

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2002-522**
(22) Přihlášeno: **15.08.2000**
(30) Právo přednosti: **17.08.1999 GB 9919468**
18.11.1999 GB 9927336
(40) Zveřejněno: **15.05.2002**
(Věstník č. 5/2002)
(47) Uděleno: **18.10.2010**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **24.11.2010**
(Věstník č. 47/2010)
(86) PCT číslo: **PCT/EP2000/007965**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2001/012797**

(11) Číslo dokumentu:

302 173

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)
A61K 39/15 (2006.01)
C12N 7/08 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

US 4 571 385; US 4 341 763.

Midthun K. et al.: „Single gene substitution rotavirus reassortants containing the major neutralization protein (VP7) of human rotavirus serotype 4“, J. Clin. Microbiol., Vol. 24(5), 822-826, 1986; Garbag-Cenon A. et al.: „Reactogenicity and immunogenicity of rotavirus WC3 vaccine in 5-12-month old infants“, Res. Virol., Vol. 140(3), 207-217, 1989.

(73) Majitel patentu:

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S. A.,
Rixensart, BE

(72) Původce:

Colau Brigitte Desiree Alberte, Rixensart, BE
Denamur Francoise, Rixensart, BE
Knott Isabelle, Rixensart, BE
Poliszczak Annick, Rixensart, BE
Thiry Georges, Rixensart, BE
Vande Velde Vincent, Rixensart, BE

(74) Zástupce:

JUDr. Zdeňka Korejzová, Spálená 29, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

Oslabená populace lidského rotaviru

(57) Anotace:

Řešení poskytuje oslabenou populaci rotaviru, obsahující jedinou variantu nebo v podstatě jedinou variantu, která je definována nukleotidovou sekvencí, kódující alespoň jednu z hlavních virových bílkovin, označovanou jako VP4 a VP7. Řešení zvláště poskytuje populaci rotaviru, označovanou jako P43. Řešení dále poskytuje nový prostředek pro rotavirovou vakcínu, který je ve formě rychle se rozpouštějící tablety pro okamžité rozpuštění po vložení do úst.

CZ 302173 B6

Oslabená populace lidského rotaviru

Oblast techniky

5

Vynález se týká nových vakcinačních prostředků, způsobu jejich výroby a jejich použití v léčbě. Zvláště se pak předkládá vynález týká nových rotavirových vakcinačních prostředků.

10

Dosavadní stav techniky

Akutní, infekční průjem je přední příčinou onemocnění a smrti v mnoha světových oblastech. V rozvojových zemích je dopad průměrného onemocnění ohromující. Pro Asii, Afriku a Latinskou Ameriku bylo odhadnuto, že zde existují tři až čtyři biliony případů průjmu každý rok a z těchto případů přibližně pět až 10 milionů končí smrtí (J. A. Walsh se spoluautory, N. Engl. J. Med. 301, 967-974, 1979).

Rotavirus byl rozpoznán jako jedna z nejdůležitějších příčin těžkého průjmu u kojenců a malých dětí (M. K. Estes, Rotaviruses and Their Replication in Fields Virology, 3. vydání, vydáno Fieldsem a spol., Raven Publishers, Philadelphia 1996). Odhaduje se, že rotavirové onemocnění je zodpovědné za více než 1 milion úmrtí ročně. Rotavirem indukovaná nemoc nejběžněji působí na děti mezi 6 a 24 měsíci života a vrcholné rozšíření onemocnění obecně nastává během chladnějších měsíců v umírněném podnebí a během celého roku v tropickém podnebí. Rotaviry se typicky přenášejí z osoby na osobu fekálně orální cestou s inkubační dobou přibližně od 1 do 3 dnů. Oproti infekci u věkové skupiny 6 až 24 měsíců jsou novorozenci obecně bez příznaků nebo mají jen slabší onemocnění. Na rozdíl od těžkého onemocnění s nímž se obvykle střetáváme u malých dětí je většina dospělých chráněna v důsledku předchozí rotavirové infekce, takže většina infekcí u dospělých je mírná nebo bez příznaků (P. A. Offit se spoluautory, Comp. Ther. 8(8), 21-26, 1982).

30

Rotaviry jsou obecně kulovité a jejich název je odvozen od jejich odlišné vnitřní a vnější, nebo dvouplášťové struktury kapsidu. Dvouplášťová kapsidová struktura rotaviru typicky obklopuje vnitřní bílkovinný obal či jádro, obsahující genom. Genom rotaviru se skládá z 11 segmentů dvouvláknové RNA, která kóduje přinejmenším 11 odlišných virových bílkovin. Dvě z těchto virových bílkovin, označované jako VP4 a VP7 jsou uspořádány vně dvouplášťové kapsidové struktury. Vnitřní kapsid rotaviru představuje jedna bílkovina, již je rotavirová bílkovina, označovaná jako VP6. Poměrná důležitost těchto tří konkrétních rotavirových bílkovin ve vyvolání imunitní odpovědi, která následuje po rotavirové infekci, není známa. Přesto však bílkovina VP6 určuje skupinový a podskupinový antigen a bílkoviny VP4 a VP7 jsou determinanty sérotypové specifity.

40

Bílkovinou VP7 je glykoprotein o molekulové hmotnosti $M_w = 38\,000$ (nebo $M_w = 34\,000$, pokud není glykosilován), který je translačním produktem genomického segmentu 7, 8 či 9, v závislosti na kmeni. Tato bílkovina stimuluje následně po infekci rotavirem vytváření hlavních neutralizujících protilátek. Bílkovinou VP4 je neglykosylovaná bílkovina o $M_w =$ přibližně 88 000, která je translačním produktem genomického segmentu 4. Tato bílkovina také po rotavirové infekci stimuluje neutralizující protilátky.

45

Vzhledem k tomu, že bílkoviny VP4 a VP7 jsou virovými bílkovinami, proti nimž jsou namířeny neutralizující protilátky, jsou považovány za prvotní kandidáty pro vývoj rotavirových vakcín, poskytujících ochranu vůči rotavirovým onemocněním.

50

Je známo, že přirozená rotavirová infekce během raného dětství vyvolává ochrannou imunitu. Vakcína na bázi živého oslabeného rotaviru je proto velmi žádoucí. S výhodou by se mělo jednat o orálně podávanou vakcínu, neboť tato cesta je přirozenou cestou infekce virem. Časný vývoj

55

vakcíny k prevenci rotavirových infekcí započal v sedmdesátých letech po objevu viru. Nejprve byly studovány oslabené kmeny od zvířat či lidí a získány byly smíšené výsledky či výsledky přinášející zklamání. Později se úsilí zaměřilo na lidské-zvířecí reasortanty (opětne vytříbené typy) a bylo mnohem úspěšnější.

5

Například v publikaci autorů Midthun et al., J. of Clinical Microbiology, 1986, 24(5): 822–826 se popisovala izolace reasortantů odvozených od koinfekce tkáňových kultur standardními rotaviry rhesus nebo bovinními a lidskými rotaviry několika sérotypů.

10

Rotavirový kmen, známý jako 89–12, byl popsán Wardem, viz patent US 5 474 773 a D. L. Bernsteinem se spoluautory, Vaccine 16(4), 381–387, 1998. Kmen 89–12 byl izolován z podkladového druhu, shromážděného od čtrnáctiletého dítěte s přirozeným rotavirovým onemocněním v roce 1988. Podle patentu US 5 474 773 byl lidský rotavirus HRV 89–12 poté pro kultivaci adaptován dvoutým pasážováním v primárních buňkách opičích ledvin (African Green Monkey Kidney /AGMK/ cells) a čtyřnásobným pasážováním v buňkách MA–104, jak popsal Ward v J. Clin. Microbiol. 19, 748–753, 1984. Poté byl čištěn plakovou metodou, trojnásobně v buňkách MA–104 (do 9. pasážování) a po dvojím přidavném pasážování byl pěstován v těchto buňkách. Jedno přidavné pasážování bylo uskutečněno (12. pasážování) pro uložení v ATCC (American Type Culture Collection, Americké sbírce typů kultur) pod přírůstkovým číslem ATCC VR 2272.

20

Uložený kmen je známý jako 89–12C2.

25

Článek v časopisu Vaccine z roku 1998 Bernsteina a spoluautorů je dále uváděn jako „článek ve Vaccine (1998)“. Tento článek popisuje bezpečnost a imunogenitu orálně podávaného přípravku, aspirujícího na živou vakcínu lidského rotaviru. Tato vakcína byla z kmene 89–12, oslabeného pasážováním bez plakového vyčištění dvacetišestinásobně v primárních AGMK buňkách a poté sedminásobným pasážováním v ustanovené buněčné linii AGMK (celkem 33 pasážování).

25

30

V tomto popisu vynálezu bude výše zmíněný materiál, který byl pravidelně dvacetišestinásobně pasážován, dále označován jako P26 a materiál, který byl pravidelně třiatřicetinasobně pasážován, bude označován jako P33. Obecně bude rotavirus, získaný n–násobným pasážováním kmene 89–12, označován jako Pn.

35

V následujících Příkladech byl materiál P33 dále pětinasobně pasážován ve Vero–buňkách. Ten je pak označen jako P38.

35

Isoláty P26 a P33, popsané v článku ve Vaccine (1989), nebyly uloženy ve sbírce kultur, ani nebyly analyzovány ke stanovení jejich genetické charakterizace.

40

Podstata vynálezu

45

Nyní bylo zjištěno, že populace P26, popsaná v literatuře, zahrnuje směs druhů (variant). To bylo prokázáno genetickou charakterizací, jak je popsáno dále (viz Příklady). P26 tedy není spolehlivě shodnou populací pro další pasážování a zvláště pro výrobu vakcinačních dávek. Podobně P33 zahrnuje směs variant a není spolehlivě shodný pro výrobu vakcinačních dávek.

45

50

Bylo zjištěno, že materiál P26 je směsí alespoň tří variant genu VP4. P33 a P38 jsou podobně směsí dvou variant. Tyto varianty se zdají být, pokud se týká neutralizačních epitopů, antigenně odlišné od kmene 89–12C2, uloženého v ATCC, pokud jsou stanoveny titry neutralizujících protilátek ze séra kojenců, očkovaných pomocí P33 vůči těmto variantám. To je doloženo na Obr. 3 (a–d)

50

55

Dále bylo zjištěno, že pokud je materiál P33 podáván kojencům, jsou replikovány a vylučovány dvě identifikované varianty. Ze 100 očkovaných kojenců jen 2 vykázali známky gastroenteritidy, způsobené rotavirovou infekcí, zatímco ze skupiny, dostávající placebo, bylo infikováno 20 %.

Tato zjištění ukazují, že identifikované varianty jsou asociovány (spojeny) s ochranou vůči rotavirovému onemocnění. Předkládaný vynález poskytuje způsob oddělení rotavirových variant a zlepšenou živou oslabenou rotavirovou vakcínu, získanou z klonovaného (homogenního) lidského kmene rotaviru.

5

Podle prvního aspektu tedy předkládaný vynález poskytuje oslabenou rotavirovou populaci (izolovanou), charakterizovanou tím, že obsahuje jedinou variantu nebo v podstatě jedinou variantu a tato varianta je definována nukleotidovou sekvencí, kódující alespoň jednu z hlavních virových bílkovin, označovaných jako VP4 a VP7.

10

Rotavirová populace podle vynálezu je s výhodou klonovanou variantou.

15

Populací, obsahující jedinou variantu nebo v podstatě jedinou variantu, se míní rotavirová populace, která neobsahuje více než 10 %, lépe obsahuje méně než 5 % a nejlépe méně než 1 % odlišné varianty nebo odlišných variant. Virová populace může být vyčištěna do homogenity (stejnorodosti) nebo v podstatě do homogenity pasážováním na vhodných typech buněk, nebo provedením řady jednoho nebo více kroků klonování.

20

Výhodou tohoto vynálezu je to, že populace, obsahující jedinou variantu, je mnohem vhodnější pro formulaci shodné vakcinační dávky. Za zvýšení účinnosti prevence rotavirové infekce mohou být rovněž asociovány (připojeny) konkrétní varianty, definované svými nukleotidovými sekvencemi, kódujícími hlavní virovou bílkovinu.

25

V jednom upřednostňovaném aspektu jedinou variantou nebo v podstatě jedinou variantou rotavirové populace podle vynálezu je ta varianta, u níž gen VP4 zahrnuje nukleotidovou sekvenci, obsahující alespoň jedno z následujících uspořádání: adeninovou bázi (A) v poloze 788, adeninovou bázi (A) v poloze 802 a thyminovou bázi (T) v poloze 501 od počátečního (startovacího) kodonu.

