito preferido, na sequência de VP7 existe uma adenina (A) na posição 897.

Num aspecto particularmente preferido, a única variante na população de acordo com a invenção, tem uma adenina (A) nas posições 788 e 802 e uma timina (T) na posição 501 a partir do codão iniciador na sequência do gene VP4 e uma timina (T) na posição 605 e uma adenina/guanina (A/G) na posição 897 a partir do codão iniciador na sequência do VP7. De um modo muito preferido, na sequência do VP7 existe uma adenina (A) na posição 897.

Noutro aspecto, a única variante compreende uma sequência nucleotídica codificando uma proteína VP4, em que a sequência nucleotídica é como mostrado na Figura 1 e/ou uma sequência

nucleotídica codificando uma proteína VP7, em que a sequência nucleotídica é como mostrado na Figura 2.

A presente invenção proporciona também um método de produção de uma população de rotavírus compreendendo substancialmente uma única variante, compreendendo o método:

passar uma preparação de rotavírus num tipo celular adequado;

seleccionar opcionalmente a cultura homogénea utilizando os passos tanto de:

a) diluição limite; ou

b) isolamento individual em placa; e

verificação da presença de substancialmente uma única variante, efectuando uma determinação da sequência de uma região apropriada da sequência do gene VP4 e/ou VP7.

A determinação da sequência pode ser, adequadamente, efectuada através de uma técnica de hibridação quantitativa ou semi-quantitativa, tal como hibridação *slot blot* ou hibridação em placa.

De um modo preferido, a variante seleccionada é uma variante que é replicada e excretada quando a preparação de rotavírus de partida é administrada a um indivíduo humano, em particular uma criança.

A população de vírus clonado que resulta do método de acordo com a invenção, pode ser amplificada por posterior passagem numa linha celular adequada.

Os tipos celulares adequados para passagem da população de rotavírus, no método anterior, incluem células de rim de macaco verde Africano (AGMK) que podem ser linhas celulares estabelecidas ou células AGMK primárias. As linhas celulares AGMK adequadas incluem, por exemplo, Vero (ATCC CCL-81), DBS-FRHL-2 (ATCC CL-160), BSC-1 (ECACC 85011422) e CV-1 (ATCC CCL-70). Também adequadas são as linhas celulares MA-104 (macaco rhesus) e MRC-5 (humanas-ATCC CCL-171). As células Vero são particularmente preferidas para objectivos de amplificação. A passagem por células Vero proporciona um rendimento elevado em vírus.

As técnicas para verificar se existe uma única variante numa população de vírus resultante do método e para determinar a natureza dessa única variante envolvem processos de sequenciação ou hibridação convencionais, conhecidos na técnica e que são aqui descritos abaixo.

Num aspecto preferido, o método da invenção é efectuado utilizando um rotavírus apropriado, particularmente, rotavírus com as características da estirpe 89-12 ou de um seu derivado de passagem.

Uma população de variante única particularmente preferida é a P43, que é obtida da P33 (um rotavírus humano isolado passado 33 vezes em cultura em tipos celulares apropriados) por uma série de passos de clonagem de diluição final, seguidos por passagem do material clonado em células Vero, para amplificação.

Uma população P43 foi depositada na European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Reino Unido a 13 de Agosto de 1999 com o número de depósito 99081301, sob os termos do Tratado de Budapeste.

Embora esta disponibilidade pública indicada seja o método mais simples de se obter o rotavírus humano P43, não é totalmente impossível ou improvável que rotavírus semelhantes e, de um modo substancial, funcionalmente idênticos possam ser produzidos por estes ou outros métodos, tendo em conta os ensinamentos desta invenção. Tais rotavírus, de um modo substancial funcionalmente idênticos, são considerados como sendo biologicamente equivalentes ao rotavírus humano P43 desta invenção e, por isso, estão dentro do âmbito geral da presente invenção. Será, então, entendido que a invenção engloba as populações de rotavírus, com as características da variante P43, como aqui descrito.

Será também entendido que a invenção engloba materiais derivados do P43 ECACC 99081301 depositado, submetendo-o a um processamento posterior, tal como propagando-o por passagem posterior, clonagem ou outros processos utilizando o vírus vivo ou por modificação do P43, de qualquer modo, incluindo através de técnicas de engenharia genética ou técnicas de reassociação. Tais passos e técnicas são bem conhecidos na técnica.

Os materiais derivados do P43 depositado, que estão abrangidos pela invenção, incluem proteína e material genético. De particular interesse são os rotavírus reassociados que compreendem, pelo menos, um antigénio ou, pelo menos, um

segmento do P43, por exemplo reassociados que compreendem uma estirpe virulenta de rotavírus, na qual um, ou parte de um dos 11 segmentos do genoma foi substituído pelo segmento de genoma do P43 ou uma sua parte. Especificamente, uma reassociação de rotavírus, na qual o segmento ou segmento parcial, codificando a NSP4 é um segmento ou segmento parcial de P43, pode ter propriedades úteis. Os rotavírus reassociados e técnicas para os preparar são bem conhecidas (Foster, R.H. e Wagstaff, A.J. Tetravalent Rotavirus Vaccine, a review. ADIS drug evaluation, BioDrugs, Gev, 9(2), 155-178, 1998).

Os materiais de particular interesse são descendentes do P43 e derivados imunologicamente activos do P43. Derivados imunologicamente activos, significa materiais obtidos de ou com o vírus P43, particularmente, antigénios do vírus que são capazes de induzir uma resposta imunitária que é reactiva contra o Rotavírus quando injectados num animal hospedeiro.

Na adaptação do rotavírus a uma linha celular apropriada, por exemplo, células Vero, pode ser necessário tratar o vírus de modo a remover qualquer potencial contaminante, tal como quaisquer agentes adventícios que possam estar presentes e que poderão, de outro modo, causar contaminação. No caso de vírus adventícios sensíveis ao éter, tal pode ser efectuado através de tratamento com éter como aqui descrito abaixo. A presente invenção refere-se também à inclusão de tal tratamento com éter como um passo opcional no processo global, para se obter um rotavírus vivo atenuado ou vacina formulada com este.

Também dentro do âmbito da invenção estão misturas de P43 com outras variantes de rotavírus, por exemplo, outras variantes clonadas, ou com outros vírus, em particular, outros vírus

atenuados. Tais misturas são úteis nas vacinas da invenção que são aqui descritas abaixo.

A presente invenção proporciona também uma vacina de rotavírus vivo atenuado que compreende uma população de variante substancialmente única misturada com um adjuvante ou um veículo farmacêutico adequado.

De um modo preferido, a vacina de rotavírus de acordo com a invenção é uma vacina de rotavírus monovalente contendo uma estirpe de rotavírus única.

A presente invenção é particularmente vantajosa ao proporcionar uma vacina de rotavírus vivo na qual o rotavírus vivo atenuado é um rotavírus humano e não causa intussuscepção.

Os veículos farmacêuticos adequados para utilização na vacina de acordo com a invenção incluem aqueles conhecidos na técnica, como sendo adequados para administração oral, especialmente, em crianças. Tais veículos incluem, e não estão limitados a, hidratos de carbono, poliálcoois, aminoácidos, hidróxido de alumínio, hidróxido de magnésio, hidroxiapatite, talco, óxido de titânio, hidróxido de ferro, estearato de magnésio, carboximetilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, celulose microcristalina, gelatina, peptona vegetal, xantano, carragenano, goma-arábica, β -ciclodextrina.

A invenção proporciona também um processo para preparar uma vacina de rotavírus, por exemplo, por liofilização do vírus na presença de estabilizadores adequados ou mistura do vírus, de acordo com a invenção, com um adjuvante ou veículo farmacêutico adequado.

Pode também ser vantajoso formular o vírus da invenção em veículos baseados em lípidos, tais como virossomas ou lipossomas, em emulsões óleo em água ou com partículas de transporte. Alternativamente ou em adição, podem ser incluídos na formulação imunostimulantes, tais como aqueles conhecidos na técnica para vacinas orais. Tais imunostimulantes incluem, toxinas bacterianas, particularmente, a toxina da cólera (CT) na forma de holotoxina (molécula inteira) ou apenas a cadeia B (CTB) e a enterotoxina instável ao calor de *E. coli* (LT). As LT mutadas (mLT) que, com menor probabilidade se converterão na sua forma activa do que a LT nativa, são descritas nos documentos WO 96/06627, WO 93/13202 e US 5182109.

Outros imunostimulantes que podem, vantajosamente, ser incluídos são os derivados da saponina, tais como QS21 e lípido A monofosforilo, em particular o lípido A monofosforilo 3-des-O-acilado (3D-MPL). As saponinas purificadas como adjuvantes orais são descritas no documento WO 98/56415. As saponinas e o monofosforil-lípido A podem ser empregues separadamente ou em combinação (e. g: documento WO 94/00153) e podem ser formulados em sistemas de adjuvante em conjunto com outros agentes. O 3D-MPL é um adjuvante bem conhecido, produzido por Ribi Immunochem, Montana e a sua preparação é descrita no documento GB 2122204.

Uma discussão geral sobre veículos e adjuvantes para imunização oral pode ser encontrada em Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach, editado por Powell e Newman, Plenum Press, Nova Iorque, 1995.

A invenção proporciona também um método para vacinar indivíduos humanos, especialmente crianças, administrando a um

indivíduo com essa necessidade, uma quantidade eficaz de uma composição de vacina de acordo com a invenção. De um modo preferido, a vacina viva atenuada é administrada por administração oral.

Num aspecto preferido, a composição de vacina da invenção é formulada com um antácido para minimizar a inactivação da vacina pelo ácido no estômago. Os componentes antácidos adequados, incluem antácidos inorgânicos, por exemplo, hidróxido de alumínio $\text{Al}(\text{OH})_3$ e hidróxido de magnésio $\text{Mg}(\text{OH})_2$. Os antácidos disponíveis comercialmente, que são adequados para utilização na invenção, incluem Mylanta (marca registada) que contém hidróxido de alumínio e hidróxido de magnésio. Estes são insolúveis em água e são administrados em suspensão.

O hidróxido de alumínio é um componente particularmente preferido de uma composição de vacina de acordo com a invenção, na medida em que pode proporcionar não só um efeito de antácido mas também um efeito de adjuvante.

Também adequados para utilização como antácidos na vacina da invenção, são os antácidos orgânicos, tal como sais carboxilato de ácidos orgânicos. Um antácido preferido na composição de vacina da invenção contém um sal carboxilato de ácido orgânico, de um modo preferido, um sal de ácido cítrico, tal como citrato de sódio ou citrato de potássio.

Um antácido particularmente preferido que pode ser utilizado na composição de vacina da presente invenção é o sal inorgânico insolúvel, carbonato de cálcio (CaCO_3). O carbonato de cálcio é capaz de se associar com o rotavírus e a actividade do

rotavírus é mantida durante a associação com o carbonato de cálcio.

Para prevenir a sedimentação do carbonato de cálcio durante o passo de preenchimento, os agentes viscosos estão, de um modo preferido, presentes na formulação.

Os possíveis agentes viscosos que podem ser utilizados, incluem excipientes pseudoplásticos. Uma solução pseudoplástica é definida como uma solução com uma viscosidade superior em repouso em comparação com a sua viscosidade sob agitação. Os excipientes deste tipo são polímeros naturais, tais como goma-arábica, goma de adraganto, ágar-ágar, alginatos, pectinas ou polímeros semi-sintéticos, por exemplo: carboximetilcelulose (Tyloses C[®]), metilcelulose (Methocels A[®], Viscontrans MC[®], Tylose MH[®] e MB[®]), hidroxipropilcelulose (Klucels[®]) e hidroxipropilmetilcelulose (Methocels E[®] e K[®], Viscontrans MPHC[®]). No geral, esses excipientes pseudoplásticos são utilizados em conjunto com agentes tixotrópicos. Os agentes viscosos alternativos que podem ser utilizados são excipientes pseudoplásticos com uma capacidade de fluidez baixa. Esses polímeros, a uma concentração suficiente, dão origem uma organização estrutural fluida, resultando numa solução de elevada viscosidade, com baixa capacidade de fluidez, quando em repouso. Tem de ser fornecida uma certa quantidade da energia ao sistema para permitir a fluência e transferência. São necessárias energias externas (agitação) para destruir temporariamente a organização estrutural fluida, de modo a se obter uma solução fluida. Exemplos de tais polímeros são Carbopols[®] e goma de xantano.

Os excipientes tixotrópicos tornam-se numa estrutura de gel quando em repouso, enquanto sob agitação formam uma solução fluida. Exemplos de excipientes tixotrópicos são: Veegum® (Silicato de magnésio-alúminio) e Avicel RC® (cerca de 89% de celulose microcristalina e 11% de Carboximetilcelulose de Na).

A composição de vacina da presente invenção compreende, de um modo preferido, um agente de viscosidade selecionado de goma de xantano ou amido.

Assim, a composição de vacina da presente invenção é, de um modo preferido, formulada com uma combinação de carbonato de cálcio e goma de xantano.

Outros componentes de uma composição utilizada na invenção incluem, adequadamente, açúcares, por exemplo, lactose e/ou sacarose.

A composição de vacina de acordo com a invenção pode conter componentes adicionais incluindo, por exemplo, aromatizantes (particularmente para uma vacina oral) e agentes bacterioestáticos.

São consideradas diferentes apresentações da composição de vacina de acordo com a invenção.

Numa forma de realização preferida, a vacina é administrada como uma formulação líquida. De um modo preferido, a formulação líquida é reconstituída antes da administração a partir de, pelo menos, dois dos seguintes componentes:

- i) componente do vírus

ii) componente líquido.

Nesta forma de realização, o componente do vírus e o componente líquido estão, normalmente, presentes em recipientes separados que podem ser, convenientemente, compartimentos separados de um único reservatório ou reservatórios separados que podem estar unidos de tal modo que a composição de vacina final seja reconstituída sem a expor ao ar.

Antes da reconstituição, o vírus pode estar numa forma seca ou numa forma líquida. De um modo preferido, o componente do vírus está liofilizado. O vírus liofilizado é mais estável do que o vírus numa solução aquosa. O vírus liofilizado pode ser adequadamente reconstituído utilizando uma composição de antácido líquida para produzir uma formulação de vacina líquida. Alternativamente o vírus liofilizado pode ser reconstituído com água ou solução aquosa, em que, neste caso, a composição de vírus liofilizado contém, de um modo preferido, um componente antácido.

De um modo preferido, a formulação de vacina compreende um componente de vírus formulado com carbonato de cálcio e goma de xantano num compartimento ou reservatório e este é reconstituído com água ou solução aquosa presente no segundo compartimento ou reservatório.

Noutra forma de realização preferida, a composição de vacina é uma formulação sólida, de um modo preferido, um bolo liofilizado que é adequado para dissolução imediata quando colocado na boca. As formulações liofilizadas podem ser convenientemente proporcionadas na forma de comprimidos numa embalagem farmacêutica em *blister*.

Noutro aspecto, a invenção proporciona uma vacina de rotavírus na forma de um comprimido de dissolução rápida para administração oral.

Noutro aspecto, a invenção proporciona uma composição compreendendo uma estirpe de rotavírus vivo atenuado, em particular, uma estirpe de rotavírus humano, em que a composição é um sólido liofilizado capaz de dissolução imediata quando colocado na boca.

De um modo preferido, o comprimido de dissolução rápida de acordo com a invenção dissolve-se na boca do indivíduo com uma rapidez suficiente para prevenir deglutição do comprimido não dissolvido. Esta abordagem é particularmente vantajosa para vacinas de rotavírus pediátricas.

De um modo preferido, o vírus é um rotavírus humano vivo atenuado que é formulado com um antácido inorgânico, tal como carbonato de cálcio e um agente de viscosidade, tal como goma de xantano.

Um outro aspecto da presente invenção é proporcionar uma formulação liofilizada, em que o componente do vírus é qualquer estirpe de rotavírus que é formulada com carbonato de cálcio e goma de xantano. As vacinas da invenção podem ser formuladas e administradas por técnicas conhecidas, utilizando uma quantidade adequada do vírus vivo para proporcionar uma protecção eficaz contra infecção por rotavírus sem efeitos secundários significativos em vacinas típicas. Uma quantidade adequada de vírus vivo irá estar, normalmente, entre 10^4 e 10^7 ffu por dose. Uma dose típica da vacina pode compreender 10^5 - 10^6 ffu por dose e

pode ser administrada em várias doses durante um período de tempo, por exemplo, em duas doses administradas com um intervalo de dois meses. Os benefícios podem, contudo, ser obtidos tendo mais de 2 doses, por exemplo, um regime de 3 ou 4 doses, em particular, em países em desenvolvimento. O intervalo entre doses pode ser superior ou inferior a dois meses de intervalo. Uma quantidade óptima do vírus vivo para uma dose única ou para um regime de dose múltipla e um momento óptimo para as doses, podem ser apurados por estudos convencionais que envolvem a observação de títulos de anticorpos e outras respostas em indivíduos.

A vacina da invenção também pode compreender outros vírus vivos adequados para protecção contra outras doenças, por exemplo, poliovírus. Alternativamente, podem ser administradas outras vacinas de vírus vivos adequadas para administração oral, numa dose separada, mas em simultâneo com a composição de vacina de rotavírus segundo a invenção.

Legenda da Figura para a Figura 3

Os soros de doze crianças, com 4 a 6 meses de idade, vacinadas com o material P33, como descrito na publicação Vaccine (1998), foram testados para a neutralização do P33, P38, P43 e 89-12C2.

A gama de títulos de neutralização de todos os soros testados é semelhante para P33, P38 e P43. A análise estatística não mostra nenhuma diferença significativa nos títulos de neutralização totais, contra os três vírus. Isto sugere que os

epitopos de neutralização conformacional e não-conformacional de P33, P38 e P43 sejam igualmente bem reconhecidos pelos soros anti-P33 de crianças vacinadas com P33. Esta observação sugere, indirectamente, que os epitopos de neutralização revelados neste ensaio *in vitro* não foram alterados entre P33, P38 e P43.

A gama de títulos de neutralização de P89-12C2, contudo, difere significativamente de P33, P38 e P43. Esta observação sugere que os epitopos de neutralização conformacional e não conformacional de P33, P38 e P43 não são igualmente bem reconhecidos pelos soros anti-P33 de crianças vacinadas com P33. Esta observação sugere, indirectamente, que os epitopos de neutralização revelados neste ensaio *in vitro* foram alterados entre 89-12 C2 e P33, P38 e P43.

Os seguintes exemplos ilustam a invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Demonstração de que a estirpe 89-12 na passagem 26 (P26) é uma mistura de variantes

Sequenciação dos genes VP4 e VP7 de lotes de passagens diferentes

Foi efectuada a sequenciação dos genes VP4 e VP7 da passagem P26 (células AGMK primárias), passagem P33 (linha celular AGMK estabelecida (em oposição às primárias)), passagem P41 e passagem P43. A extração de ARN total foi transcrita inversamente e amplificada por PCR num tubo/num passo.

Os iniciadores Rota 5bis e Rota 29bis amplificaram o gene VP4 inteiro e os iniciadores Rota 1 e Rota 2bis amplificaram o gene VP7 inteiro. O material de PCR foi sequenciado utilizando diferentes iniciadores (ver Tabela 1).

A sequência da passagem P26 diferiu da sequência da passagem P33 em 3 bases (nas posições 501, 788 e 802 pb a partir do codão iniciador) em VP4 e em três bases em VP7 (108, 605 e 897 pb a partir do codão iniciador).

Os varrimentos da sequência da passagem P26 do VP4 e VP7 mostram, em posições mutadas, a presença da sequência da passagem P33 como um fundo. Assim, pode ser observado que a passagem P26 é uma mistura de, pelo menos, 2 variantes.

Os varrimentos da sequência da passagem P33 parecem homogêneos em VP4 e heterogêneos para VP7 (ver Tabela 2).

A passagem P38 (derivada da passagem 33) foi passada 5 vezes em células Vero e apresentava o mesmo conjunto de sequências VP4 e VP7 que a passagem P33 (linha celular AGMK). Assim, não ocorreu nenhuma modificação importante nas populações entre P33 e P38.

TABELA 1: Oligonucleótidos utilizados para o RT-PCR e sequenciação

	nome	sequência	posição
VP7	Rota 1	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	-49 a -22
	Rota 1bis	GGT TAG CTC CTT TTA ATG TAT GGT A	-16 a 10
	Rota 2bis	GGT CAC ATC GAA CAA TTC TAA TCT AAG	1014-988
	Rota 7	CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G	266-287
	Rota 12	TGT TGA TTT TTC TGT CGA TCC AC	372-394
	Rota 46	GGT TGC TGA GAA TGA GAA ATT AGC TAT AGT GG	651-682
	Rota 18	CCA CTA TAG CTA ATT TCT CAT TCT CAG CAA CC	682-651
VP4	Rota 5	TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A	2-23
	Rota 6	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	878-859
	Rota 5bis	TGG CTT CAC TCA TTT ATA GAC A	2-23
	Rota 6bis	ATT TCA GAC CAT TTA TAA CCT AG	878-856
	Rota 25	GGA GTA GTA TAT GAA AGT ACA AAT AAT AG	268-296
	Rota 26	CTA TTA TTT GTA CTT TCA TAT ACT ACT CC	296-268
	Rota 27bis	TCG ATA CAG TAT AAG AGA GCA CAA G	721-745
	Rota 28	TTC ATT AAC TTG TGC TCT CTT ATA CTG	753-727
	Rota 31	GTA TAT GTA GAC TAT TGG GAT G	1048-1070
	Rota 32	CAT CCC AAT AGT CTA CAT ATA C	1070-1048
	Rota 45	TGT AAC TCC GGC AAA ATG CAA CG	1205-1227
	Rota 53	CGT TGC ATT TTG CCG GAG TTA CA	1227-1205
	Rota 54	GTA AGA CAA GAT TTA GAG CGC CA	1465-1487
	Rota 55	TGG CGC TCT AAA TCT TGT CTT AC	1487-1465
	Rota 40	CTT GAT GCT GAT GAA GCA GCA TCT G	1703-1727
	Rota 39	CAG ATG CTG CTT CAT CAG CAT CAA G	1727-1703
	Rota 33	CGA TCA TAT CGA ATA TTA AAG GAT G	2008-2032
	Rota 34	CAT CCT TTA ATA TTC GAT ATG ATC G	2032-2008
	Rota 29bis	AGC GTT CAC ACA ATT TAC ATT GTA G	2335-2311

TABELA 2: oligonucleótidos utilizados em hibridação

	nome	sequência	posição
VP7	Rota 41	AGT ATT TTA TAC TAT AGT AGA TTA TAT TAA TC	882-913
	Rota 42	AGT ATT TTA TAC TAT GGT AGA TTA TAT TAA TC	882-913
VP4	Rota 15	ATC CCC C ATT ATA CTG CAT TCC TTT C	807-783
	Rota 16	ATC CCT T ATT ATA CTG CAT TTC TTT C	807-783
	Rota 35	ATC CCC C ATT ATA CTG CAT TTC TTT C	807-783
	Rota 36	ATC CCT T ATT ATA CTG CAT TCC TTT C	807-783

As bases mostradas a negrito na Tabela 2 são os locais de variação da sequência específica em VP4 e VP7.