30

V dalším aspektu jedinou variantou nebo v podstatě jedinou variantou rotavirové populace podle vynálezu je ta varianta, u níž gen VP7 zahrnuje nukleotidovou sekvenci, obsahující alespoň jedno z následujících uspořádání: thymin (T) v poloze 605, adenin (A) v poloze 897 nebo guanin (G) v poloze 897 od počátečního (startovacího) kodonu. Výhodněji je v poloze 897 adenin (A).

35

V upřednostňovaném aspektu má jediná varianta populace podle vynálezu adenin (A) v polohách 788 a 802 a thymin (T) v poloze 501 od počátečního (startovacího) kodonu genové sekvence VP4.

40

V jiném upřednostňovaném aspektu má jediná varianta populace podle vynálezu thymin (T) v poloze 605 a adenin/guanin (A/G) v poloze 897 od počátečního (startovacího) kodonu genové sekvence VP7. Nejvýhodněji je v genové sekvenci VP7 adenin (A) v poloze 897.

45

Ve zvláště upřednostňovaném aspektu má jediná varianta populace podle vynálezu adenin (A) v polohách 788 a 802 a thymin (T) v poloze 501 od počátečního (startovacího) kodonu genové sekvence VP4; thymin (T) pak v poloze 605 a adenin/guanin (A/G) v poloze 897 od počátečního (startovacího) kodonu genové sekvence VP7. Nejvýhodněji je v genové sekvenci VP7 adenin (A) v poloze 897.

50

V jiném aspektu zahrnuje jediná varianta nukleotidovou sekvenci, kódující bílkovinu VP4, kde tato nukleotidová sekvence je stejná jako sekvence uvedená na Obr. 1 a/nebo zahrnuje nukleotidovou sekvenci, kódující bílkovinu VP7, kde tato nukleotidová sekvence je stejná jako sekvence, uvedená na Obr. 2.

55

Předkládaný vynález také poskytuje způsob výroby rotavirové populace, obsahujícího v podstatě jedinou variantu, přičemž tento způsob zahrnuje kroky, v nichž se:

- rotavirový preparát pasážuje ve vhodném buněčném typu;
- volitelně vybere homogenní kultura za použití kroků, v nichž se
 - a) využije limitního zředění; nebo
 - b) využije izolace jednotlivého plaku; a
- 5 – ověří přítomnost v podstatě jediné varianty tak, že se provede sekvenční stanovení příslušní oblasti genové sekvence VP4 a/nebo VP7.

Sekvenční stanovení se může vhodně provádět postupem kvantitativní nebo semikvantitativní hybridizace, jako je hybridizace typu „slot blot“ nebo plaková hybridizace.

10

Zvolenou variantou je s výhodou varianta, která se aplikuje a vylučuje po podání výchozího (startovacího) rotavirového preparátu lidskému subjektu, zejména pak dítěti.

15

Výsledná klonovaná virová populace, vzniklá způsobem podle tohoto vynálezu, může být zmnožena dalším pasážováním ve vhodné buněčné linii.

20

Vhodné buněčné typy pro pasážování rotavirové populace v dříve zmíněném způsobu zahrnují buňky opičích ledvin (AGMK cells, African green monkey kidney cells), kterými mohou být založené buněčné linie nebo prvotní AGMK buňky. Vhodné AGMK buněčné linie zahrnují například linie Vero (ATCC CCL-81), DBS-FRHL-2 (ATCC CL-160), BSC-1 (ECACC 85011422) a CV-1 (ATCC CCL-70). Vhodné jsou také MA-104 (makak rhesus) a MRC-5 (lidské – ATCC CCL-171) buněčné linie. Pro amplifikační účely (zesílení populace) se zvláště upřednostňují buňky Vero. Pasážování v buňkách Vero poskytuje vysoký výtěžek viru.

25

Postupy k ověření, zda ve virové populaci, získané popsáním způsobem, existuje jediná varianta a ke stanovení povahy této jediné varianty zahrnují standardní sekvenční nebo hybridizační postupy, které jsou v oboru známé a jsou zde dále popsány.

30

V upřednostňovaném aspektu se způsob podle vynálezu provádí za použití vhodného rotaviru, zejména rotaviru, majícího charakteristiky kmene 89-12 nebo jeho pasážovaného derivátu.

35

Zvláště upřednostňovanou populací o jediné variantě je P43, která byla získána z P33 (izolovaného lidského rotaviru, pasážovaného třiatřicetinásobně v kultuře na vhodných buněčných typech) sérií klonovacích kroků koncového zředění a následně pasážováním klonovaného materiálu ve Vero buňkách k jeho posílení.

40

Populace P43 byla podle ujednání Budapešťské dohody uložena v Evropské sbírce živočišných buněčných kultur ve Výzkumné a produkční laboratoři vakcín Laboratorní služby veřejného zdraví, v Centru pro aplikovanou mikrobiologii a výzkum (v ECACC, European Collection of Animal Cell Cultures, Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research), v Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, ve Spojeném Království, a to dne 13. srpna 1999 pod ukládacím číslem 99081301.

45

Ačkoli tato uvedená veřejná dostupnost je nejjednodušším způsobem jak získat lidský rotavirus P43, není vcelku nemožné nebo nepravděpodobné, že podobné a funkčně v podstatě totožné rotaviry by mohly být vyrobeny těmito nebo jinými způsoby podle poznatků tohoto vynálezu. Takové funkčně v podstatě totožné rotaviry jsou považovány za biologicky rovnocenné lidskému rotaviru P43 podle tohoto vynálezu a spadají tedy do obecného rozsahu předkládaného vynálezu. Rozumí se tím tedy, že vynález zahrnuje rotavirové populace, mající charakteristiky varianty P43, jak je zde popsána.

50

Rovněž je tedy zřejmé, že vynález zahrnuje materiál, odvozený od uloženého P43 ECACC 99081301 tak, že je podroben dalšímu zpracování, jako je jeho rozmnožování dalším pasážováním, klonováním, nebo jinými postupy, využívajícími živý virus, nebo jakoukoli modifikací P43,

včetně postupů genetického inženýrství nebo opětného vytřídění. Takové kroky a postupy jsou v oboru dobře známé.

5 Materiály, odvozené od P34, které jsou chráněny vynálezem, zahrnují bílkovinný a genetický materiál. Zvláštní pozornost zasluhují reasortní (opětovně vytříděné) rotaviry, které obsahují alespoň jeden antigen nebo alespoň jeden segment P43, například reasortní rotaviry, obsahující virulentní kmen rotaviru, v němž byla jedna část jednoho z 11 genomových segmentů nahrazena genomovým segmentem nebo jeho částí z P43. Vhodné vlastnosti mohou mít zejména reasortní rotaviry, v nichž segmentem nebo částečným segmentem, kódujícím NSP4, je segment nebo
10 částečný segment P43. Reasortní rotaviry a způsoby jejich přípravy jsou dobře známé (viz R. H. Foster a A. J. Wagstaff, Tetravalent Rotavirus Vaccine, souborný článek. AIDS drug evaluation, BioDrugs, Gev 2(2), 155–178, 1998).

15 Zvláště zajímavými materiály jsou potomstvo P43 a imunologicky aktivní deriváty P43. Imunologicky aktivními deriváty se míní materiály, získané z viru P43, zvláště pak antigeny tohoto viru, které jsou schopné vyvolat imunitní odpověď, působící proti rotaviru po jeho injekci do hostitelského zvířete.

20 Při adaptování rotaviru na vhodnou buněčnou linii, například na buňky Vero, může být nezbytné působit na virus tak, aby se zbavil jakékoli znečišťující substance (kontaminantu), kterou mohou být jakákoli nahodilá činidla, která mohou být přítomna a která mohou působit kontaminaci. V případě nahodilých (přidaných) virů, citlivých vůči etheru, se působení může provádět pomocí etheru, jak bude popsáno dále. Předkládaný vynález se také týká zahrnutí takového ovlivnění etherem jako volitelného kroku v celkovém postupu, který slouží k získání oslabeného živého rotaviru nebo vakcíny, která je s ním formulována.
25

Do rozsahu předkládaného vynálezu patří také směsi P43 s jinými variantami rotaviru, například s jinými klonovanými variantami, nebo s jinými viry, zejména s jinými oslabenými viry. Takové směsi se hodí pro vakcíny podle vynálezu, které jsou popsány dále.

30 Předkládaný vynález také poskytuje vakcínu živého oslabeného rotaviru, která zahrnuje populaci v podstatě jediné varianty, smísenou s vhodnou adjuvantní látkou nebo s farmaceutickým nosičem.

35 Rotavirovou vakcínu podle vynálezu je s výhodou monovalentní rotavirová vakcína, obsahující jediný kmen rotaviru.

Předkládaný vynález je zvláště výhodný v tom, že poskytuje vakcínu živého rotaviru, v níž je živoucím oslabeným rotavirem lidský rotavirus a nevyvolává intususcepci.

40 Vhodné farmaceutické nosiče pro použití ve vakcíně podle vynálezu zahrnují ty, které jsou v oboru známé jako vhodné pro orální podání, zvláště pak dětem. Takové nosiče zahrnují, aniž by se na ně omezovaly, cukry, vícesytné alkoholy, aminokyseliny, hydroxid hlinitý, hydroxid hořečnatý, hydroxyapatit, talek, oxid titaničitý, hydroxid železitý, stearat hořečnatý, karboxymethylcelulózu, hydroxypropyl methylcelulózu, mikrokrytalickou celulózu, želatinu, rostlinný pepton, xantan, karagen, arabskou gumu (klovatinu) a β -cyklodextrin.
45

Vynález rovněž poskytuje způsob výroby rotavirové vakcíny, například lyofilizaci viru v přítomnosti vhodných stabilizátorů nebo smísením viru podle vynálezu s vhodnou adjuvantní látkou nebo s farmaceutickým nosičem.
50

Výhodné může být také formulování viru podle vynálezu ve vehikulech (nosných prostředcích) na bázi lipidů, jako jsou virosomy nebo liposomy, v emulzích oleje ve vodě nebo s částicemi nosiče. Ve formulacích mohou být alternativně nebo nádvkem zahrnuty imunostimulátory, jako jsou ty, známé v oboru pro orálně podávané vakcíny. Takové imunostimulátory zahrnují bakte-
55

riální toxiny, zvláště cholerový toxin (CT) ve formě holotoxinu (celé molekuly) nebo pouze řetězce B (CTB) a teplozně labilní enterotoxin z *E. coli* (LT). Mutované LT, které mají menší sklon k přeměně na svou aktivní formu než přírodní LT, jsou popsány ve WO 96/06627, WO 93/13202 a v US 5 182 109.

5

Dalšími imunostimulátory, které mohou být výhodně použity, jsou saponinové deriváty jako je QS21 a monofosforyllipid A, zejména pak 3-de-O-acylovaný monofosforyllipid A (3D-MPL). Vyčištěné saponiny jako orální adjuvantní látky jsou popsány ve WO 98/56415. Saponiny a monofosforyllipid A mohou být použity jednotlivě nebo v kombinaci (viz například WO 94/00153) a mohou být formulovány v adjuvantních systémech společně s jinými činidly. 3D-MPL je dobře známé adjuvans, vyráběné firmou Ribi Immunochem, Montata a jeho výroba je popsána v GB 2 122 204.

10

Obecná diskuse o vehikulech a adjuvantních látkách pro orální imunizaci lze nalézt v publikaci „Vaccine Design, The subunit and Adjuvant Approach“, vyd. Powell a Newman, Plenum Press, New York, 1995.

15

Vynález také poskytuje způsob vakcinace (očkování) lidských subjektů, zvláště kojenců, podáním účinného množství vakcinačního prostředku podle vynálezu subjektu, který to potřebuje. S výhodou se podává živá oslabená vakcína orální cestou.

20

V upřednostňovaném aspektu je vakcinační prostředek podle vynálezu formulován spolu s antacidem pro minimalizování inaktivace vakcíny žaludeční kyselinou. Vhodné antacidové složky zahrnují anorganické antacida jako například hydroxid hlinitý $\text{Al}(\text{OH})_3$ a hydroxid hořečnatý $(\text{Mg}(\text{OH})_2)$. Obchodně dostupné antacida, která jsou vhodná pro použití ve vynálezu, zahrnují přípravek MylantaTM (zaps. značka), který obsahuje hydroxid hlinitý a hydroxid hořečnatý. Ty jsou ve vodě nerozpustné a jsou poskytovány v suspenzi.

25

Hydroxid hlinitý je zvláště upřednostňovanou složkou vakcinačního prostředku podle vynálezu, neboť může poskytovat nejen antacidní působení, ale i adjuvantní účinek.

30

Vhodné pro použití jako antacidní látky ve vakcíně podle předkládaného vynálezu jsou také organická antacida, jako jsou karboxylátové sole organických kyselin. Upřednostňované antacidum ve vakcinačním prostředku podle vynálezu obsahuje karboxylátovou sůl organické kyseliny, s výhodou sůl kyseliny citronové jako je citrát sodný nebo citrát draselný.

35

Zvláště upřednostňované antacidum, které může být použito ve vakcinačním prostředku podle tohoto vynálezu, je nerozpustná anorganická sůl, uhličitán vápenatý (CaCO_3). Uhličitán vápenatý je schopný spojení (asociace) s rotavirem a během spojení s uhličitánem vápenatým je udržována rotavirová aktivita.

40

K prevenci sedimentace uhličitánu vápenatého během kroku plnění jsou v prostředku s výhodou přítomna viskózní činidla.

45

Možná viskózní činidla, která lze použít, zahrnují pseudoplastické přídavné látky. Pseudoplastický roztok je definován jako roztok, mající při stání vyšší viskozitu, než je jeho viskozita při protřepávání. Přídavnými látkami tohoto typu jsou přirozené polymery jako je arabská guma, adragantová guma, agar, algináty, pektiny nebo polosyntetické polymery, jako například karboxymethylcelulóza (Tyloses C[®]), methylcelulóza (Methocels A[®], Viscotrans MC[®], Tylose MH[®] a MB[®]), hydroxypropylcelulóza (Klucels[®]) a hydroxypropylmethylcelulóza (Methocels E[®] a K[®], Viscotrans MPH[®]). Obecně se tyto pseudoplastické pomocné látky používají společně s tixotropními činidly. Jinými viskózními činidly, která je možné použít, jsou pseudoplastické pomocné látky s malou kapacitou toku (tekutosti). Tyto polymery, v dostatečné koncentraci, umožňují vznik uspořádání strukturované tekutiny, výsledkem čehož je roztok o vysoké viskozitě, mající při stání nízkou kapacitu toku. K umožnění toku a převádění je pak potřeba vynaložit určité

50

55

množství energie. K dočasnému zrušení uspořádání strukturované tekutiny pro získání tekutého roztoku jsou potřebné vnější energie (protřepávání). Příklady takových polymerů jsou látky Carbopols[®] a xanthanová guma.

- 5 Tixotropní pomocné látky získají stáním gelovou strukturu, zatímco při protřepávání vytvářejí tekutý roztok. Příklady tixotropních pomocných látek jsou: Veegum[®] (křemičitan hořečnatohlinitý) a Avicel RC[®] (přibližně 89 % mikrokystalické celulózy a 11 % sodné karboxymethylcelulózy).

- 10 Vakcinační prostředek podle předkládaného vynálezu s výhodou obsahuje viskózní činidlo, zvolené z xanthanové gumy nebo škrobu.

Vakcinační prostředek podle předkládaného vynálezu je tedy s výhodou formulován s kombinací uhličitanu vápenatého a xanthanové gumy.

- 15 Ostatní složky prostředku, použitého ve vynálezu, vhodně zahrnují cukry, například sacharózu a/nebo laktózu.

- 20 Vakcinační prostředek podle vynálezu může obsahovat přídatné složky, zahrnující například příchutě (zejména pro orálně podávanou vakcínu) a bakteriostatická činidla.

U vakcinačního prostředku podle vynálezu se předpokládají různé způsoby presentace (předkládání).

- 25 V jednom upřednostňovaném ztělesnění se vakcína podává jako kapalný prostředek. Kapalný prostředek se s výhodou vytváří před podáním alespoň z následujících dvou složek:

- i) virová složka
- ii) kapalná složka

- 30 V tomto ztělesnění jsou virová složka a kapalná složka normálně přítomné v oddělených zásobnících, které výhodně mohou být oddělenými oddíly jediné nádoby, nebo může jít o oddělené nádoby, které mohou být spojeny takovým způsobem, že konečný vakcinační prostředek je rekonstituován (opětne vytvořen) bez jeho vystavení vzduchu.

- 35 Před rekonstituováním může být virus v suché nebo kapalně formě. Virová složka je s výhodou lyofilizována. Lyofilizovaný virus je mnohem stálější než virus ve vodném roztoku. Lyofilizovaný virus může být vhodně rekonstituován za použití kapalného antacidního prostředku k vytvoření kapalného vakcinačního prostředku. Jinou možností je rekonstituce lyofilizovaného viru vodou nebo vodným roztokem a v takovém případě směs lyofilizovaného viru s výhodou obsahuje antacidní složku.

- 40 Vakcinační prostředek s výhodou obsahuje virovou složku, formulovanou s uhličitanem vápenatým a xanthanovou gumou v jednom oddílu nebo nádobě a ta je rekonstituována vodou nebo vodným roztokem, přítomným v druhém oddílu nebo nádobě.

- 45 V jiném upřednostňovaném ztělesnění je vakcinační prostředek prostředkem v pevné formě, s výhodou lyofilizátem, který je vhodný pro okamžité rozpuštění po vložení do úst. Lyofilizované prostředky mohou být výhodně poskytovány ve formě tablet v farmaceutickém balení do blistru.

- 50 V jiném aspektu vynález poskytuje rotavirovou vakcínu ve formě rychle se rozpouštějící tablety pro orální podání.

V jiném aspektu vynález poskytuje prostředek, obsahující živý oslabený kmen rotaviru, zejména kmen lidského rotaviru, přičemž je tento prostředek lyofilizovanou pevnou látkou, schopnou okamžitého rozpuštění po vložení do úst.

- 5 Rychle se rozpouštějící tableta podle vynálezu se v ústech subjektu s výhodou rozpouští dostatečně rychle, aby se předešlo bobtnání nerozpuštěné tablety. Tento přístup je zvláště výhodný pro pediatrické rotavirové vakcíny.

- 10 Virem je s výhodou živý oslabený lidský rotavirus, který je formulován s anorganickým antacidem jako je uhličitán vápenatý a s viskózním činidlem, jako je xanthanová guma.

Dalším aspektem předkládaného vynálezu je poskytnutí lyofilizované formy prostředku, kde virovou složkou je jakýkoli kmen rotaviru, který je formulován s uhličitánem vápenatým a s xanthanovou gumou.

- 15 Vakcíny podle vynálezu mohou být formulovány a podávány známými technikami, za použití vhodného množství živého viru k poskytnutí účinné ochrany vůči rotavirové infekci bez významných vedlejších účinků v typických vakcínách. Vhodným množstvím živého viru bude obvykle množství mezi 10^4 a 10^7 ffu (focus forming units, jednotek, vytvářejících ložisko) na dávku.
- 20 Typická dávka vakcíny může zahrnovat 10^5 a 10^6 ffu na dávku a může se podávat v několika dílčích dávkách během určitého časového období, například ve dvou dílčích dávkách, podávaných ve dvouměsíčním intervalu. Přínosu lze ovšem dosáhnout i rozdělením na více než dvě dávky, například na 3 anebo 4 dávky, zvláště v rozvojových zemích. Interval mezi jednotlivými dávkami by měly být přibližně v délce dvou měsíců. Optimální množství živého viru pro jednu
- 25 dávku nebo pro vícedávkové uspořádání a optimální načasování dávek může být zjištěno standardními studiemi, které zahrnují sledování titrů protilátek a jiných odpovědí, pozorovaných u subjektů.

- 30 Vakcína podle vynálezu může také obsahovat jiné vhodné živé viry pro ochranu vůči jiným onemocněním, například poliovirus. Alternativně mohou být jiné vhodné vakcíny s obsahem živého viru pro orální podávání poskytovány v oddělené dávce, ale při stejné příležitosti jako prostředek rotavirové vakcíny podle vynálezu.

35 Přehled obrázků na výkresech

Popis pro Obr. 3(a–d)

- 40 Séra dvanácti dětí ve stáří 4 až 6 měsíců očkováných materiálem P33, jak je popsán v článku ve *Vaccine* (1998), byla testována vzhledem k neutralizaci P33, P38, P43 a 89–12 C2.

- Rozmezí neutralizačních titrů všech testovaných sér je stejné pro P33, P38 a pro P43. Statistická analýza neukázala žádný statisticky významný rozdíl v celkových neutralizačních titrech vzhledem ke všem těmto třem virům. To ukazuje, že konformační a nekonformační neutralizační epitopy P33, P38 a P43 jsou stejně dobře rozpoznávány anti-P33 séry kojenců, očkovaných pomocí P33. Toto pozorování nepřímě ukazuje, že neutralizační epitopy, odkryté v tomto stanovení *in vitro*, se mezi P33, P38 a P43 nelišily.
- 45

- Rozmezí neutralizačních titrů P89–12 C2 se ovšem od P33, P38 a P43 významně lišilo. Toto pozorování ukazuje, že konformační a nekonformační neutralizační epitopy P33, P38 a P43 nejsou stejně dobře rozpoznávány anti-P33 séry kojenců, očkovaných pomocí P33. Toto pozorování nepřímě ukazuje, že neutralizační epitopy, odkryté v tomto stanovení *in vitro*, se lišily mezi 89–12 C2 a P33, P38 a P43.
- 50

- 55 Následující Příklady ozřejmují vynález.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Prokázání toho, že kmen 89-12 je při pasáži 26 (P26) směsí variant

Sekvenování genů VP4 a VP7 z různých pasážování

Provedeno bylo sekvenování genů VP4 a VP7 z pasáže P26 (primární AGMK buňky), pasáže P33 (zavedená /jako opak primární/ AGMK buněčná linie), pasáže P41 a pasáže P43. Celková extrahovaná DNA byla reversně přepsána a amplifikována (zesílena) v PCR (polymerase chain reaction, polymerázové reakci řetězce) v jedné zkumavce/1 krok.

Primery (startéry) Rota 5bis a Rota 29bis amplifikovaly celý gen VP4 a primery Rota 1 a Rota 2bis amplifikovaly celý gen VP7. Materiál z PCR byl sekvencován za použití různých primerů (viz Tabulka 1).

Sekvence pasáže P26 se lišila od sekvence pasáže P33 třemi bázemi (v polohách 501, 788 a 802 párů bází od startovacího kodonu) u VP4 a třemi bázemi (v polohách 108, 605 a 897 párů bází od startovacího kodonu) u VP7.

Zobrazení (skeny) pasáže P26 genů VP4 a VP7 ukazují ve zmutovaných polohách přítomnost sekvence pasáže P33 jako základu. Z toho je zřejmé, že pasáž P26 je směsí alespoň dvou variant.

Zobrazení (skeny) pasáže P33 vyhlíží homogenně pro VP4 a heterogenně pro VP7 (viz Tabulka 2).

Pasáž P38 (odvozená od pasáže 33) byla pětinasobně pasážována na buňkách Vero a vykazala stejný soubor sekvencí VP4 a VP7 jako pasáž P33 (buněčná linie AGMK). Mezi P33 a P38 tedy nebyly žádné větší změny v populacích.

Tabulka 1: Oligonukleotidy, použité pro RT-PCR a sekvenování

	název	sekvence	poloha
VP7	Rota 1	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG	-49 až -22
	Rota 1bis	GGT TAG CTC CTT TTA ATG TAT GGT A	-16 až 10
	Rota 2bis	GGT TAG CTC CTT TTA ATG TAT GGT A	1014-988
	Rota 7	GGT CAC ATC GGA CAA TTC TAA TCT AAG	266-287
	Rota 12	CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G	372-394
	Rota 46	TGT TGA TTT TTC TGT CGA TCC AC	651-682
	Rota 18	GGT TGC TGA GAA TGA GAA ATT AGC TAT	682-651
		AGT GG	
		CCA CTA TAG CTA ATT TCT CAT TCT CAG	
		CAA CC	

VP4	Rota 5	TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A	2-23
	Rota 6	ATT TCG GACCAT 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

Tabulka 2: oligonukleotidy, použité v hybridizaci

	název	sekvence	poloha
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 ATT ATA CTG CAT TCC TTT C	807-783
	Rota 16	ATC CCT ATT ATA CTG CAT TTC TTT C	807-783
	Rota 35	ATC CCC ATT ATA CTG CAT TTC TTT C	807-783
	Rota 36	ATC CCT ATT ATA CTG CAT TCC TTT C	807-783

- 5 Báze, napsané tučným písmem v Tabulce 2, jsou místy specifických sekvenčních variant ve VP4 a VP7.