TABELA 3: variação da sequência dos genes VP4 e VP7

3.1

VP4				VP7		
	501 pb 167 aa	788 pb 263 aa	802 pb 268 aa	108 pb 36 aa	605 pb 202 aa	897 pb 299 aa
P26 (AGMK)	A	G/A	G/A	A	C/T	A
P33 (AGMK)	T	A	A	G/A	T/C	A/G
P38 (VERO)	T	A	A	A/G	T	G/A
P43 (VERO)	T	A	A	A	T	A

N.B. Num segundo clone dos 3 clones que foram desenvolvidos ao nível do lote de produção, o nucleótido de VP7 na posição a 897 pb é G em vez de A como no clone P43 selecionado. Isto resulta numa metionina no lugar de uma isoleucina na sequência de aminoácidos. As variantes correspondentes ao clone P43 selecionado e ao clone no qual existe uma G em VP7 a 897 pb a partir do codão iniciador, foram excretadas nas fezes de crianças que tinham sido vacinadas com o material P33.

Na Tabela 3.1, onde existem duas bases alternativas numa posição em particular, a primeira das duas representa a base que aparece numa população maior e a segunda é a base que aparece numa população menor. As populações de variantes maior e menor são julgadas pela força do sinal na sequenciação.

3.2

VP4				VP7		
	501 pb 167 aa	788 pb 263 aa	802 pb 268 aa	108 pb 36 aa	605 pb 202 aa	897 pb 299 aa
P26 (AGMK)	Leu	Gly/Glu	Gly/Arg	Arg	Thr/Met	Ile
P33 (AGMK)	Phe	Glu	Arg	Arg/Arg	Met/Thr	Ile/Met
P38 (VERO)	Phe	Glu	Arg	Arg/Arg	Met	Met/Ile
P43 (VERO)	Phe	Glu	Arg	Arg	Met	Ile

A Tabela 3.2 mostra as modificações em aminoácidos que resultam das diferenças de nucleótidos entre as variantes.

TABELA 4

	VP4 (posições 788-802)				VP7 (posição 897)	
	G-G	A-A	A-G	G-A	A	G
Sondas	Rota 15	Rota 16	Rota 35	Rota 36	Rota 41	Rota 42
Passagens						
P26	-	+	+	+	nd	nd
P33	-	+	-	-	++	+
P38	-	+	-	-	+	++
P43	-	+	-	-	+	-

Hibridização Slot blot

A modificação em populações entre as passagens P26 a P33 em células AGMK foi também confirmada por hibridação *slot blot*. Os fragmentos dos genes VP4 e VP7 gerados por RT/PCR foram hibridados com sondas de oligonucleótidos específicas para cada variante (ver Tabela 3.1 e 3.2). Em contraste com P26 que hibridou com Rota 16, Rota 35 e Rota 36 e não com Rota 15, o fragmento de PCR de VP4 do material P33, nas posições 788 e 802, só hibridou com Rota 16 e não com Rota 15, Rota 35 ou Rota 36. Estes resultados estabeleceram a presença de, pelo menos, 3 variantes em P26 (ver a Tabela 4).

Para o fragmento de PCR do VP7 do material P33, a posição 897 hibridou com Rota 41 e Rota 42. Estes resultados estabeleceram a presença de, pelo menos, duas variantes no material P33.

Exemplo 2: Isolamento e caracterização do clone P43

Para isolar os componentes P33 como uma população de vírus homogênea, foram efectuadas três diluições de ponto terminal de P33/AGMK em células Vero e o vírus resultante foi utilizado para infectar células Vero.

Os poços positivos foram selecionados utilizando dois critérios: crescimento demonstrado pelo maior número de foci detectados nos poços e os poços positivos mais isolados nas placas, como é realizado normalmente. Depois de 3 passagens de diluição terminal em placas de microtitulação de 96 poços, foram amplificadas sucessivamente, 10 poços positivos em células Vero e avaliados no seu rendimento.

Com base no rendimento, foram desenvolvidos três clones para o nível de passagem do lote de produção. Verificou-se que o imunorreconhecimento por anticorpos policlonais é semelhante tanto entre os três clones como entre os clones e P33. A homogeneidade dos clones foi avaliada por hibridação *slot blot*. A seleção final de um clone único foi baseada no rendimento e sequência.

O clone selecionado foi amplificado por passagens sucessivas em células Vero para gerar uma semente Mestre, uma semente de Trabalho e, finalmente, lotes de produção.

O clone selecionado foi caracterizado geneticamente a diferentes níveis de passagem por sequenciação do VP4 e VP7 (identidade) e por hibridação *slot blot* específica do VP4 e VP7 (homogeneidade) dos materiais amplificados por PCR. A sequência

dos genes VP4 e VP7 do material P43 são dados nas Figuras 1 e 2, respectivamente, e são idênticas ao P41.

A homogeneidade do clone selecionado foi avaliada através de uma hibridação selectiva utilizando sondas de oligonucleótidos discriminando modificações nos nucleótidos nas regiões do VP4 e/ou VP7 de cada variante identificada durante a sequenciação do P26/AGMK primário (ver Tabela 4).

O fragmento de VP4 hibridou com Rota 16 e não com Rota 15, Rota 35 ou Rota 36.

O fragmento de VP7 hibridou com Rota 41 e não com Rota 42.

Estes resultados confirmaram que P43 é uma população homogênea.

Exemplo 3: Remoção do vírus potencialmente adventício

Foi adicionado éter a P33 (crescimento em AGMK), para uma concentração final de 20% durante 1 hora. O éter foi, depois, removido com N₂ borbulhado durante 35 min. Não foi observado impacto no título da semente de P33.

Exemplo 4: Formulação de uma vacina viva atenuada

Os lotes de produção descritos acima são formulados para administração oral a crianças pelo seguinte método.

1. Vírus liofilizado

São utilizadas técnicas convencionais para preparar doses de vírus. O lote viral purificado congelado é descongelado e diluído com a composição de meio apropriada, neste caso Meio eagle modificado por Dulbecco, até uma concentração viral padrão desejada, neste caso $10^{6,2}$ ffu/mL. O vírus diluído é, então, diluído posteriormente com o estabilizador de liofilização (sacarose a 4%, dextrano a 8%, sorbitol a 6%, aminoácido a 4%) até ao título viral alvo, neste caso, $10^{5,6}$ ffu/dose. Alíquotas de 0,5 mL da composição de vírus estabilizada são transferidas, assepticamente, para frascos de 3 mL. Cada frasco é, então, fechado parcialmente com uma rolha de borracha, a amostra é seca por congelação sob vácuo, o frasco é, então, totalmente fechado e é encapsulado com uma cápsula de alumínio para manter a rolha no lugar.

Para utilização, o vírus é reconstituído utilizando um dos seguintes reconstituintes antácidos:

(a) Reconstituente de citrato

O citrato de sódio é dissolvido em água, esterilizado por filtração e assepticamente transferido para recipientes de reconstituição em quantidades de 1,5 mL a uma concentração de 544 mg de $\text{Na}_3\text{Citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por dose de 1,5 mL. Os recipientes de reconstituição podem ser, por exemplo, frascos de 3 mL, frascos de 4 mL, seringas de 2 mL ou cápsulas de plástico suave, comprimíveis, para administração oral. Como uma alternativa à manutenção de componentes estéreis em condições estéreis, o recipiente final pode ser autoclavado.

(b) Reconstituente de $\text{Al}(\text{OH})_3$

Uma suspensão de hidróxido de alumínio asséptica (Mylanta - marca registada) é diluída assepticamente em água estéril, transferida assepticamente para recipientes de reconstituição (por exemplo, seringas de 2 mL ou cápsulas de plástico suave comprimíveis) em quantidades de 2 mL contendo cada um 48 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$. Uma alternativa à utilização de componentes estéreis sob condições estéreis é irradiar a suspensão de hidróxido de alumínio (de um modo preferido, numa fase diluída), com radiação γ .

São incluídos ingredientes convencionais para impedir a deposição da suspensão. Tais ingredientes convencionais incluem, por exemplo, estearato de magnésio, carboximetilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, celulose microcristalina e polímeros de silicone. Podem também ser incluídos agentes bacteriostáticos, por exemplo, butilparabeno, propilparabeno ou outros agentes bacteriostáticos convencionais utilizados na comida e aromatizantes.

2. Vírus liofilizado com $\text{Al}(\text{OH})_3$ em formulação líquida

São utilizadas técnicas convencionais para preparar doses de vírus. O lote viral purificado congelado é descongelado e diluído com a composição de meio apropriada, neste caso, Meio eagle modificado por Dulbecco, até uma concentração viral padrão desejada, neste caso, $10^{6,2}$ ffu/mL. A suspensão de hidróxido de alumínio é adicionada para se atingir uma quantidade final de 48 mg/dose e a composição de vírus é diluída com o estabilizador de liofilização (sacarose a 4%, dextrano a 8%, sorbitol a 6%,

aminoácido a 4%) até ao título viral alvo, neste caso, $10^{5,6}$ ffu/dose. São transferidas assepticamente alíquotas de 0,5 mL da composição de vírus estabilizada para frascos de 3 mL. A liofilização e o encerramento dos frascos são, então, efectuados como descrito na parte 1.

3. Vírus liofilizado com $\text{Al}(\text{OH})_3$ para apresentação em blister

São utilizadas técnicas convencionais para preparar doses de vírus. O lote viral purificado congelado é descongelado e diluído com a composição de meio apropriada, neste caso, Meio eagle modificado por Dulbecco, até uma concentração viral padrão desejada, neste caso, $10^{6,2}$ ffu/mL. A suspensão de hidróxido de alumínio é adicionada para se atingir uma quantidade final de 48 mg/dose e a composição de vírus é diluída com o estabilizante de liofilização que pode ser sacarose, dextrano ou aminoácidos a 4%, gelatina, peptona vegetal ou xantano até ao título viral alvo de $10^{5,6}$ ffu/dose. É empregue uma operação de enchimento asséptica para transferir doses de 0,5 mL ou, de um modo preferido, menos para as cavidades *blister*. A composição é liofilizada e as cavidades *blister* são seladas por selagem térmica.

Opcionalmente, são incluídos ingredientes convencionais para impedir a deposição da suspensão de hidróxido de alumínio. Tais ingredientes convencionais incluem, por exemplo, estearato de magnésio, carboximetilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, celulose microcristalina e polímeros de silicone. Podem também ser incluídos aromatizantes.