Tabulka 3: sekvenační varianty genů VP4 a VP7

10 3.1

VP4				VP7		
	501 pb 167 ak	788 pb 263 ak	802 pb 268 ak	108 pb 36 ak	605 pb 202 ak	897 pb 299 ak
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

pb = páry bází ak = aminokyseliny

- 15 Ve druhém klonu ze tří klonů, které byly rozvinuty na úroveň produkce, je nukleotid v poloze 897 pb na VP7 spíše G než A, jako je zvoleném klonu P43. Výsledkem je v sekvenci aminokyselin přítomnost methioninu na místě isoleucinu. Varianty, odpovídající oběma zvoleným klonům, klonu P43 a klonu, majícímu G v genu VP7 v poloze 897 pb od startovacího kodonu, byly vylučovány stolicí kojenců, kteří byli před tím očkováni materiálem P33.

V Tabulce 3.1, kde jsou v určité poloze uvedeny dvě alternativní báze, představuje první z nich bázi, která se objevuje v hlavní populaci a druhou je báze, která se objevuje u menší části populace. Varianty hlavní populace a menší populace jsou posuzovány podle síly signálu při sekvenování.

Tabulka 3.2

	VP4			VP7		
	501 pb 167 ak	788 pb 263 ak	802 pb 268 ak	108 pb 36 ak	605 pb 202 ak	897 pb 299 ak
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

Tabulka 3.2 znázorňuje změny v aminokyselinách, vyplývající z odlišnosti nukleotidů mezi variantami.

Tabulka 4

	VP4 (polohy 788 - 802)				VP7 (poloha 897)	
	G - G	A - A	A - G	G - A	A	G
sondy	Rota 15	Rota 16	Rota 35	Rota 36	Rota 41	Rota 42
pasáže						
P26	-	+	+	+	nedefin.	nedefin.
P33	-	+	-	-	++	+
P38	-	+	-	-	+	++
P43	-	+	-	-	+	-

Hybridizace typu „slot blot“

Změny v populacích mezi pasážemi P26 až P33 v buňkách AGMK byly dále potvrzeny hybridizací typu „slot blot“. Genové fragmenty VP4 a VP7, vytvořené pomocí RT/PCR, byly hybridizovány oligonukleotidovými sondami, specifickými pro každou variantu (viz Tabulky 3.1 a 3.2). Na rozdíl od pasáže P26, která hybridizovala s Rota 16, Rota 35 a Rota 36 a nikoli s Rota 15, fragment VP4 z PCR materiálu P33 hybridizoval v polohách 788 a 802 pouze s Rota 16 a nikoli buď s Rota 15, nebo s Rota 35 či s Rota 36. Tyto výsledky prokázaly přítomnost alespoň 3 variant v P26 (viz Tabulka 4).

U fragmentu VP7 z PCR materiálu P33 byla poloha 897 hybridizována pomocí Rota 41 a Rota 42. Tyto výsledky potvrdily přítomnost alespoň dvou variant v materiálu P33.

5 Příklad 2: Izolace a charakterizace klonu P43

K izolování složek P33 jako homogenní virové populace byla provedena 3 zředění do koncového bodu (end-point dilution) P33/AGMK v buňkách Vero a výsledný virus byl použit k infikování buněk Vero.

10 Pozitivní jamky byly vybrány za použití dvou kritérií: růstu prokázaného nejvyšším počtem ložisek, objevených v jamkách a nejizolovanějších Pozitivních jamek na destičkách, jak se provádí klasicky. Po třech pasážích zředěním do koncového bodu v devadesátišesti jamkových mikrotitračních destičkách bylo deset Pozitivních jamek postupně amplifikováno (zesíleno) na buňkách Vero a byl vyhodnocen jejich výtěžek.

15 Na základě výtěžku byly tři klony rozvinuty na pasážovací úroveň produkčního množství. Imunitní rozpoznání polyklonálními protilátkami bylo prokázáno jako podobné jak mezi těmito třemi klony, tak i mezi klony a P33. Homogennost klonů byla stanovena hybridizací typu „slot blot“. Konečný výběr jediného kmene byl založen na posouzení výtěžku a sekvence.

20 Vybraný klon byl amplifikován (zesílen) následnými pasážemi v buňkách Vero k vytvoření matečného či kmenového zaočkování (Master seed), pracovního zaočkování (Working seed) a konečně produkčních množství (dávek).

25 Zvolený klon byl geneticky charakterizován na různých úrovních pasážování sekvenováním VP4 a VP7 (identita) a specifickou hybridizací typu „slot blot“ VP4 a VP7 materiálů, amplifikovaných PCR (homogennost). Sekvence genů VP4 a VP7 materiálu P43 jsou uvedeny na obr. 1 a Obr. 2 a jsou identické s P41.

30 Homogennost vybraného kmene byla určena selektivní hybridizací za použití oligonukleotidových sond, rozlišujících nukleotidů změny v oblastech VP4 a/nebo VP7 pro každou variantu, identifikovanou během sekvenování P26/primárních AGMK (viz Tabulka 4).

35 Fragment VP4 byl hybridizován účinkem Rota 16 a nebyl hybridizován účinkem Rota 15, Rota 35 či Rota 36.

Fragment VP4 byl hybridizován účinkem Rota 41 a nebyl hybridizován účinkem Rota 42.

40 Tyto výsledky potvrzují, že P43 je homogenní populace.

Příklad 3: Odstranění případného vedlejšího nahodilého viru

45 K P33 (zralé AGMK) byl přidáván ether do konečné 20% koncentrace po dobu 1 hodiny. Poté byl pomocí N₂ vybubláván ven po dobu 35 minut. Na titr P33 nebyl pozorován žádný dopad.

Příklad 4: Formulování živé oslabené vakcíny

50 Produkční množství, popsaná výše, jsou formulovány pro orální podávání kojencům následující metodou.

1. Lyofilizovaný virus

Pro přípravu virových dávek se používají standardní techniky. Zamražená vyčištěná šarže viru se rozmrazí a naředí se vhodným médiem, v tomto případě podle Dulbecca modifikovaným médiem Eagle, na požadovanou standardní koncentraci viru, v tomto případě $10^{6.2}$ ffu/ml. Naředěný virus se poté dále zředí lyofilizačním stabilizátorem (4% sacharóza, 8% dextran, 6% sorbitol a 4% aminokyselina) až na cílový titr viru, v tomto případě na $10^{5.6}$ ffu/dávku. Alikvotní množství stabilizovaného virového prostředku o objemu 0,5 ml se asepticky přenesou do lahvíček o objemu 3 ml. Každá lahvíčka se částečně uzavře gumovou zátkou, vzorek se lyofilizuje ve vakuu a poté se lahvíčka zcela uzavře a kolem její vrchní části se upevní hliníková čepička, držící zátku na svém místě.

Pro použití se virus rekonstituuje za použití následných antacidních rekonstituentů:

15 (a) citrátový rekonstituent

Citrát sodný se rozpustí ve vodě, sterilizuje se filtrací a asepticky se převede do zásobníků v množství 1,5 ml a koncentraci 544 mg dihydrátu citrátu trojsodného na dávku 1,5 ml. Zásobníky na rekonstituent mohou být například lahvíčky o objemu 3 ml, nebo 4 ml, nebo injekční stříkačky o objemu 2 ml, nebo měkké plastové vymáčkutelné tobolky pro orální podávání. Jinou možností, jak udržet sterilní složky ve sterilních podmínkách, je konečné autoklávování zásobníku.

25 (b) rekonstituent $\text{Al}(\text{OH})_3$

Aseptická suspenze hydroxidu hlinitého (Mylanta, zaps. značka) se asepticky naředí sterilní vodou, asepticky se v množství po 2 ml přenesou do zásobníků rekonstituentu (například do injekčních stříkaček o objemu 2 ml, nebo do měkkých plastových vymáčkutelných tobolek), z nichž každý obsahuje 48 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$. Jinou možností, jak udržet sterilní složky ve sterilních podmínkách, je ozářit suspenzi hydroxidu hlinitého γ -zářením (s výhodou v naředěném stavu).

K prevenci usazování suspenze se začleňují standardní přísady. Takové standardní přísady zahrnují například stearat hořečnatý, karboxymethylcelulózu, hydroxypropylmethylcelulózu, mikrokrystallickou celulózu a silikonové polymery. Začleněna mohou být i bakteriostatická činidla, například butylparaben, propylparaben nebo jiná standardní bakteriostatická činidla, používaná v potravinách a příchutě.

2. Lyofilizovaný virus s $\text{Al}(\text{OH})_3$ v kapalném prostředí

Pro přípravu dávek viru se používají standardní techniky. Zmražená vyčištěná šarže viru se rozmrazí a naředí vhodným médiem, v tomto případě podle Dulbecca modifikovaným médiem Eagle, na požadovanou standardní koncentraci viru, v tomto případě $10^{6.2}$ ffu/ml. Přidá se suspenze hydroxidu hlinitého k dosažení konečného množství 48 mg/dávku a virový prostředek se naředí lyofilizačním stabilizátorem (4% sacharóza, 8% dextran, 6% sorbitol a 4% aminokyselina) až na cílový titr viru, v tomto případě na $10^{5.6}$ ffu/dávku. Alikvotní množství stabilizovaného virového prostředku o objemu 0,5 ml se asepticky přenesou do lahvíček o objemu 3 ml. Lyofilizace a uzavření lahvíček se pak provádí stejným způsobem, jaký je popsán v části 1.

50 3. Lyofilizovaný virus s $\text{Al}(\text{OH})_3$ pro balení do blistrů

Pro přípravu dávek viru se používají standardní techniky. Zmražená vyčištěná šarže viru se rozmrazí a naředí vhodným médiem, v tomto případě podle Dulbecca modifikovaným médiem Eagle, na požadovanou standardní koncentraci viru, v tomto případě $10^{6.2}$ ffu/ml. Přidá se suspenze hydroxidu hlinitého k dosažení konečného množství 48 mg/dávku a virový prostředek se naředí lyofilizačním stabilizátorem, kterým může být sacharóza, dextran nebo aminokyselina

v množství 4 %, nebo želatina či rostlinný pepton, anebo xanthan až na cílový titr viru, v tomto případě na $10^{5,6}$ ffu/dávku. K převodu dávek o objemu 0,5 ml nebo s výhodou menším do prohlubní v blistru se používá aseptického plnění. Prostředek se lyofilizuje a prohlubně blistru se uzavrou tepelným zapečetěním.

K prevenci usazování suspenze hydroxidu hlinitého se volitelně začleňují standardní přísady. Takové standardní přísady zahrnují například stearat hořečnatý, karboxymethylcelulózu, hydroxypropylmethylcelulózu, mikrokrytalickou celulózu a silikonové polymery. Začleněny mohou být i příchutě.

Příklad 5: Virová titrace rotaviru pro různé prostředky

5.1: Srovnání prostředků na základě laktózy a na základě sacharózy

číslo šarže	složení prostředku	virový titr před lyofilizací	virový titr po lyofilizaci a 1 týdnů při 37°C
98G06/01	laktóza: 2 % dextran: 4 % sorbitol: 3 % aminokyseliny: 2 %	$10^{5,22}$	$10^{4,67}$
98G06/03	sacharóza: 2 % dextran: 4 % sorbitol: 3 % aminokyseliny: 2 %	$10^{5,28}$	$10^{4,92}$

Rotavirus P43 byl formulován buď se sacharózou, nebo s laktózou, jak je znázorněno ve výše uvedené tabulce. Titrace viru před lyofilizací je virový titr v kompletní formulované tekutině (obsahující sacharózu, dextran, sorbitol a aminokyseliny), nepodrobené kroku lyofilizace.

Dobré výsledky jsou takové, v nichž je dosaženo $< 0,5$ log snížení v kroku lyofilizace a $< 0,5$ log snížení během „1 týdne při 37 °C“ (urychlený test stability).

Přesnost virové titrace je kolem $\pm 0,2$ log.

Výsledky ukazují, že lze použít sacharózu namísto laktózy.

5.2. Účinek argininu a náhrada sorbitolu manitolem:

číslo šarže	složení prostředku	virový titr v t=0 po lyofilizaci	virový titr po lyofilizaci a 1 týdnů při 37°C
98L16/01	laktóza: 2 % dextran: 4 % sorbitol: 3 % aminokyseliny: 2 %	$10^{4,8}$	$10^{4,8}$
98L16/02	laktóza: 2 % dextran: 4 % sorbitol: 3 % aminokyseliny: 2 % arginin: 3 %	$10^{4,8}$	$10^{4,9}$
98L16/04	laktóza: 2 % dextran: 4 % manitol: 3 % aminokyseliny: 2 % arginin: 3 %	$10^{4,7}$	10^5

5

Výsledky ukazují, že přidavek argininu (o němž je známo, že zlepšuje stálost viru během lyofilizace a rovněž poskytuje zásadité prostředí ke kompenzaci kyselosti žaludku) udržuje virový titr.

10

Sorbitol má sklon příliš značně snižovat teplotu sklovatění lyofilizovaného koláče. To lze překonat použitím manitolu namísto sorbitolu, jak je ukázáno výše a virový titr je zachován.

5.3. Různá složení prostředku

Tento pokus prokazuje, že lze vytvořit větší množství prostředků.

5

číslo šarže	složení prostředku	virový titr před lyofilizací	virový titr po lyofilizaci a 1 týdnů při 37°C
99C11/01	sacharóza: 2 % dextran: 4 % sorbitol: 3 % aminokyseliny: 2 %	$10^{5,24}$	$10^{5,07}$
99C11/02	sacharóza: 2 % dextran: 4 % manitol: 3 % aminokyseliny: 2 %	$10^{5,09}$	$10^{4,92}$
99C11/04	dextran: 4 % manitol: 3 % aminokyseliny: 2 %	$10^{4,89}$	$10^{5,06}$

číslo šarže	složení prostředku	virový titr v t=0 po lyofilizaci	virový titr po lyofilizaci a 1 týdnů při 37 °C
98C17/01	sacharóza: 2 % dextran: 4 % sorbitol: 3 % aminokyseliny: 2 %	$10^{5,40}$	$10^{5,41}$
98C17/02	sacharóza: 2 % dextran: 4 % sorbitol: 1,5 % aminokyseliny: 2 % arginin: 3 %	$10^{5,30}$	$10^{4,93}$
98C17/03	sacharóza: 2 % dextran: 4 % aminokyseliny: 2 %	$10^{5,31}$	$10^{5,24}$

98C17/04	sacharóza: 2 % dextran: 4 % manitol: 3 % aminokyseliny: 2 %	$10^{4,42}$	$10^{4,45}$
98C17/05	sacharóza: 2 % dextran: 4 % manitol: 1,5 % aminokyseliny: 2 %	$10^{4,39}$	$10^{4,40}$
98C17/06	sacharóza: 2 % dextran: 4 % sorbitol: 3 %	$10^{5,44}$	$10^{4,97}$
98C17/07	sacharóza: 2 % dextran: 4 % sorbitol: 1,5 %	$10^{5,11}$	$10^{4,89}$

5.4. Spojení mezi rotavirem a antacidem $\text{Al}(\text{OH})_3$

5

rotavirus	$\text{Al}(\text{OH})_3$	H_2O	doba styku při tepl. místnosti	odstředění	titr vir. supernatantu (ffu/ml)	vir. ti peletu (ffu/ml)
$10^{5,6}$ ffu/ml	48 mg v 0,24 ml	0,76 ml	30 minut	8000 rpm* 10 minut	$10^{3,66}$	
$10^{5,6}$ ffu/ml	48 mg v 0,24 ml	0,76 ml	30 minut	8000 rpm 10 minut	$10^{4,41}$	
$10^{5,6}$ ffu/ml		1 ml	30 minut	8000 rpm 10 minut	$10^{5,68}$	
v lyofiliz. koláči	12 mg v 0,12 ml	1,38 ml	30 minut	8000 rpm 10 minut	pod hranicí detekce	$10^{4,47}$

*rpm = otáčky za minutu

10 $\text{Al}(\text{OH})_3$ se používá jako antacidum. Výsledky ukazují, že rotavirus je asociován (spojen) s nerozpustnou anorganickou solí $\text{Al}(\text{OH})_3$ od doby, kdy je společně s $\text{Al}(\text{OH})_3$ odstředován (snížení virové aktivity v supernatantu).

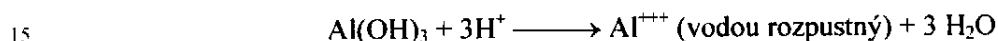
5.5. Rozředění antacida $\text{Al}(\text{OH})_3$ citrátem sodným před titrací viru

vzorky viru	naředění	podmínky	virové titry (ffu/ml)
99B10/06 kapalný prostředek před lyofilizací; $10^{5,43}$	1,5 ml citrátu trojsodného	24 hodin při teplotě místnosti	$10^{5,11}$
99B10/06 lyofilizovaný $10^{5,43}$	1,5 ml citrátu trojsodného	24 hodin při teplotě místnosti	$10^{4,53}$

- 5 Pokud je rotavirus asociován s $\text{Al}(\text{OH})_3$, je možné lyofilizovat vše (včetně $\text{Al}(\text{OH})_3$). Po lyofilizaci je možné zpětně získat rotavirus naředěním $\text{Al}(\text{OH})_3$ citrátem sodným. Tento krok rotavirus nepoškozuje a udržuje jeho aktivitu po tomto kroku naředění.

5.6. Infekčnost rotaviru po uvolnění spojení mezi $\text{Al}(\text{OH})_3$ a rotavirem

- 10 Mechanismus uvolnění viru (naředěním nosiče) může velmi dobře nastat i v podmínkách *in vivo*. Ve skutečnosti se při pH o hodnotě nižší než 6 stává $\text{Al}(\text{OH})_3$ zcela rozpustným a rotavirus tak může být uvolněn do žaludku.

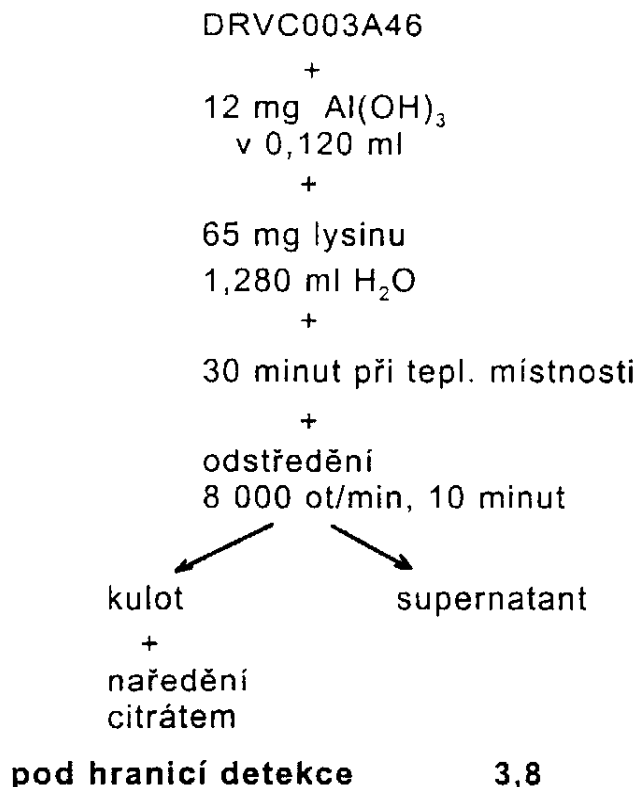


V žaludku se ionty trojmocného hliníku neabsorbují (J. J. Powell, R. Jugdaohsingh a R. P. H. Thompson, The Regulation of mineral adsorption in the gastrointestinal tract, Proceedings of the Nutrition Society 58, 147–153, 1999).

- 20 V tenkém střevě se, vzhledem ke vzrůstu pH, nerozpustné formy hliníku vysrážejí $\text{Al}(\text{OH})_3$ nebo AlPO_4 a eliminují se přirozeným způsobem.

- 25 Není známo, jestli bude nově vzniklá sraženina $\text{Al}(\text{OH})_3$ (nebo AlPO_4) schopna reasociace (opětovného spojení) s rotavirem. To vyvolává otázku účinnosti samotného spojení $\text{Al}(\text{OH})_3$ – rotavirus.

- 30 Možné je rovněž uvolnění rotaviru se spojení $\text{Al}(\text{OH})_3$ – rotavirus jinými mechanismy. Například lysin zasahuje do adsorpce viru na $\text{Al}(\text{OH})_3$. Specifická adsorpce na hydroxid hlinitý je známa i u jiných aniontů, jako je boritanový, síranový, uhličitanový a fosforečný aniont a tedy teoreticky by mělo být možné uvolnit (kompetici a adsorpční místo) rotavirus ze spojení $\text{Al}(\text{OH})_3$ – rotavirus.



Rotavirus tedy může být ze spojení $\text{Al}(\text{OH})_3$ – rotavirus uvolněn a uvolněný rotavirus zůstává aktivní.

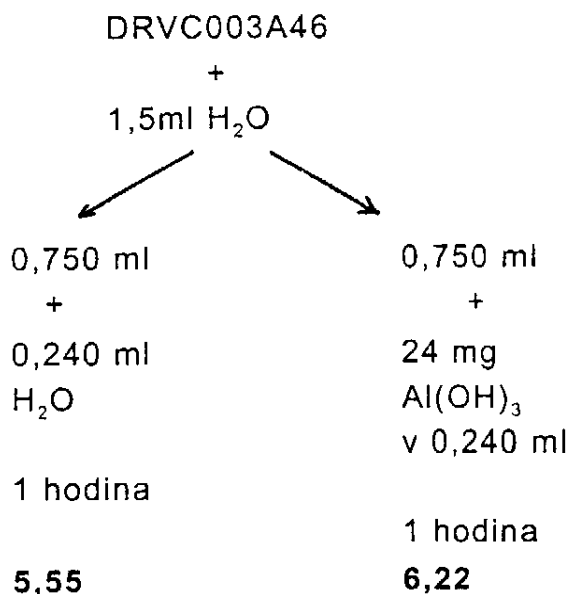
5

Toto uvolnění může být provedeno buď naředěním $\text{Al}(\text{OH})_3$ (HCl v žaludku nebo *in vitro* pomocí trojsodného citrátu), nebo nahražením rotaviru zásaditou aminokyselinou (lysinem).

5.7. Infekčnost spojení $\text{Al}(\text{OH})_3$ – rotavirus

10

Jedna dávka lyofilizovaného rotaviru byla rekonstituována vodou a rozdělena do dvou částí. K první části, považované za srovnávací, byl přidán ještě jeden objem vody. Ke druhé části bylo přidáno 24 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$, suspendovaného v 0,240 ml vody (preklinická titrace viru).



15

Pokud je $\text{Al}(\text{OH})_3$ přítomen, rotavirus je aktivní a hodnota virové titrace je ve srovnání se srovnávacím vzorkem vyšší.

- 5 Tento pokus byl opakován bez rozdělení lyofilizované dávky, přidáním 12 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ nebo 24 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Zde byl srovnávacím vzorkem jeden ze vzorků, rekonstituovaný citrátovo–hydrogenuhličitanovým pufrem. Virový titr je tedy opět vyšší v přítomnosti $\text{Al}(\text{OH})_3$.

10

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

- 15 Stejně jako ve výše uvedeném příkladu se rotavirus spojuje (asociuje) s částicemi $\text{Al}(\text{OH})_3$, neboť virus lze oddělit odstředěním. DRVC003A46 je lyofilizovaný formulovaný rotavirus (sacharóza 2 %, dextran 4 %, sorbitol 3 %, aminokyseliny 2 %).

DRVC003A46		DRVC003A46	
+		+	
12 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ v 0,120 ml		24 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ v 0,240 ml	
+		+	
1,380 ml H_2O		1,260 ml H_2O	
+		+	
odstředění 8 000 ot./min 10 minut		odstředění 8 000 ot./min 10 minut	
kulot	supernatant	kulot	supernatant
+		+	
1,5 ml SDSAA		1,5 ml SDSAA	
5,78	<1,44	5,92	<1,44
5,96	<1,44	6,11	<1,44

SDSAA = 2 % sacharóza, 4 % dextran, 3 % sorbitol, 2 % aminokyseliny

- 5 Podle virové titrace prováděné v supernatantu se zdá, že množství $\text{Al}(\text{OH})_3$, potřebné k adsorbování rotaviru, je malé (počínaje jednou lyofilizovanou dávkou 5,7 log) za zvyšování virové titrace:

Al(OH) ₃	adsorpční doba	titr v supernatantu
12 mg	1 hodina při tepl. místnosti	2,7
24 mg	1 hodina při tepl. místnosti	3,4
48 mg	1 hodina při tepl. místnosti	3,4
72 mg	1 hodina při tepl. místnosti	2,0
96 mg	1 hodina při tepl. místnosti	pod hranicí detekce
12 mg	přes noc	2,7
24 mg	přes noc	pod hranicí detekce
48 mg	přes noc	2,5
12 mg	okamžitě	pod hranicí detekce
24 mg	okamžitě	2,0
48 mg	okamžitě	pod hranicí detekce

Doba, potřebná k adsorpci rotaviru na Al(OH)₃ se zdá být krátká.