Exemplo 5: Titulação viral de rotavírus para várias formulações

5.1: Comparação entre formulações baseadas em lactose e sacarose:

Lote nº	Composição da formulação	Título viral antes da liofilização	Título viral depois da liofilização e 1 semana a 37 °C
98G06/01	Lactose: 2%; Dextrano: 4%; Sorbitol: 3%; Aminoácidos: 2%	$10^{5,22}$	$10^{4,67}$
98G06/03	Sacarose: 2%; Dextrano: 4%; Sorbitol: 3%; Aminoácidos: 2%	$10^{5,28}$	$10^{4,92}$

O rotavírus P43 foi formulado com sacarose ou com lactose, como apresentado na tabela acima. A titulação viral antes da liofilização é o título viral no líquido formulado concluído (contendo sacarose, dextrano, sorbitol e aminoácidos) e sem o passo de liofilização.

Os bons resultados são aqueles nos quais é alcançada uma diminuição $<0,5$ log no passo de liofilização e uma redução $<0,5$ log durante “1 semana a 37 °C” (teste de estabilidade acelerada).

A precisão da titulação viral está entre + ou $-0,2$ log.

Os resultados indicam que pode ser utilizada sacarose em vez da lactose.

5.2: Efeito de arginina e substituição de sorbitol por maltitol:

Lote n°	Composição da formulação	Título viral no tempo = zero após liofilização	Título viral depois da liofilização e 1 semana a 37 °C
98L16/01	Lactose: 2%; Dextrano: 4%; Sorbitol: 3%; Aminoácidos: 2%	$10^{4,8}$	$10^{4,8}$
98L16/02	Lactose: 2%; Dextrano: 4%; Sorbitol: 3%; Aminoácidos: 2%; Arginina: 3%	$10^{4,8}$	$10^{4,9}$
98L16/04	Lactose: 2%; Dextrano: 4%; Maltitol: 3%; Aminoácidos: 2%; Arginina: 3%	$10^{4,7}$	10^5

Os resultados demonstraram que a adição de arginina (que é conhecida por melhorar a estabilidade do vírus durante a liofilização e também por proporcionar um meio básico de modo a compensar a acidez de estômago) mantém o título viral.

O sorbitol tende a reduzir a temperatura de transição vítrea do bolo de liofilização a um nível muito elevado. Isto

pode ser superado utilizando maltitol em vez de sorbitol, como demonstrado acima e o título viral continua a ser mantido.

5.3: Várias composições de formulação

Esta experiência demonstra que são possíveis várias formulações.

Lote n°	Composição da formulação	Título viral antes da liofilização	Título viral depois da liofilização e 1 semana a 37 °C
99C11/01	Sacarose: 2%; Dextrano: 4%; Sorbitol: 3%; Aminoácidos: 2%	$10^{5,24}$	$10^{5,07}$
99C11/02	Sacarose: 2%; Dextrano: 4%; Maltitol: 3%; Aminoácidos: 2%	$10^{5,09}$	$10^{4,92}$
99C11/04	Dextrano: 4%; Maltitol: 3%; Aminoácidos: 2%	$10^{4,89}$	$10^{5,06}$

Lote n°	Composição da formulação	Título viral no tempo = zero após liofilização	Título viral depois da liofilização e 1 semana a 37 °C
99C17/01	Sacarose: 2%; Dextrano: 4%; Sorbitol: 3%; Aminoácidos: 2%	$10^{5,40}$	$10^{5,41}$
99C17/02	Sacarose: 2%; Dextrano: 4%; Sorbitol: 1,5%; Aminoácidos: 2%	$10^{5,30}$	$10^{4,93}$
99C17/03	Sacarose: 2%; Dextrano: 4%; Aminoácidos: 2%	$10^{5,31}$	$10^{5,24}$
99C17/04	Sacarose: 2%; Dextrano: 4%; Maltitol: 3%; Aminoácidos: 2%	$10^{4,42}$	$10^{4,45}$
99C17/05	Sacarose: 2%; Dextrano: 4%; Maltitol: 1,5%; Aminoácidos: 2%	$10^{4,39}$	$10^{4,40}$
99C17/06	Sacarose: 2%; Dextrano: 4%; Sorbitol 3%	$10^{5,44}$	$10^{4,97}$
99C17/07	Sacarose: 2%; Dextrano: 4%; Sorbitol: 1,5%	$10^{5,11}$	$10^{4,89}$

5.4: Associação entre o Rotavírus e antácido $\text{Al}(\text{OH})_3$:

Rotavírus	$\text{Al}(\text{OH})_3$	H_2O	Tempo de contacto à temperatura ambiente	Centrifugação	Título viral do sobrenadante em ffu/mL	Título viral do precipitado em ffu/mL
$10^{5,6}$ ffu/mL	48 mg em 0,240 mL	0,76 mL	30 min	8000 rpm, 10 min	$10^{3,66}$	
$10^{5,6}$ ffu/mL	0,48 mg em 0,240 mL	0,76 mL	30 min	8000 rpm, 10 min	$10^{4,41}$	
$10^{5,6}$ ffu/mL		1 mL	30 min	8000 rpm, 10 min	$10^{5,68}$	
Rotavírus em Bolo Liofilizado	12 mg em 0,120 mL	1,38 mL	30 min	8000 rpm, 10 min	Abaixo do limite de detecção	$10^{4,7}$

O $\text{Al}(\text{OH})_3$ é utilizado como antácido. Isto demonstra que o Rotavírus está associado com o sal inorgânico insolúvel ($\text{Al}(\text{OH})_3$) uma vez que é centrifugado em conjunto com o $\text{Al}(\text{OH})_3$ (diminuição da actividade viral no sobrenadante).

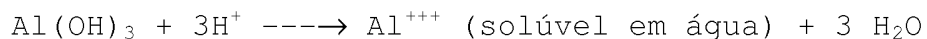
5.5: Dissolução do antácido Al(OH)_3 por Citrato de Sódio antes da titulação viral

Amostras virais	Dissolução	Condições	Títulos virais ffu/mL
99B10/06 formulação líquida antes da liofilização; $10^{5,43}$	1,5 mL de Citrato de Na_3	24 h à temperatura ambiente	$10^{5,11}$
99B10/06 liofilizada; $10^{5,43}$	1,5 mL de Citrato de Na_3	24 h à temperatura ambiente	$10^{4,53}$

Quando o Rotavírus está associado com o Al(OH)_3 , é possível liofilizar tudo (incluindo o Al(OH)_3). Depois da liofilização, é possível recuperar o Rotavírus por dissolução do Al(OH)_3 em Citrato de Sódio. Este passo não danifica o Rotavírus e mantém a sua atividade após este passo de dissolução.

5.6: Infectividade do Rotavírus depois da libertação da associação de Al(OH)_3 -Rotavírus:

O mecanismo de libertação do vírus (pela dissolução do veículo) pode, muito bem, ocorrer *in vivo*. De facto, abaixo de pH 6, o hidróxido de alumínio torna-se completamente solúvel e, assim, o Rotavírus será libertado no estômago.



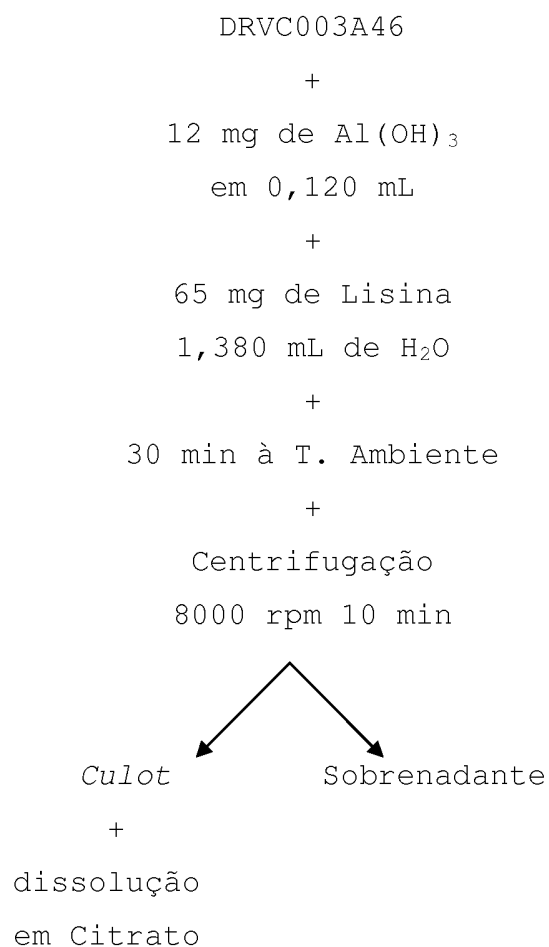
No estômago, os iões Al^{+++} não são absorvidos (J.J. Powell, R. Jugdaohsingh e R.P.H. Thompson, *The regulation of mineral adsorption in the gastrointestinal track*, Proceedings of the Nutrition Society (1999), 58, 147-153).

No intestino, devido ao aumento de pH, as formas insolúveis do alumínio são precipitadas (Al(OH)_3 ou AlPO_4) e eliminadas pela via natural.

Desconhece-se se o Al(OH)_3 (ou AlPO_4) recém formado precipitado será capaz de se reassociar com o Rotavírus livre. Isto levanta a questão da infectividade da própria associação Al(OH)_3 -Rotavírus.

É também possível a libertação do Rotavírus, da associação Al(OH)_3 -Rotavírus, através de outros mecanismos. A lisina, por exemplo, interfere com a adsorção viral no Al(OH)_3 .

Outros aniões como borato, sulfato, carbonato e fosfato são conhecidos como sendo especificamente adsorvidos no hidróxido de alumínio, assim, teoricamente, deverá ser possível deslocar (por competição pelo local de adsorção) o Rotavírus da associação Al(OH)_3 -Rotavírus.



abaixo da detecção

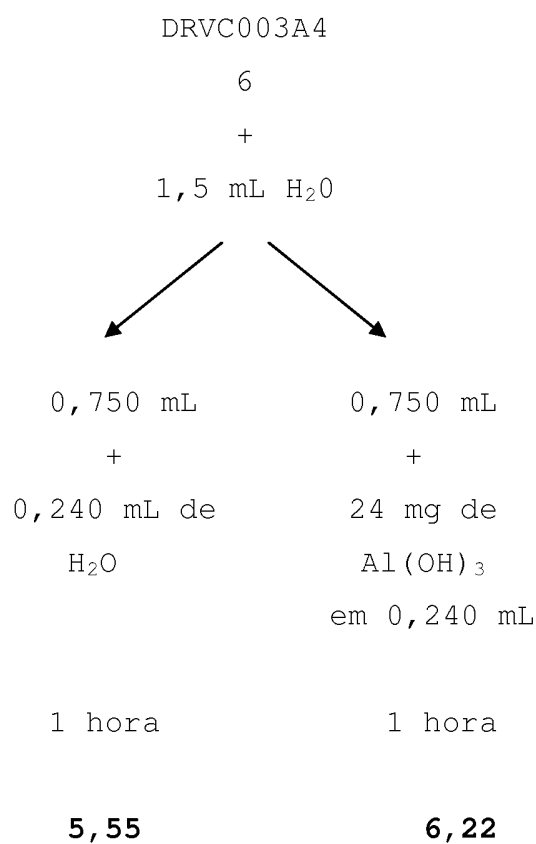
3,8

Assim, o Rotavírus pode ser libertado da associação Rotavírus- $\text{Al}(\text{OH})_3$ e o Rotavírus libertado permanece activo.