- 5 Jedna dávka lyofilizovaného rotaviru byla rekonstituována v přítomnosti 24 mg Al(OH)₃ a odstředěna po 0, 15, 60 minutách a po 24 hodinách. Kulot byl resuspendován v SDSAA před titrací viru:

doba	kulot	supernatant
0 min	5,26	3,17
15 min	5,34	< 1,44
60 min	5,96	< 1,44
24 h	6,13	< 1,44

10

5.8 Použití CaCO₃ jako antacidu

K vyloučení přítomnosti hliníku z vakcíny byl antacid Al(OH)₃ nahrazen jinou nerozpustnou anorganickou solí: uhličitanem vápenatým CaCO₃.

15

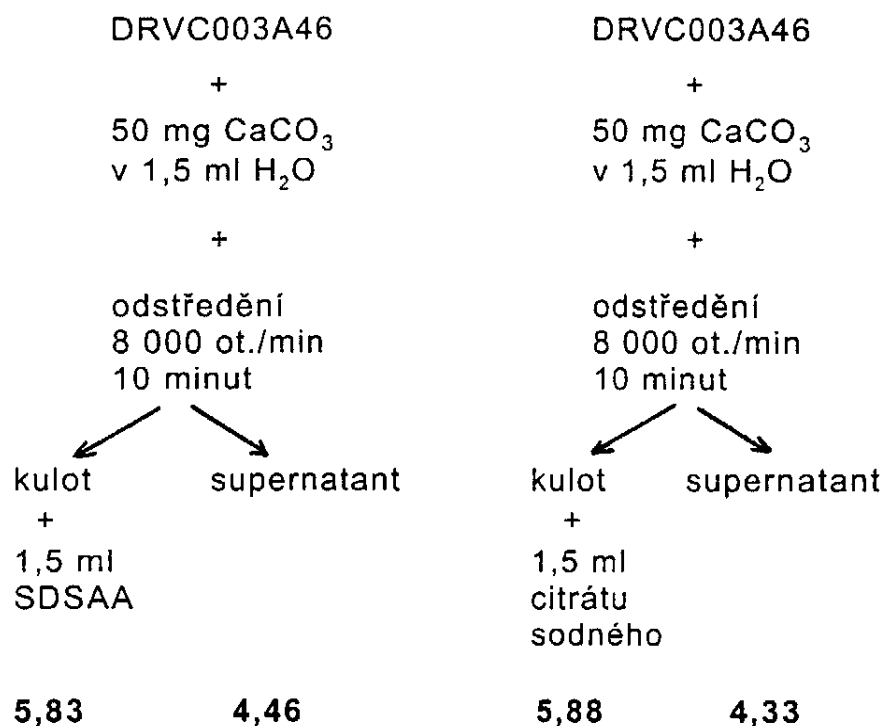
Jevy, pozorované za přítomnosti CaCO₃ jsou obdobné jevům, popsaným za použití Al(OH)₃:

- asociace (spojení) rotaviru s anorganickou solí;
- udržení aktivity rotaviru při jeho asociaci s anorganickou solí;
- možnost uvolnění rotaviru z asociace rozpuštěním anorganické zásady kyselinou;
- možnost společné lyofilizace antacidu a rotaviru.

5

Asociace CaCO_3 a rotaviru

10 V prvním zkušebním vzorku byl lyofilizovaný rotavirus (virový titr 5,7) rekonstituován suspenzí CaCO_3 ve vodě (50 mg v 1,5 ml); poté byl odstředěn a virový titr supernatantu byl srovnán s kulotem.

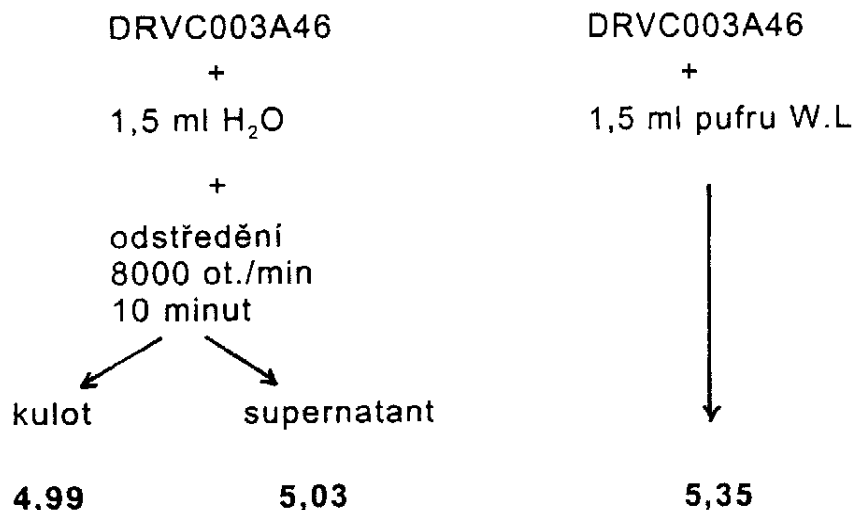


Tyto výsledky ukazují, že více než 90 % rotaviru je asociováno s CaCO_3 .

15

Rovněž po asociaci viru bylo možné uskutečnit titraci a znovu získat původní množství viru.

Také virové titry byly poněkud vyšší než titry, získané bez přítomnosti CaCO_3 .



Množství CaCO₃ a asociace rotaviru

- 5 Lyofilizovaný rotavirus byl rekonstituován suspenzí CaCO₃ ve vodě (1,5 ml):

10 mg

50 mg

100 mg

a poté odstředěn; virový titr supernatantu byl srovnán s kulotem.

10

CaCO ₃	přípr. dle popisu a odstředění		1 hodina + odstředění	
	kuloty	supernatant	kuloty	supernatant
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

- 15 Je zřejmé, že s rostoucím množstvím CaCO₃ se asociuje více viru a méně se nalézá v supernatantu. Ovšem plná dávka není zcela získána (očekávané množství přinejmenším 5,3 nebo dokonce 5,8 jak bylo získáno dříve – viz výše).

Ochrana rotaviru pomocí CaCO₃ během titrace antacidu typu „mini Rossett–Rice“

- 20 Za použití deseti dávek lyofilizovaného rotaviru (DRVC003A46) a 50 mg CaCO₃ byly provedeny dva typy titrace „mini Rossett–Rice“:

V klasické titraci „Rossett–Rice“ se antacid smísí s rotavirem a do tohoto média se vlije HCl.

- 25 V „inversní“ mini titraci Rossett–Rice je situace opačná: antacid se přikapává do zásobní HCl (jak k tomu dochází *in vivo*).

klasická mini titrace Rossett-Rice			
lyofiliz. Rota, skladování při:	pufr	teoretický virový titr	naměřený virový titr
4 °C	60 mg CaCO ₃	5,3	4,6
-80 °C	60 mg CaCO ₃	5,3	4,6
4 °C	24 mg Al(OH) ₃	5,4	< 2,9
-80 °C	24 mg Al(OH) ₃	5,4	< 2,9

inversní mini titrace Rossett-Rice			
lyofiliz. Rota, skladování při:	pufr	teoretický virový titr	naměřený virový titr
4 °C	60 mg CaCO ₃	5,3	4,6
-80 °C	60 mg CaCO ₃	5,3	4,6
4 °C	24 mg Al(OH) ₃	5,4	< 2,9
-80 °C	24 mg Al(OH) ₃	5,4	< 2,9

- 5 V tomto pokusu v uspořádání *in vivo* je tedy uhličitán vápenatý schopný chránit přibližně 20 % rotaviru před přítomností HCl, zatímco hydroxid hlinitý toho schopen není.

5.9: Lyofilizace rotaviru v přítomnosti antacidu CaCO_3 :

číslo šarže	složení prostředku	virový titr v $t=0$ po lyofilizaci	virový titr po lyofilizaci a 1 týdnů při 37°C
99K08/01	sacharóza: 2% dextran: 4 % sorbitol: 3% aminokyseliny: 2 % CaCO_3 : 50 mg	$10^{5,28}$	$10^{5,10}$
99K08/02	sacharóza: 2% dextran: 4 % sorbitol: 3 % aminokyseliny: 2 % CaCO_3 : 60 mg	$10^{5,16}$	$10^{5,15}$
00C24/01	sacharóza: 2% dextran: 4 % sorbitol: 3 % aminokyseliny: 2 % CaCO_3 : 60 mg xanthan: 0,3 %	$10^{5,07}$	$10^{4,69}$
00C24/03	sacharóza: 2% dextran: 4 % sorbitol: 3 % aminokyseliny: 2 % CaCO_3 : 60 mg xanthan: 0,3%	$10^{5,07}$	$10^{4,85}$
00E09/25	sacharóza: 2% dextran: 4 % sorbitol: 3 % aminokyseliny: 2 % CaCO_3 : 60 mg xanthan: 0,25 %	$10^{5,03}$	$10^{4,91}$

00E09/30	sacharóza: 2% dextran: 4 % sorbitol: 3 % aminokyseliny: 2 % CaCO ₃ : 60 mg xanthan: 0,3%	10 ^{5,01}	10 ^{4,87}
00F26/06	sacharóza: 2% dextran: 4 % sorbitol: 3 % aminokyseliny: 2 % CaCO ₃ : 60 mg škrob: 2 %	10 ^{4,50}	10 ^{4,70}

- 5 Zde se jedná o uspořádání „vše v jednom“ – lyofilizace rotaviru a antacidu CaCO₃ společně v jedné lahvičce. K prevenci usazování CaCO₃ během kroku plnění jsou potřeba viskózní činidla. Příklady takových viskózních činidel zahrnují xanthanovou gumu a škrob. Aktivita rotaviru je uchovávána i v přítomnosti xanthanové gumy a škrobu.

5.10. Lyofilizované tablety pro rychlý rozpad po vložení do úst:

- 10 Následující prostředky dokládají koncept „lyoc“, což je rychlé rozpuštění lyofilizovaného koláče v ústech.

č. šarže	složení prostředku	virový titr před lyofilizací	virový titr po lyofilizaci a 1 týdnů při 37 °C
99B10/06	sacharóza: 4% glutamát Na: 3,7 % Al(OH) ₃ : 48 mg	10 ^{5,11}	10 ^{4,53}
99C11/12	maltitol: 3% Al(OH) ₃ : 48 mg hydroxypropylmethyl celulóza: 1 %	10 ^{4,16}	10 ^{3,79}

číslo šarže	složení prostředku	virový titr v t=0 po lyofilizaci	virový titr po lyofilizaci a 1 týdnů při 37 °C
00C24/05	sacharóza: 2% dextran: 4 % sorbitol: 3% aminokyseliny: 2 % CaCO ₃ : 60 mg xanthan: 0,3 %	10 ^{5,02}	10 ^{4,54}
00C24/06	sacharóza: 2% dextran: 4 % sorbitol: 3 % aminokyseliny: 2 % CaCO ₃ : 60 mg xanthan: 0,3 %	10 ^{4,86}	10 ^{4,56}
00F26/11	sacharóza: 1% dextran: 2 % sorbitol: 1,5 % aminokyseliny: 1 % CaCO ₃ : 60 mg škrob: 2 %	10 ^{4,70}	10 ^{4,40}

V „konceptu lyoc“ je možné použít jak škrob, tak i xanthanovou gumu (za udržení rychlého rozpouštění lyofilizovaného koláče).

5

Příklad 6: Použití uhličitanu vápenatého jako antacida pro rotavirový vakcinační prostředek

Pokud se jako antacidum pro rotavirus použije suspenze CaCO₃ ve vodě, objevuje se problém, že částice uhličitanu vápenatého se ve vodě rychleji usazují, neboť hodnota hustoty prášku se blíží 2,6 a průměrná velikost částic činí 30 µm.

10

Toto usazování lze zpomalit:

15

1. Zvýšením hustoty okolního média.
2. Zvýšením viskozity okolního média.
3. Snížením velikosti částic.
4. udržováním částic oddělené od sebe navzájem.

6.1. Zvýšení hustoty okolního média

Pokud se na lyofilizovaný koláč (obsahující 2% sacharózu, 4% dextran, 3% sorbitol a 2% aminokyseliny) nanese suspenze CaCO_3 ve vodě (umístěná v injekční stříkačce), zvýší se hustota okolního média, ovšem rychlost usazování CaCO_3 se příliš neliší od suspenze CaCO_3 ve vodě.

6.2. Zvýšení viskozity okolního média

Pseudoplastické pomocné látky

Pseudoplastický roztok je definován jako roztok, mající vyšší viskozitu při stání než viskozitu při protřepávání.

Obvyklými pomocnými látkami tohoto typu jsou:

– přírodní polymery, například:

arabská guma
adragantová guma
agar
algináty
pektiny

– polosyntetické polymery, například:

karboxymethylcelulóza (Tyloses C[®])
methylcelulóza (Methocels A[®], Viscotrans MC[®], Tylose MH[®] a MB[®])
hydroxypropylcelulóza (Klucels[®])
hydroxypropylmethylcelulóza (Methocels E[®] a K[®], Viscotrans MPH[®])

Obecně se tyto pseudoplastické pomocné látky používají společně s tixotropními činidly.

Pseudoplastické pomocné látky s nízkou kapacitou tekutosti

Takové polymery, v dostatečné koncentraci, umožňují vznik uspořádání strukturované tekutiny, výsledkem čehož je roztok o vysoké viskozitě, mající při stání nízkou kapacitu tekutosti. K umožnění toku a převádění je pak potřeba vynaložit určité množství energie.

K dočasnému zrušení uspořádání strukturované tekutiny pro získání tekutého roztoku jsou potřebné vnější energie (protřepávání).

Příklady takových polymerů jsou látky Carbopols[®] a xanthanová guma.

Tixotropní pomocné látky

S těmito pomocnými látkami se stáním získá gelová struktura, zatímco při protřepávání se získá tekutý roztok.

Příklady tixotropních pomocných látek jsou: Veegum[®] (křemičitan hořečnatohlinitý) a Avicel RC[®] (přibližně 89 % mikrokrytalické celulózy a 11 % sodné karboxymethylcelulózy).

6.3. Snížení velikosti částic

Výsledkem snížení velikosti částic CaCO_3 je snížení antacidní kapacity sloučeniny.

6.4. Udržování částic odděleně od sebe navzájem

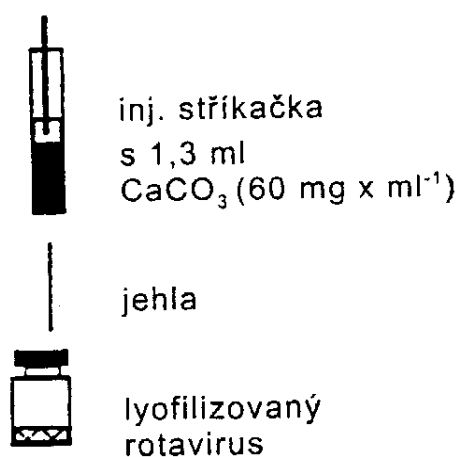
5 To je případ látek Veegum® a Avicel®, u nichž jsou nerozpustné částice (přibližně o rozměru 1 mm), menší než částice CaCO_3 , umístěny mezi částice CaCO_3 k prevenci agregace (vytváření sraženin).

Příklad 7: Vzhled výrobku

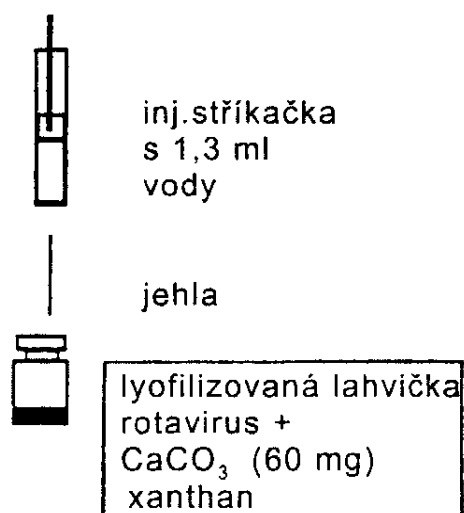
10 Následující schémata dokládají příklady možných vzhledů výrobku

7.1. CaCO_3 v injekční stříkačce

15 Poté, co byly klinické šarže rotaviru umístěny do lyofilizovaných lahviček, lze antacid umístit do kapalného rekonstituentu, obsaženého v injekčních stříkačkách.



20 U tohoto předkládání produktu musí být usazování CaCO_3 pod kontrolou nejen během kroků plnění, ale i během celé doby skladování produktu (alespoň 2 roky).

7.2. CaCO_3 v lyofilizované lahvičce

7.3. Lyofilizace v blistru

V tomto případě se rotavirus, CaCO_3 a xanthanová guma lyofilizují společně přímo v blistru.

5

Příklad 8:

Lyofilizace různých kmenů rotaviru

č.šarže	kmen rotaviru	složení prostředku	virový titr v $t=0$ po lyofilizaci	virový titr po lyofilizaci a 1 týdnu při 37 °C
00F26/01	G1 SB vyčišť.č. 61 PRO/0232	sacharóza: 2% dextran: 4 % sorbitol: 3% aminokyseliny: 2 %	$10^{4,6}$	$10^{4,7}$
00F26/02	G2 (DS-1)	sacharóza: 2% dextran: 4 % sorbitol: 3 % aminokyseliny: 2 %	$10^{4,4}$	$10^{4,4}$

10

Kmeny DS-1, P a VA70 jsou popsány jako srovnávací kmeny lidského rotaviru pro sérotyp G2, G3 a G4 na straně 1361 ve „Fields“, Raven Press 1990, druhé vydání.

15

V tomto pokusu byly lyofilizovány různé kmeny rotaviru.

Bylo ukázáno, že u všech šarží byly jak virový titr, tak i stálost za urychlených podmínek (1 týden při 37 °C) během lyofilizace udržovány.

20

Příklad 9: Fáze I bezpečnostní studie orálního podání jedné dávky rotavirové vakcíny u dospělých

25

Fáze I této studie byla prováděna ke stanovení bezpečnosti a reaktivnosti jedné orálně podávané dávky $10^{6,0}$ ffu vakcíny P43 zdravým dospělým lidem ve věku 18 až 45 let.

Klinický test byl dvojité slepý a randomizovaný (na základě náhodnosti). Byl kontrolován placebem a samostatný. Studie byla prováděna v jediném centru v Belgii.

30

Studovaná populace

35

Přihlášeno bylo celkem 33 subjektů, 11 ve skupině dostávající placebo a 22 ve skupině, dostávající vakcínu a všichni studii dokončili. Veškerí dobrovolníci byli běloši. Jejich průměrný věk v době vakcinace byl 35,3 roky, v rozmezí od 18 do 44 let. Test započal v lednu a probíhal po dobu právě jednoho měsíce.

Materiál

Vakcína

- 5 Vyrobená byla klinická množství vakcíny P43, která byla vyčištěna, formulována a lyofilizována podle zásad Správné výrobní praxe (Good Manufacturing Practices). Množství byla podrobena Kvalitativní kontrole a získala Záruku kvality. Každá lahvička vakcíny obsahovala následující složky:

10 aktivní přísada:

kmen P43 minimálně $10^{5,8}$ ffu

pomocné látky, stabilizátory:

- sacharóza 9 mg
 15 dextran 18 mg
 sorbitol 13,5 mg
 aminokyseliny 9 mg

placebo

- 20 Vyrobeny a poskytnuty byly lahvičky s obsahem placebo, přičemž každá z nich obsahovala následující složky:

pomocné látky, stabilizátory:

- 25 sacharóza 9 mg
 dextran 18 mg
 sorbitol 13,5 mg
 aminokyseliny 9 mg

30 Ředidlo

Jako ředidlo k rekonstituování vakcíny a placebo byla použita voda pro injekce.

Podávání

- 35 Přibližně 10 až 15 minut před podáním vakcíny nebo placebo dostaly subjekty v obou skupinách orálně 10 ml přípravku Mylanta®. Mylanta® je zapsaný (registrovaný) antacid. Antacid zvyšuje pH v žaludku a předchází inaktivaci rotaviru během jeho průchodu žaludkem.

- 40 K přípravě vakcíny byly dvě lahvičky lyofilizovaného P43, obsahující $10^{5,8}$ ffu na lahvičku, rekonstituovány 1,5 ml ředící vody pro injekce. Tím bylo dosaženo vypočítaného virového titru $10^{6,1}$ ffu na dávku. Rekonstituovaná vakcína byla ihned podávána v jedné orální dávce.

- 45 K přípravě placebo byly dvě lahvičky lyofilizovaného placebo rekonstituovány 1,5 ml vodou pro injekce a podávány orálně jako jedna dávka.

Bezpečnost a reaktivita

Použita byla následující kritéria bezpečnosti a reaktivnosti:

- 50 – Obecnými navozenými příznaky byly horečka, průjem, zvracení, nevolnost, bolesti břicha a ztráta chuti k jídlu. Byly zaznamenávány během osmi dnů po podání.
 – Nenavozené příznaky byly zaznamenávány během 30 dnů po podání.

- Vážné vedlejší účinky byly zaznamenávány během celého období průběhu studie.
- Vzorky průjmu bylo třeba shromažďovat osmi dnů po podání.

Výsledky byly následující:

Během jednotlivých sledovaných období nebyly zaznamenány žádné navozené příznaky, žádné nenavozené příznaky ani žádné vážné vedlejší účinky.

Nebyly zaznamenány žádné případy průjmu.

Závěry:

Vakcína SB Biologicals P43 byla bezpečná ve srovnání s placebem při podání orální cestou ve dvojité slepém uspořádání v podobě jedné dávky a v dávce $10^{6,1}$ ffu zdravým dospělým dobrovolníkům ve věku 18 až 44 let.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Oslabená populace lidského rotaviru, **vyznačující se tím**, že zahrnuje jedinou variantu nebo v podstatě jedinou variantu, přičemž uvedená varianta je definována nukleotidovou sekvencí, kódující alespoň jednu z hlavních virových bílkovin, označovanou jako VP4 a VP7.

2. Populace rotaviru podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že je klonovaným kmenem.

3. Populace rotaviru podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že je odvozena od infekce lidského rotaviru.

4. Populace rotaviru podle kteréhokoli z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že se replikuje u lidí a je jimi vylučována.

5. Populace rotaviru podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že v podstatě jedinou variantou je varianta, v níž gen VP4 zahrnuje nukleotidovou sekvenci, obsahující alespoň jednu z následujících bází: adeninovou bázi A v poloze 788, adeninovou bázi A v poloze 802 a thyminovou bázi T v poloze 501 od startovacího kodonu.

6. Populace rotaviru podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že gen VP4 zahrnuje nukleotidovou sekvenci, obsahující adeninovou bázi A v polohách 788 a 802 a thyminovou bázi T v poloze 501 od startovacího kodonu.

7. Populace rotaviru podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že v podstatě jedinou variantou je varianta, ve které gen VP7 zahrnuje nukleotidovou sekvenci, obsahující alespoň jednu z následujících bází: thymin T v poloze 605, adenin A v poloze 897 a guanin G v poloze 897 od startovacího kodonu.

8. Populace rotaviru podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že gen VP7 zahrnuje nukleotidovou sekvenci, obsahující thymin T v poloze 605 a adenin A nebo guanin G v poloze 897 od startovacího kodonu.

9. Populace rotaviru podle nároků 5 až 8, **vyznačující se tím**, že gen VP4 zahrnuje nukleotidovou sekvenci, obsahující adenin A v polohách 788 a 802 a thymin T v poloze 501 od

startovacího kodonu; a gen VP7 zahrnuje nukleotidovou sekvenci, obsahující thymin T v poloze 605 a adenin A v poloze 897 od startovacího kodonu.

5 10. Rotavirus, **vyznačující se tím**, že obsahuje nukleotidovou sekvenci, kódující bílkovinu VP4, kde nukleotidová sekvence odpovídá obr. 1 a/nebo nukleotidovou sekvenci, kódující bílkovinu VP7, kde nukleotidová sekvence odpovídá obr. 2.

10 11. Populace rotaviru podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, **vyznačující se tím**, že je označována jako P43 a je uložena pod přírůstkovým číslem ECACC 99081301.

12. Varianta rotaviru označovaná P43 a uložená v Evropské sbírce živočišných buněčných kultur pod přírůstkovým číslem 99081301, potomstvo rotaviru a imunologicky aktivní deriváty rotaviru a materiály z něho získané.