Esta libertação pode ser efectuada por dissolução do $\text{Al}(\text{OH})_3$ (pelo HCl no estômago ou por Na_3 Citrato *in vitro*) ou por deslocação do Rotavírus por um aminoácido básico (lisina).

5.7: Infectividade da associação $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Rotavírus

Uma dose única de Rotavírus liofilizado foi reconstituída com água e dividida em duas partes. A primeira parte, considerada como a referência, recebeu um volume adicional de água. A segunda parte recebeu 24 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ suspenso em 0,240 mL de água (Titulações virais pré-clínicas).



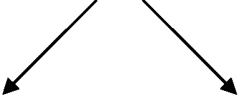
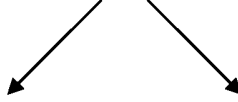
Quando o $\text{Al}(\text{OH})_3$ está presente, o Rotavírus está activo e o valor da titulação viral é superior comparado com a amostra de referência.

Esta experiência foi repetida sem dividir a dose liofilizada e acrescentando 12 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou 24 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Aqui, a amostra de referência foi aquela reconstituída com um tampão de Citrato-Bicarbonato. Assim, o título viral é, novamente, superior na presença de $\text{Al}(\text{OH})_3$.

DRVC003A46	DRVC003A46	DRVC003A46
+	+	+
1,5 mL de tampão	12 mg de	24 mg de
WL	$\text{Al}(\text{OH})_3$	$\text{Al}(\text{OH})_3$
	em 0,120 mL	em 0,240 mL
	+	+
	1,380 mL de H_2O	1,260 mL de H_2O
5,34	6,24	6,05
5,32	5,95	6,26

Como no exemplo acima, o Rotavírus associa-se com as partículas de $\text{Al}(\text{OH})_3$, uma vez que o vírus pode ser removido por centrifugação. O DRVC003A46 é um Rotavírus formulado liofilizado (Sacarose: 2%; Dextrano: 4%, Sorbitol: 3%; Aminoácidos: 2%).

DRVC003A46		DRVC003A46	
+		+	
12 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$		24 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$	
em 0,120 mL		em 0,240 mL	
+		+	
1,380 mL de H_2O		1,260 mL de H_2O	
+		+	
Centrifugação		Centrifugação	
8000 rpm 10 min		8000 rpm 10 min	
			
<i>Culot</i>	Sobrenadante	<i>Culot</i>	Sobrenadante
+		+	
1,5 mL de		1,5 mL de	
SDSAA		SDSAA	
5,78	<1,44	5,92	<1,44
5,96	<1,44	6,11	<1,44

SDSAA = Sacarose a 2%, Dextrano a 4%, Aminoácido a 2%.

De acordo com a titulação viral efectuada no sobrenadante, a quantidade de $\text{Al}(\text{OH})_3$ necessária para adsorver o Rotavírus parece ser baixa (começando com uma dose liofilizada de 5,7 log) aumentando a titulação viral):

Al (OH)₃	Tempo de adsorção	Título no sobrenadante
12 mg	1 hora TA	2,7
24 mg	1 hora TA	3,4
48 mg	1 hora TA	3,4
72 mg	1 hora TA	2,0
96 mg	1 hora TA	Abaixo da detecção
12 mg	Durante a noite	2,7
24 mg	Durante a noite	Abaixo da detecção
48 mg	Durante a noite	2,5
12 mg	Imediato	Abaixo da detecção
24 mg	Imediato	2,0
48 mg	Imediato	Abaixo da detecção

O tempo necessário para adsorver o Rotavírus no Al(OH)₃ parece ser curto:

Uma dose de Rotavírus liofilizado foi reconstituída na presença de 24 mg de Al(OH)₃ e centrifugada após 0, 15, 60 min e 24 horas. Os "*culot*" foram ressuspensos em SDSAA antes da titulação viral:

Tempo	<i>Culot</i>	Sobrenadante
0 min	5,26	3,17
15 min	5,34	<1,44
60 min	5,96	<1,44
24 horas	6,13	<1,44

5.8: Utilizando CaCO_3 como antácido

Para evitar o alumínio na vacina, o antácido $\text{Al}(\text{OH})_3$ foi substituído por outro sal inorgânico insolúvel: CaCO_3 (carbonato de cálcio).

Os fenómenos observados com CaCO_3 são paralelos aos descritos para $\text{Al}(\text{OH})_3$:

- Associação do Rotavírus com o sal inorgânico;
- Manutenção da actividade do Rotavírus quando associado com o sal inorgânico;
- Possibilidade de libertação do Rotavírus da associação por dissolução da base inorgânica por um ácido;
- Possibilidade de co-liofilização do antácido e do Rotavírus.

Associação do Rotavírus com CaCO_3

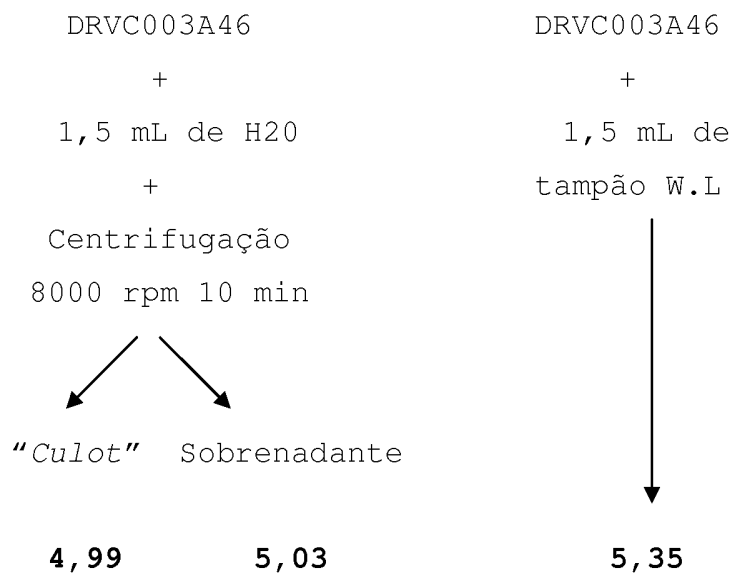
Num ensaio inicial, o Rotavírus liofilizado (título viral de 5,7), foi reconstituído com uma suspensão de CaCO_3 em água (50 mg em 1,5 mL); e depois centrifugado e o título viral do sobrenadante comparado com o *culot*.

DRVC003A46		DRVC003A46	
+		+	
50 mg de CaCO_3		50 mg de CaCO_3	
em		em	
1,5 mL de H_2O		1,5 mL de H_2O	
+		+	
Centrifugação		Centrifugação	
8000 rpm 10		8000 rpm 10	
min		min	
<i>Culot</i>	Sobrenadante	<i>Culot</i>	Sobrenadante
+	nt	+	nt
1,5 mL de		1,5 mL de	
SDSA		Citrato de	
A		Na	
5,83	4,46	5,88	4,33

Isto indica que mais de 90% do Rotavírus está associado com o CaCO_3 .

Também, quando o vírus estava associado, foi possível efectuar a titulação e recuperar as quantidades virais originais.

Também, os títulos virais são, ligeiramente, superiores aos obtidos sem CaCO_3 .



Quantidade de CaCO₃ e associação com o Rotavírus

O Rotavírus liofilizado foi reconstituído com uma suspensão de CaCO₃ em água (1,5 mL):

10 mg

50 mg

100 mg

e, depois, centrifugado, e o título viral do sobrenadante comparado com o do *culot*.

CaCO ₃	Extempo + Centri.		1 Hora + Centri.	
	<i>Culots</i>	Sobrenadante	<i>Culots</i>	Sobrenadante
100 mg	4,57	3,01	4,79	3,09
50 mg	4,17	4,15	4,22	3,86
10 mg	3,17	4,77	3,87	4,87

Assim, obviamente, mais CaCO_3 e mais vírus são associados e menos é encontrado no sobrenadante. Contudo, a dose total não é completamente recuperada (esperado um total de 5,3, pelo menos, ou até mesmo 5,8, como obtido anteriormente - ver acima).

Protecção do Rotavírus pelo CaCO_3 durante a titulação antácida de Baby Rossett-Rice

Utilizando 10 doses de Rotavírus (DRVC003A46) liofilizado e 50 mg de CaCO_3 , foram efectuados dois tipos de titulações *baby Rossettr-Rice*:

Numa titulação de *Rossett-Rice* clássica, o antácido é misturado com o Rotavírus e é vertido HCl neste meio.

Na *baby Rossett-Rice* "invertida", a situação é o oposto: é vertido antácido no conjunto de HCl (como ocorre *in vivo*).

Titulação <i>baby Rossett-Rice</i> clássica			
Rota Liofili. armazenado a:	Tampão	Título Viral Teórico	Título Viral Determinado
4 °C	60 mg de CaCO_3	5,3	4,6
-80 °C	60 mg de CaCO_3	5,3	4,6
4 °C	24 mg de Al(OH)_3	5,4	<2,9
-80 °C	24 mg de Al(OH)_3	5,4	<2,9

Titulação <i>baby Rossett-Rice</i> inversa			
Rota Liofili. armazenado a:	Tampão	Título Viral Teórico	Título Viral Determinado
4 °C	60 mg de CaCO ₃	5,3	4,6
-80 °C	60 mg de CaCO ₃	5,3	4,6
4 °C	24 mg de Al(OH) ₃	5,4	<2,9
-80 °C	24 mg de Al(OH) ₃	5,4	<2,9

Assim, nesta experiência *in vitro*, o carbonato de cálcio é capaz de proteger cerca de 20 % do Rotavírus da presença de HCl, enquanto o hidróxido de alumínio não é capaz.

5.9: Liofilização do Rotavírus na presença do antácido CaCO₃:

Lote nº	Composição	Título viral no tempo = zero após liofilização	Título viral após liofilização e 1 semana a 37 °C
99K08/01	Sacarose: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2% CaCO ₃ : 50 mg	10 ^{5,28}	10 ^{5,10}
99K08/02	Sacarose: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2% CaCO ₃ : 60 mg	10 ^{5,16}	10 ^{5,15}

(continuação)

Lote nº	Composição	Título viral no tempo = zero após liofilização	Título viral após liofilização e 1 semana a 37 °C
00C24/01	Sacarose: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2% CaCO ₃ : 60 mg Xantano: 0,3%	10 ^{5,07}	10 ^{4,69}
00C24/03	Sacarose: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2% CaCO ₃ : 60 mg Xantano: 0,3%	10 ^{5,07}	10 ^{4,85}
00E09/25	Sacarose: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2% CaCO ₃ : 60 mg Xantano: 0,25%	10 ^{5,03}	10 ^{4,91}
00E09/30	Sacarose: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2% CaCO ₃ : 60 mg Xantano: 0,30%	10 ^{5,01}	10 ^{4,87}
00F26/06	Sacarose: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2% CaCO ₃ : 60 mg Amido: 2%	10 ^{4,50}	10 ^{4,70}

Isto é o “todo em um” - liofilização do Rotavírus e antácido (CaCO_3) em associação no mesmo frasco. Para evitar a sedimentação de CaCO_3 durante o passo de enchimento, são necessários agentes viscosos. Exemplos de tais agentes de viscosidade incluem Goma de xantano e Amido. A actividade do Rotavírus é mantida mesmo na presença de Goma de xantano e Amido.

5.10 Comprimidos liofilizados para desintegração rápida quando colocados na boca:

As seguintes formulações demonstram o conceito “lyoc”. Isto é, a dissolução rápida do bolo liofilizado na boca.

Lote n °	Composição da formulação	Título viral antes da liofilização	Título viral após liofilização e 1 semana a 37 °C
99B10/06	Sacarose a 4% Glutamato de sódio a 3,7% 48 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$	$10^{5,11}$	$10^{4,53}$
99C11/12	Maltitol a 3% 48 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ Hidroxipropilmetil-celulose: 1%	$10^{4,16}$	$10^{3,79}$

Lote nº	Composição da formulação	Título viral no tempo = zero após da liofilização	Título viral após liofilização e 1 semana a 37 °C
00C24/05	Sacarose: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2% CaCO ₃ : 60 mg Xantano: 0,3%	10 ^{5,02}	10 ^{4,54}
00C24/06	Sacarose: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2% CaCO ₃ : 60 mg Xantano: 0,3%	10 ^{4,86}	10 ^{4,56}
00F26/11	Sacarose: 1% Dextrano: 2% Sorbitol: 1,5% Aminoácidos: 1% CaCO ₃ : 60 mg Amido: 2%	10 ^{4,70}	10 ^{4,40}

No "conceito *lyoc*" o Xantano e o Amido podem ser utilizados (mantendo das propriedades de dissolução rápidas do bolo liofilizado).

Exemplo 6: Utilização de Carbonato de Cálcio como antácido para a composição de vacina de Rotavírus

Quando é utilizada uma suspensão de CaCO_3 em água como o antácido para o Rotavírus, existe o problema de sedimentação rápida das partículas de carbonato de cálcio quando colocadas em água, uma vez que o valor de densidade do pó é de, aproximadamente, 2,6 e o tamanho médio de partícula é de 30 μm .

Esta sedimentação pode ser retardada por:

- 1 aumento da densidade do meio circundante
- 2 aumento da viscosidade do meio circundante
- 3 redução do tamanho das partículas
- 4 manter as partículas afastadas umas das outras

6.1: Aumento da densidade do meio circundante:

Quando a suspensão de CaCO_3 -Água (quando colocada na seringa) é colocada no bolo liofilizado (contendo sacarose a 2%, dextrano a 4%; sorbitol a 3%; aminoácidos a 2%) a densidade do meio circundante é aumentada, mas a velocidade de sedimentação do CaCO_3 não é muito diferente da suspensão de CaCO_3 -Água.

6.2 Aumento da viscosidade do meio circundante:

Excipientes pseudoplásticos

Uma solução pseudoplástica é definida como uma solução com uma viscosidade superior em repouso em comparação com a sua viscosidade sob agitação.

Excipientes convencionais deste tipo são:

polímeros naturais, por exemplo:

goma arábica

goma de adraganto

ágar-ágar

alginatos

pectinas

polímeros semi-sintéticos, por exemplo:

carboximetilcelulose (Tyloses C[®])

metilcelulose (Methocels A[®], Viscotrans MC[®], Tylose MH[®] e MB[®])

hidroxipropilcelulose (Klucels[®])

hidroxipropilmetilcelulose (Methocels E® e K®, Viscontrans MPHC®)

No geral, são utilizados excipientes pseudoplásticos em conjunto com agentes tixotrópicos.

Excipientes pseudoplásticos com baixa capacidade de fluidez

Os polímeros, a uma concentração suficiente, dão origem a um arranjo fluido estrutural que resulta numa solução de elevada viscosidade com uma baixa capacidade de fluidez em repouso. É necessário administrar uma certa quantidade de energia ao sistema para permitir fluir e transferir.

São necessárias energias externas (agitação) para destruir, temporariamente, o rearranjo fluido estrutural de modo a obter uma solução fluida.

Exemplos de tais polímeros são o Carbopols® e a goma de Xantano.

Excipientes tixotrópicos

Com estes excipientes, em repouso, é obtida uma estrutura em gel; enquanto que sob agitação é obtida uma solução fluida.

Exemplos de excipientes tixotrópicos são: Veegum® (silicato de Alumínio-Magnésio) e Avicel RC® (cerca de 89% de celulose microcristalina e cerca de 11% de Carboximetilcelulose de Na).

6.3 Redução do tamanho das partículas

Uma redução no tamanho das partículas de CaCO_3 resultou numa diminuição na capacidade de antácido do composto.

6.4 Manter as partículas afastadas umas das outras

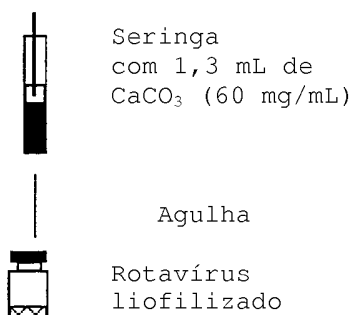
Este é o caso em Veegum® e Avicel®, para as quais as partículas insolúveis menores (cerca de 1 μm) que as partículas de CaCO_3 , são colocadas entre as partículas de CaCO_3 de modo a evitar a agregação.

Exemplo 7: Concepção do produto

Os seguintes esquemas demonstram exemplos possíveis de concepções do produto.

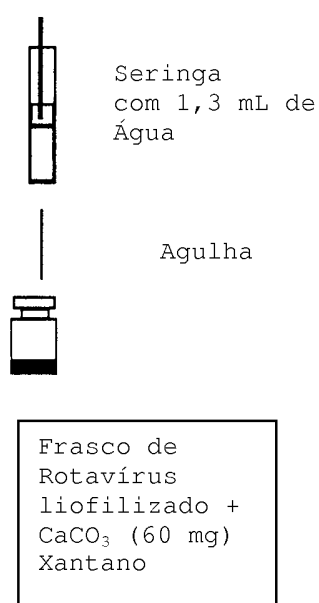
7.1 CaCO_3 na seringa

Já com os lotes clínicos de Rotavírus em frascos liofilizados, o antácido pode ser colocado no líquido de reconstituição contido na seringa.



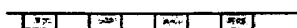
Nesta apresentação do produto, a sedimentação de CaCO_3 deve estar sob controlo, não apenas durante os passos de enchimento, mas também durante todo o tempo de armazenamento estável do produto (pelo menos 2 anos).

7.2 CaCO_3 no frasco de liofilizado



7.3 liofilização em *blister*

Neste caso, o Rotavírus, CaCO_3 e Goma de xantano são liofilizados em conjunto, directamente, no *blister*.



Exemplo 8: Liofilização de estirpes diferentes de Rotavírus

Lote n°	Estirpe de Rotavírus	Composição da formulação	Título viral ao t = zero após a liofilização	Título viral após a liofilização e 1 semana a 37 °C
00F26/01	G1 SB purif n°61 PRO/0232	Sacarose: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2%	$10^{4,6}$	$10^{4,7}$
00F26/02	G2 (DS-1)	Sacarose: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2%	$10^{4,4}$	$10^{4,4}$
00F26/03	G3 (P)	Sacarose: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2%	$10^{4,6}$	$10^{4,5}$
00F26/04	G4 (VA-70)	Sacarose: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2%	$10^{4,8}$	$10^{4,8}$
00F26/05	G9 (W161)	Sacarose: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2%	$10^{4,6}$	$10^{4,5}$

As estirpes DS-1, P e VA70 são descritas como estirpes humanas de Rotavírus de referência para o serotipo G2, G3 e G4 respectivamente, na página 1361 de “Fields” Raven Press 1990, segunda edição.

Nesta experiência, foram liofilizadas diferentes estirpes de Rotavírus.

Para todas, ambos os títulos virais foram mantidos durante a liofilização e foi apresentada uma estabilidade acelerada (uma semana a 37 °C).

Exemplo 9: Estudo de segurança de Fase I em adultos de uma administração oral da vacina de Rotavírus.

Foi efectuado um estudo de Fase I para avaliar a segurança e reactogenecidade de uma dose oral única de $10^{6,0}$ ffu da vacina P43 em adultos saudáveis com idades entre os 18 e os 45 anos.

O ensaio clínico foi duplo cego e aleatório. Foi controlado por placebo e independente. O estudo foi efectuado num único centro na Bélgica.

População em Estudo

Foi recrutado um total de 33 indivíduos, 11 no grupo placebo e 22 no grupo de vacina e todos concluíram o estudo. Todos os voluntários eram Caucasianos. A sua idade média no momento da vacinação era de 35,3 anos, com uma gama de 18 a 44 anos. O ensaio começou em Janeiro e decorreu durante quase um mês.

Material

Vacina

Foram produzidos, purificados, formulados e liofilizados lotes clínicos de P43, de acordo com as Boas Práticas de Fabrico. Os lotes foram liberados por Quality Control and Quality Assurance. Cada frasco da vacina continha os seguintes componentes:

Ingrediente activo:

Estirpe P43

Min. $10^{5,8}$ ffu

Excipientes, estabilizantes:

Sacarose	9 mg
Dextrano	18 mg
Sorbitol	13,5 mg
Aminoácidos	9 mg

Placebo

Foram preparados e liberados frascos de placebo. Cada frasco de placebo continha os seguintes componentes:

Excipientes, estabilizantes:

Sacarose	9 mg
Dextrano	18 mg
Sorbitol	13,5 mg
Aminoácidos	9 mg

Diluyente

Foi utilizada água para injeção como diluyente para reconstituir a vacina e o placebo.

Administração

Aproximadamente 10 a 15 minutos antes da administração da vacina ou do placebo, foram administrados, oralmente, 10 mL de Mylanta® aos indivíduos de ambos os grupos. Mylanta® é um antácido registrado. O antácido aumenta o pH do estômago e previne a inativação do rotavírus durante a sua passagem pelo estômago.

Para preparar a vacina, foram reconstituídos dois frascos de P43 liofilizados contendo $10^{5,8}$ ffu por frasco, com 1,5 mL de água como diluyente diluyente para injeção. Isto atingiu um título viral calculado de $10^{6,1}$ ffu por dose. A vacina reconstituída foi administrada prontamente como uma dose oral única.

Para preparar o placebo, foram reconstituídos dois frascos de placebo liofilizado com 1,5 mL de água para injeção e administrados oralmente como uma dose única.

Segurança e Reactogenicidade

Foram aplicados os seguintes critérios de segurança e reactogenicidade:

Os sintomas gerais solicitados foram febre, diarreia, vômitos, náuseas, dor abdominal e perda de apetite. Estes foram registrados durante oito dias após a administração.

Os sintomas não solicitados foram registrados durante 30 dias após administração.

Os efeitos adversos graves foram registrados durante todo o período de estudo.

As amostras de diarreia são para ser recolhidas durante oito dias após a administração.

Os resultados foram:

Durante os respectivos períodos de observação não foi informado nenhum sintoma solicitado, não solicitado e nenhum acontecimento adverso grave.

Não foi registado nenhum caso de diarreia.

Conclusões

A vacina P43 SB Biologicals foi segura em relação ao placebo quando administrada oralmente, de um modo de dupla ocultação, como uma dose única na dose de $10^{6,1}$ ffu a voluntários adultos saudáveis dos 18 aos 44 anos.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> GlaxosmithKline Biologicals S.A.

<120> Vacina

<130> B45194 Div1

<160> 34

<170> FastSEQ para Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 2350

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 1

atggcttcac	tcattttatag	acaactttctc	actaattcat	attcagtaga	tttacctgat	60
gaaatagagc	aaattggatc	agaaaaaact	cagaatgtaa	ctataaatcc	gggtccattt	120
gcacagacta	gatatgctcc	agtcaattgg	gatcatggag	agataaatga	ttcgactaca	180
gtagaaccaa	ttttagatgg	tccttatcag	ccaactacat	ttactccacc	taatgattat	240
tggatactta	ttaattcaaa	tacaaatgga	gtagtatatg	aaagtacaaa	taatagtgac	300
ttttggactg	cagtcgttgc	tattgaaccg	cacgtcaacc	cagtagatag	acaatatatg	360
atatttggtg	aaagcaagca	atttaattgtg	agtaacgatt	caaataaatg	gaagttttta	420
gaaatgttta	gaagcagtag	tcaaaatgaa	ttttataata	gacgtacatt	aacttctgat	480
accagacttg	taggaatatt	taaatatggg	ggaagagtat	ggacatttca	tggtgaaaca	540
ccgagagcta	ctactgacag	ttcaagtact	gcaaatttaa	ataatatatc	aattacaatt	600
cattcagaat	tttacattat	tccaagggcc	caggaatcta	aatgtaatga	atatattaat	660
aatgggtctg	caccaattca	aaatactaga	aatgtagtgc	cattgccatt	atcatctaga	720
tcgatacagt	ataagagagc	acaagttaat	gaagacatta	tagtttcaaa	aacttcatta	780
tggaaagaaa	tgcagtataa	tagggatatt	ataattagat	ttaaatttgg	taatagtatt	840
gtaaagatgg	gaggactagg	ttataaatgg	tctgaaatat	catataaggc	agcaaattat	900
caatataatt	acttacgtga	cgggtgaaca	gtaaccgcac	acaccacttg	ttcagtaaatt	960
ggagtgaaca	atttttagcta	taatggaggg	tttctaccga	ctgatttttg	tatttcaagg	1020
tatgaagtta	ttaaagagaa	ttcttatgta	tatgtagact	attgggatga	ttcaaaagca	1080
tttagaaata	tggtatatgt	tagatcatta	gcagctaatt	taaattcagt	gaaatgtaca	1140
ggtggaagtt	attattttcag	tataccagta	ggtgcatggc	cagtaatgaa	tggtggcgct	1200
gtttcgttgc	attttgcccg	agttacatta	tccacgcaat	ttactgattt	tgtatcatta	1260
aattcactac	gatttagatt	tagtttgaca	gttgatgaac	cacctttctc	aatactgaga	1320
acacgtacag	tgaatttgta	tggattacca	gccgctaata	caaataatgg	aaatgaatac	1380
tacqaaatat	caggaaggtt	ttcactcatt	tcttttagttc	caactaatga	tgattatcag	1440

actccaatta	tgaattcagt	gacggtaaga	caagatttag	agcgccaact	tactgattta	1500
cgagaagaat	ttaactcatt	gtcacaagaa	atagctatgg	cacaattgat	tgatttagca	1560
ctgttgccct	tagatatgtt	ttccatgttt	tcaggaatta	aaagtacaat	tgatttaact	1620
aaatcaatgg	cgactagtgt	aatgaagaaa	tttagaaaat	caaaattagc	tacatcaatt	1680
tcagaaatga	ctaattcatt	gtcagatgct	gcttcacatc	catcaagaaa	cgtttctatt	1740
agatcgaatt	tatctgcgat	ttcaaattgg	actaatgttt	caaatgatgt	gtcaaacgta	1800
actaattcat	tgaacgatat	ttcaacacaa	acatctacaa	ttagtaagaa	acttagatta	1860
aaagaaatga	ttactcaaac	tgaagggaatg	agctttgacg	acatttcagc	agctgtacta	1920
aaaacaaaaa	tagatatgtc	tactcaaatt	ggaaaaaata	ctttacctga	tatagttaca	1980
gaagcatctg	agaaatttat	tccaaaacga	tcatatcgaa	tattaaagga	tgatgaagta	2040
atggaaatta	atactgaagg	aaaattcttt	gcatacaaaa	ttaatacatt	tgatgaagtg	2100
ccattcgatg	taaataaatt	cgctgaacta	gtaacagatt	ctccagttat	atcagcgata	2160
atcgatttta	agacattgaa	aaattttaaat	gataattatg	gaatcactcg	tacagaagcg	2220
ttaaatttaa	ttaaatcgaa	tccaaatatg	ttacgtaatt	tcattaatca	aaataatcca	2280
attataagga	atagaattga	acagttaata	ctacaatgta	aattgtgaga	acgctattga	2340
ggatgtgacc						2350

<210> 2

<211> 1009

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgtatggct	ttgaatatac	cacaattcta	atctttctga	tatcaattat	tctactcaac	60
tatatattaa	aatcagtaac	tcgaataatg	gactacatta	tatatagatc	tttggttgatt	120
tatgtagcat	tatttgccct	gacaagagct	cagaattatg	ggcttaactt	accaataaca	180
ggatcaatgg	acactgtata	cgctaactct	actcaagaag	gaatatttct	aacatccaca	240
ttatgtttgt	attatccaac	tgaagcaagt	actcaaatta	atgatgggtga	atggaaagac	300
tcattgtcac	aaatgtttct	cacaaaaggt	tggccaacag	gatcagtcct	ttttaaagag	360
tattcaagta	ttgttgattt	ttctgtcgat	ccacaattat	attgtgatta	taacttagta	420
ctaataaagt	atgatcaaaa	tcttgaatta	gatatgtcag	agttagctga	tttaatatgt	480
aatgaatggg	tatgtaatcc	aatggatata	acatttatatt	attatcaaca	atcgggagaa	540
tcaaataagt	ggatatcaat	gggatcatca	tgtactgtga	aagtgtgtcc	actgaatacg	600
caaatgttag	gaatagggtg	tcaaacaaca	aatgtagact	cgtttgaaat	ggttgctgag	660
aatgagaaat	tagctatagt	ggatgtcggt	gatgggataa	atcataaaat	aaatttgaca	720
actacgacat	gtactattcg	aaattgtaag	aagttaggtc	caagagagaa	tgtagctgta	780
atacaagttg	gtggctctaa	tgtattagac	ataacagcag	atccaacgac	taatccacaa	840
actgagagaa	tgatgagagt	gaattggaaa	aaatgggtggc	aagtatttta	tactatagta	900
gattatatta	accaaatcgt	gcaggtaatg	tccaaaagat	caagatcatt	aaattctgca	960
gctttttatt	atagagtata	gatatatctt	agattagatc	gatgtgacc		1009

<210> 3

<211> 28

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 3

ggctttaaaa gagagaattt ccgtctgg 28

<210> 4
<211> 25
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 4
ggtagctcc ttttaatgta tggta 25

<210> 5
<211> 27
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 5
ggtcacatcg aacaattcta atctaag 27

<210> 6
<211> 22
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 6
caagtactca aatcaatgat gg 22

<210> 7
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 7
tgttgattt tctgtcgatc cac 23

<210> 8
<211> 32
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 8
ggttgctgag aatgagaaat tagctatagt gg 32

<210> 9
<211> 32
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 9
ccactatagc taatttctca ttctcagcaa cc 32

<210> 10
<211> 22
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 10
tggttcgcc attttataga ca 22

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 11
atttcggacc atttataacc 20

<210> 12
<211> 22
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 12
tggcttcact catttataga ca 22

<210> 13
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 13
atttcagacc atttataacc tag 23

<210> 14
<211> 29
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 14
ggagtagtat atgaaagtac aaataatag 29

<210> 15
<211> 29
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 15
ctattatttg tactttcata tactactcc 29

<210> 16
<211> 25
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 16
tcgatacagt ataagagagc acaag 25

<210> 17
<211> 27
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 17
ttcattaact tgtgctctct tatactg 27

<210> 18
<211> 22

<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 18
gtatatgtag actattggga tg 22

<210> 19
<211> 22
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 19
catcccaata gtctacatat ac 22

<210> 20
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 20
tgtaactccg gcaaaatgca acg 23

<210> 21
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 21
cggtgcattt tgccggagtt aca 23

<210> 22
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 22
gtaagacaag atttagagcg cca 23

<210> 23
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 23
tggcgctcta aatcttgtct tac 23

<210> 24
<211> 25
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 24
cttgatgctg atgaagcagc atctg 25

<210> 25
<211> 25

<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 25
cagatgctgc tcatcagca tcaag 25

<210> 26
<211> 25
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 26
cgatcatatc gaattattaaa ggatg 25

<210> 27
<211> 25
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 27
catcctttaa tattcgatat gatcg 25

<210> 28
<211> 25
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 28
agcgttcaca caattacat tgtag 25

<210> 29
<211> 32
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 29
agtattttat actatagtag attatattaa tc 32

<210> 30
<211> 32
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 30
agtattttat actatggtag attatattaa tc 32

<210> 31
<211> 25
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 31
atccccatta tactgcattc ctttc 25

<210> 32
<211> 25
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 32
atccctatta tactgcattt ctttc 25

<210> 33
<211> 25
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 33
atccccatta tactgcattt ctttc 25

<210> 34
<211> 25
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 34
atccctatta tactgcattt ctttc 25

Lisboa, 26 de Março de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. Reassociação de rotavírus compreendendo, pelo menos, um antigénio ou, pelo menos, um segmento ou parte de um segmento da variante de rotavírus designada por P43 e depositada com a ECACC sob o número de acesso 99089301, descendentes de rotavírus e seus derivados imunologicamente activos e materiais obtidos a partir destes e em que a referida variante é definida por uma sequência nucleotídica codificando, pelo menos, uma das proteínas virais principais designadas por VP4 e VP7.
2. Reassociação de rotavírus, como reivindicado na reivindicação 1, em que a variante substancialmente simples é uma variante na qual o gene VP4 compreende uma sequência nucleotídica compreendendo, pelo menos, um dos seguintes: uma base adenina (A) na posição 788, uma base adenina (A) na posição 802 e uma base timina (T) na posição 501, a partir do codão de iniciação.
3. Reassociação de rotavírus, de acordo com a reivindicação 2, em que o gene VP4 compreende uma sequência nucleotídica compreendendo uma base adenina (A) nas posições 788 e 802 e uma base timina (T), na posição 501 a partir do codão de iniciação.
4. Reassociação de rotavírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a variante substancialmente simples é uma variante na qual o gene VP7 compreende uma sequência nucleotídica compreendendo, pelo menos, um dos seguintes: uma timina (T) na posição 605, uma adenina (A)

na posição 897 e uma guanina (G) na posição 897 a partir do codão de iniciação.

5. Reassociação de rotavírus, de acordo com a reivindicação 4, em que o gene VP7 compreende uma sequência nucleotídica compreendendo uma timina (T) na posição 605 e uma adenina (A) ou uma guanina (G) na posição 897 a partir do codão de iniciação.
6. Reassociação de rotavírus, de acordo com uma das reivindicações 2 a 5, em que o gene VP4 compreende uma sequência nucleotídica compreendendo uma adenina (A) nas posições 788 e 802 e uma timina (T) na posição 501, a partir do codão de iniciação: e o gene VP7 compreende uma sequência nucleotídica compreendendo uma timina (T) na posição 605 e uma adenina (A) na posição 897 a partir do codão de iniciação.
7. Reassociação de rotavírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, que compreende uma sequência nucleotídica codificando uma proteína VP4, em que a sequência nucleotídica é como apresentado na Figura 1 e/ou uma sequência nucleotídica codificando uma proteína VP7, em que a sequência nucleotídica é como apresentado na Figura 2.
8. Reassociação de rotavírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que o segmento ou segmento parcial codificando para NSP4 é um segmento ou segmento parcial de P43.
9. Composição de vacina, compreendendo um reassociação de rotavírus de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a

8, misturada com um veículo ou adjuvante farmacêutico adequado.

10. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 9, adaptada para administração oral.
11. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 10, na qual a reassociação de rotavírus é formulada com uma composição de antácido.
12. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 11, em que a composição de antácido compreende um antácido orgânico.
13. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 12, em que o antácido é o citrato de sódio.
14. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 11, em que a composição de antácido compreende um antácido inorgânico.
15. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 14, em que o antácido é hidróxido de alumínio.
16. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 14, em que o antácido é o carbonato de cálcio.
17. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 16, que compreende ainda um agente de viscosidade.
18. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 17, em que o agente de viscosidade é goma de xantano.
19. Composição de vacina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 16-18, em que a reassociação de rotavírus é

formulada com carbonato de cálcio e goma de xantano e reconstituída com solução aquosa.

20. Composição de vacina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 19, em que a reassociação de rotavírus é formulada com a composição de antácido e liofilizada numa embalagem de *blister*.
21. Composição de vacina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 20, em que o vírus está na forma liofilizada.
22. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 21, em que a reassociação de rotavírus e a composição de antácido estão presentes em recipientes separados para formulação como uma composição de vacina líquida antes da administração.
23. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 21, em que a reassociação de rotavírus e a composição de antácido estão presentes no mesmo recipiente para formulação como uma composição de vacina liofilizada, para ser reconstituída com solução aquosa antes da administração.
24. Método de preparação de uma vacina de rotavírus compreendendo misturar uma reassociação de rotavírus, como reivindicado em qualquer das reivindicações 1 a 8, com um antácido e um agente de viscosidade.
25. Método de preparação de uma vacina de rotavírus, como reivindicado em qualquer das reivindicações 9 a 23, compreendendo misturar uma reassociação de rotavírus com um veículo ou adjuvante farmacêuticamente adequado.

26. Utilização de uma reassociação de rotavírus na preparação de uma vacina, como reivindicado em qualquer das reivindicações 9 a 23, para a prevenção de infecção por rotavírus num indivíduo humano.
27. Formulação de vacina, como reivindicado em qualquer das reivindicações 9 a 23, para utilização em medicina.

Lisboa, 26 de Março de 2010

FIG 1 Sequência VP4 de P43

ATGGCTTCAC	TCATTTATAG	ACAACTTCTC	ACTAATTCAT	ATTCAGTAGA	50
TTTACATGAT	GAAATAGAGC	AAATTGGATC	AGAAAAAACT	CAGAATGTAA	100
CTATAAATCC	GGGTCCATTT	GCACAGACTA	GATATGCTCC	AGTCAATTGG	150
GATCATGGAG	AGATAAATGA	TTCGACTACA	GTAGAACCAA	TTTTAGATGG	200
TCCTTATCAG	CCAACTACAT	TTACTCCACC	TAATGATTAT	TGGATACTTA	250
TTAATTCAAA	TACAAATGGA	GTAGTATATG	AAAGTACAAA	TAATAGTGAC	300
TTTTGGACTG	CAGTCGTTGC	TATTGAACCG	CACGTCAACC	CAGTAGATAG	350
ACAAATATATG	ATATTTGGTG	AAAGCAAGCA	ATTTAATGTG	AGTAACGATT	400
CAAATAAATG	GAAGTTTTTA	GAAATGTTTA	GAAGCAGTAG	TCAAAATGAA	450
TTTTATAATA	GACGTACATT	AACTTCTGAT	ACCAGACTTG	TAGGAATATT	500
TAAATATGGT	GGAAGAGTAT	GGACATTTCA	TGGTGAAACA	CCGAGAGCTA	550
CTACTGACAG	TTCAAGTACT	GCAAATTTAA	ATAATATATC	AATTACAATT	600
CATTCAGAAT	TTTACATTAT	TCCAAGGTCC	CAGGAATCTA	AATGTAATGA	650
ATATATTAAT	AATGGTCTGC	CACCAATTCA	AAATACTAGA	AATGTAGTTC	700
CATTGCCATT	ATCATCTAGA	TCGATACAGT	ATAAGAGAGC	ACAAGTTAAT	750
GAAGACATTA	TAGTTTCAAA	AACTTCATTA	TGGAAAGAAA	TGCAGTATAA	800
TAGGGATATT	ATAATTAGAT	TTAAATTTGG	TAATAGTATT	GTAAAGATGG	850
GAGGACTAGG	TTATAAATGG	TCTGAAATAT	CATATAAGGC	AGCAAATTAT	900
CAATATAATT	ACTTACGTGA	CGGTGAACAA	GTAACCGCAC	ACACCACTTG	950
TTCAGTAAAT	GGAGTGAACA	ATTTTAGCTA	TAATGGAGGG	TTTCTACCCA	1000
CTGATTTTGG	TATTTCAAGG	TATGAAGTTA	TTAAAGAGAA	TTCTTATGTA	1050
TATGTAGACT	ATTGGGATGA	TTCAAAGCA	TTTAGAAATA	TGGTATATGT	1100
TAGATCATT	GCAGCTAATT	TAAATTCAGT	GAAATGTACA	GGTGGAAGTT	1150
ATTATTTTCAG	TATACCAGTA	GGTGCATGGC	CAGTAATGAA	TGGTGGCGCT	1200
GTTTCGTTGC	ATTTTGCCGG	AGTTACATTA	TCCACGCAAT	TTACTGATTT	1250
TGTATCATT	AATTTCACTAC	GATTTAGATT	TAGTTTGACA	GTTGATGAAC	1300
CACCTTTCTC	AATACTGAGA	ACACGTACAG	TGAATTTGTA	TGGATTACCA	1350
GCCGCTAATC	CAAATAATGG	AAATGAATAC	TACGAAATAT	CAGGAAGGTT	1400
TTCACTCATT	TCTTTAGTTC	CAACTAATGA	TGATTATCAG	ACTCCAATTA	1450
TGAATTCAGT	GACGGTAAGA	CAAGATTTAG	AGCGCCAAC	TACTGATTTA	1500
CGAGAAGAAT	TTAACTCATT	GTCACAAGAA	ATAGCTATGG	CACAATTGAT	1550
TGATTTAGCA	CTGTTGCCTC	TAGATATGTT	TTCCATGTTT	TCAGGAATTA	1600
AAAGTACAAT	TGATTTAACT	AAATCAATGG	CGACTAGTGT	AATGAAGAAA	1650
TTTAGAAAAT	CAAAATTAGC	TACATCAATT	TCAGAAATGA	CTAATTCATT	1700
GTCAGATGCT	GCTTCATCAG	CATCAAGAAA	CGTTTCTATT	AGATCGAATT	1750
TATCTGCGAT	TTCAAATTGG	ACTAATGTTT	CAAATGATGT	GTCAAACGTA	1800
ACTAATTCAT	TGAACGATAT	TTCAACACAA	ACATCTACAA	TTAGTAAGAA	1850
ACTTAGATTA	AAAGAAATGA	TTACTCAAAC	TGAAGGAATG	AGCTTTGACG	1900
ACATTTCAGC	AGCTGTACTA	AAAACAAAAA	TAGATATGTC	TACTCAAATT	1950
GGAAAAAATA	CTTTACCTGA	TATAGTTACA	GAAGCATCTG	AGAAATTTAT	2000
TCCAAAACGA	TCATATCGAA	TATTAAAGGA	TGATGAAGTA	ATGGAAATTA	2050
ATACTGAAGG	AAAAATCTTT	GCATACAAAA	TTAATACATT	TGATGAAGTG	2100
CCATTCGATG	TAAATAAATT	CGCTGAACTA	GTAACAGATT	CTCCAGTTAT	2150
ATCAGCGATA	ATCGATTTTA	AGACATTGAA	AAATTTAAAT	GATAATTATG	2200
GAATCACTCG	TACAGAAGCG	TTAAATTTAA	TTAAATCGAA	TCCAAATATG	2250
TTACGTAATT	TCATTAATCA	AAATAATCCA	ATTATAAGGA	ATAGAATTGA	2300
ACAGTTAATA	CTACAATGTA	AATTGTGAGA	ACGCTATTGA	GGATGTGACC	2350

Fig 2 Sequência VP7 de P43

ATGTATGGTC	TTGAATATAC	CACAATTCTA	ATCTTTCTGA	TATCAATTAT	50
TCTACTCAAC	TATATATTAA	AATCAGTAAC	TCGAATAATG	GACTACATTA	100
TATATAGATC	TTTGTTGATT	TATGTAGCAT	TATTTGCCTT	GACAAGAGCT	150
CAGAATTATG	GGCTTAACTT	ACCAATAACA	GGATCAATGG	ACACTGTATA	200
CGCTAACTCT	ACTCAAGAAG	GAATATTTCT	AACATCCACA	TTATGTTTGT	250
ATTATCCAAC	TGAAGCAAGT	ACTCAAATTA	ATGATGGTGA	ATGGAAAGAC	300
TCATTGTCAC	AAATGTTTCT	CACAAAAGGT	TGGCCAACAG	GATCAGTCTA	350
TTTTAAAGAG	TATTCAAGTA	TTGTTGATTT	TTCTGTCGAT	CCACAATTAT	400
ATTGTGATTA	TAACCTAGTA	CTAATGAAAT	ATGATCAAAA	TCTTGAATTA	450
GATATGTCAG	AGTTAGCTGA	TTTAATATTG	AATGAATGGT	TATGTAATCC	500
AATGGATATA	ACATTATATT	ATTATCAACA	ATCGGGAGAA	TCAAATAAGT	550
GGATATCAAT	GGGATCATCA	TGTACTGTGA	AAGTGTGTCC	ACTGAATACG	600
CAAATGTTAG	GAATAGGTTG	TCAAACAACA	AATGTAGACT	CGTTTGAAAT	650
GGTTGCTGAG	AATGAGAAAT	TAGCTATAGT	GGATGTCGTT	GATGGGATAA	700
ATCATAAAAAT	AAATTTGACA	ACTACGACAT	GTACTATTCT	AAATTGTAAG	750
AAGTTAGGTC	CAAGAGAGAA	TGTAGCTGTA	ATACAAGTTG	GTGGCTCTAA	800
TGTATTAGAC	ATAACAGCAG	ATCCAACGAC	TAATCCACAA	ACTGAGAGAA	850
TGATGAGAGT	GAATTGGAAA	AAATGGTGGC	AAGTATTTTA	TACTATAGTA	900
GATTATATTA	ACCAAATCGT	GCAGGTAATG	TCCAAAAGAT	CAAGATCATT	950
AAATTCTGCA	GCTTTTTTATT	ATAGAGTATA	GATATATCTT	AGATTAGATC	1000
GATGTGACC					