15 13. Rotavirový reasortant, **vyznačující se tím**, že obsahuje alespoň jeden antigen, nebo alespoň jeden segment rotavirové varianty P43 podle nároku 11 nebo nároku 12.

14. Způsob výroby vyčištěné lidské rotavirové populace, zahrnující v podstatě jedinou variantu, **vyznačující se tím**, že zahrnuje kroky v nichž se:
20 pasáže rotavirový preparát na vhodné buněčné linii;
volitelně zvolí homogenní kultura za použití kroků buď;
limitního zředění; nebo
izolace jednotlivého plaku; a
25 ověří přítomnost v podstatě jediné varianty sekvenováním vhodné oblasti genové sekvence VP4 a/nebo VP7.

15. Způsob podle nároku 14, **vyznačující se tím**, že se rotavirový preparát pasáže na primárních buňkách opičích ledvin AGMK.

30 16. Způsob podle nároku 14 nebo 15, **vyznačující se tím**, že rotavirový preparát má charakteristiky kmene 89-12, nebo jeho derivátu.

17. Způsob podle kteréhokoli z nároků 14 až 16, **vyznačující se tím**, že zahrnuje
35 přidavný krok působení etherem k odstranění nahodilých kontaminujících činidel, citlivých vůči etheru.

18. Vakcinační prostředek, **vyznačující se tím**, že obsahuje živý oslabený virus podle kteréhokoliv z nároků 1 až 13, smíseným s vhodným farmaceutickým nosičem nebo s adjuvans.
40

19. Vakcinační prostředek podle nároku 18, **vyznačující se tím**, že je upravený pro orální podávání.

20. Vakcinační prostředek podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že živý oslabený virus je formulován s antacidním prostředkem.
45

21. Vakcinační prostředek podle nároku 20, **vyznačující se tím**, že antacidní prostředek zahrnuje organický antacid.

50 22. Vakcinační prostředek podle nároku 21, **vyznačující se tím**, že antacidem je citrát sodný.

23. Vakcinační prostředek podle nároku 20, **vyznačující se tím**, že antacidní prostředek zahrnuje anorganický antacid.

24. Vakcinační prostředek podle nároku 23, **vyznačující se tím**, že antacidem je hydroxid hlinitý.
- 5 25. Vakcinační prostředek podle nároku 23, **vyznačující se tím**, že antacidem je uhličitán vápenatý.
26. Vakcinační prostředek podle nároku 25, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje viskózní činidlo.
- 10 27. Vakcinační prostředek podle nároku 26, **vyznačující se tím**, že viskózním činidlem je xanthanová guma.
- 15 28. Vakcinační prostředek podle kteréhokoli z nároků 25 až 27, **vyznačující se tím**, že živý oslabený virus je formulován s uhličitánem vápenatým a xanthanovou gumou a rekonstituován vodným roztokem.
- 20 29. Vakcinační prostředek podle kteréhokoli z nároků 20 až 28, **vyznačující se tím**, že živý oslabený virus je formulován s antacidním prostředkem a lyofilizován v blistrovém balení.
30. Vakcinační prostředek podle kteréhokoli z nároků 18 až 29, **vyznačující se tím**, že virus je v lyofilizované formě.
- 25 31. Vakcinační prostředek podle nároku 30, **vyznačující se tím**, že živý oslabený virus a antacidní prostředek jsou přítomné před podáváním v oddělených zásobnících pro přípravky, jako je kapalný vakcinační prostředek.
- 30 32. Vakcinační prostředek podle nároku 30, **vyznačující se tím**, že živý oslabený virus a antacidní prostředek jsou před podáváním přítomné ve stejném zásobníku pro přípravek jako lyofilizovaný vakcinační prostředek, který má být rekonstituován vodným roztokem.
- 35 33. Způsob výroby rotavirové vakcíny podle kteréhokoli z nároků 18 až 32, **vyznačující se tím**, že zahrnuje kroky, v nichž se smísí oslabený lidský rotavirus s vhodným farmaceutickým nosičem nebo adjuvans.
- 40 34. Použití oslabeného lidského rotaviru při přípravě vakcíny podle kteréhokoli z nároků 18 až 32 pro prevenci rotavirové infekce u lidského subjektu.
- 35 35. Vakcinační formulace podle kteréhokoli z nároků 18 až 32 pro použití v lékařství.

2 stránky sekvencí
a
6 výkresů

VÝPIS SEKVENCÍ

<110> SmithKline Beecham Biologicals S.A.

<120> Vaccine

<130> B45194

<160> 2

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 2350

<212> DNA

<213> Human

<400> 1

```

atggccttcac tcatttatag acaactttctc actaattcat attcagtaga tttacatgat      60
gaaatagagc aaattggatc agaaaaaact cagaatgtaa ctataaatcc gggtccattt      120
gcacagacta gatattgctcc agtcaattgg gatcatggag agataaatga ttcgactaca      180
gtagaaccaa ttttagatgg tccattatcag ccaactacat ttactccacc taatgattat      240
tggatactta ttaattcaaa tacaaaatgga gtatgatatg aaagtacaaa taatagtgac      300
ttttggactg cagtcgttgc tattgaaccg cacgtcaacc cagtagatag acaatatatg      360
atatctgggtg aaagcaagca atttaattgtg agtaacgatt caaataaatg gaagtgttca      420
gaaatgttta gaagcagtag tcaaaaatgaa ttttataata gacgtacatt aacttctgat      480
accagacttg taggaatatt taaaatcggt ggaaagtagt ggacatttca tgggtgaaaca      540
ccgagagctc cttactgacag ttcaagtact gccaaatttaa ataatatatc aattacaatt      600
cattcagaat ttacattcat tccaaggtcc caggaatcta aatgtaatzg atatattaat      660
aatggctctg caccaattca aaatactaga aatgtagtcc cattgccatt atcatctaga      720
tcgatatact ataagagagc acaagttaat gaagacatta tagtttcaaa aacttcacca      780
tggaaagaaa tgcagtataa tagggatatt ataattagat ttaaaatttg taatagtatt      840
gtaaaagatg gaggactagg ttataaatgg tctgaaatat catataaggg agcaaatat      900
caatataatt acttacgtga cgggtgaacaa gtaacccgac acaccacttg ttcagtaaat      960
ggagtgaaca attttagcta taatggaggg tttccacca ctgattttgg taattccagg      1020
tatgaagtta ttaaagagaa ttcttatgta tatgtagact attgggatga ttcaaaagca      1080
tttagaaata tggatatatg tagatcatta gcagctaatt taaattcagt gaaatgtaca      1140
gggtggaagt attatttcag tataccagta ggtgcatggc cagtaatgaa tgggtggcgt      1200
gtttcgttgc attttgccgg agttacatta tccacgcaat ttactgattt tgtatcatta      1260
aattcactac gatcttagatt tagtttgaca gttgatgaac cacccttctc aatactgaga      1320
acacgtacag tgaatttgta tggattacca gccgctaatt caaataatgg aaatgaatac      1380
tacgaaatat caggaaggtt ttcaactcat tctttagtcc caactaatga tgattaccag      1440
actccaatca tgaattcagt gacggtaaga caagatttag agcgcaact tactgattta      1500
cgagaagaa ttactcatt gtcacaagaa atagctatgg cacaattgat tgatttagca      1560
ctgttgccct tagatatggt ttccatgttt tcaggaatta aaagtacaa tgatttaact      1620
aaatcaatgg cgactagtgt aatgaagaaa tttagaaaat caaaattagc tacatcaatt      1680
tcagaaatga ctaattcatt gtcagatgct gtttcatcag catcaagaaa cgtttctatt      1740
agatcgaatt tatctgcat ttcaaatgg actaatgttt caaatgatgt gtcaaacgta      1800
actaatccat tgaacgatat ttcaacacaa acatctacaa ttagtaagaa acttagatta      1860
aaagaaatga ttactcaaac tgaaggaaat agctttgacg acatttcagc agctgtacta      1920
aaaacaaaaa tagatatgtc tactcaaat ggaaaaaata ctttacctga tatagttaca      1980
gaagcatctg agaaatctat tccaaaacga tcatatcgaa tattaagga tgatgaagta      2040
atggaaatca atactgaagg aaaattcttt gcatacaaaa ttaatacatc tgaatgaagt      2100
ccattcgatg caaataaat cgctgaacta gtaacagatt ctccagttat atcagcgata      2160
atcgatttta agacattgaa aaatttaaat gataattatg gaatcactcg tacagaagcg      2220
ttaaatttaa tcaaatcgaa tccaaatatg ttacgtaatt tcattaatca aaataatcca      2280
attataagga atagaattga acagttaata ctacaatgta aattgtgaga acgctattga      2340
ggatgtgacc

```

<210> 2

<211> 1009

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

```

atgtatggctc ttgaatatag cacaattctc atctttctga tatcaattat tctactcaac      60
tatatatata aatcagtaac tcgaataatg gactacatta tatatagatc tttgttgatc      120
tatgtagcat tatctgctcc gacaagagct cagaattatg ggcttaactc accaataaca      180
ggatcaatgg acactgtata cgctaactct actcaagaag gaatatttct aacatccaca      240
ttatgtttgt ttatccaac tgaagcaagt actcaaatga atgatgggtg atggaaagac      300
tcattgtcac aaatgtttct cacaagaagt tggccaacag gatcagttca ttttaagag      360
tattcaagta ttgttgattt ttctgtcgat ccacaattat attgtgatta taacttagta      420
ctaatagaat atgatcaaaa tcttgaatta gatattgcag agttagctga tttaatattg      480
aatggaatgg tatgtaattc aatggatata acatttatat attatcaaca atcggggaga      540
tcaaataggt ggatatcaat gggatcatca tgtactgtga aagtgtgtcc actgaatacg      600

```

caaatggttag	gaataggttg	tcaaacaaca	aatgtagact	cgtttgaaat	ggttgctgag	660
aatgagaaat	tagctatagt	ggatgtcgtt	gatgggataa	atcataaaat	aaatttgaca	720
actacgacat	gtactattcg	aaattgtaag	aagttaggtc	caagagagaa	tgragctgta	780
atacaagttg	gtggctctaa	tgtattagac	ataacagcag	atccaacgac	taatccacaa	840
actgagagaa	tgatgagagt	gaattggaaa	aaatggtggc	aagtatttta	tactatagta	900
gattatatta	accaaatcgt	gcaggtaatg	tccaaaagat	caagatcatt	aaattctgca	960
gctttttatt	atagagtata	gatatatctt	agattagatc	gatgtgacc		1009

Obr. 1

VP4 sekvence 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
TTAATTCAA	TACAAATGGA	GTAGTATATG	AAAGTACAAA	TAATAGTGAC	300
TTTTGGACTG	CAGTCGTTGC	TATTGAACCG	CACGTCAACC	CAGTAGATAG	350
ACAATATATG	ATATTGGTG	AAAGCAAGCA	ATTTAATGTG	AGTAACGATT	400
CAAATAAATG	GAAGTTTTTA	GAAATGTTTA	GAAGCAGTAG	TCAAAATGAA	450
TTTTATAATA	GACGTACATT	AACTTCTGAT	ACCAGACTTG	TAGGAATATT	500
TAAATATGGT	GGAAGAGTAT	GGCAATTTCA	TGGTGAAACA	CCGAGAGCTA	550
CTACTGACAG	TTCAAGTACT	GCAAATTTAA	ATAATATATC	AATTACAATT	600
CATTGAGAAT	TTTACATTAT	TCCAAGGTCC	CAGGAATCTA	AATGTAATGA	650
ATATATTAAT	AATGGTCTGC	CACCAATTCA	AAATACTAGA	AATGTAGTTC	700
CATTGCCATT	ATCATCTAGA	TCGATACAGT	ATAAGAGAGC	ACAAGTTAAT	750
GAAGACATTA	TAGTTTCAA	AACTTCATTA	TGGAAAGAAA	TGCAGTATAA	800
TAGGGATATT	ATAATTAGAT	TTAAATTTGG	TAATAGTATT	GTAAAGATGG	850
GAGGACTAGG	TTATAAATGG	TCTGAAATAT	CATATAAGGC	AGCAAATTAT	900
CAATATAAAT	ACTTACGTGA	CGGTGAACAA	GTAACCGCAC	ACACCACTTG	950
TTCACTAAAT	GGAGTGAACA	ATTTTAGCTA	TAATGGAGGG	TTTCTACCCA	1000
CTGATTTTGG	TATTTCAAGG	TATGAAGTTA	TTAAAGAGAA	TTCTTATGTA	1050
TATGTAGACT	ATTGGGATGA	TTCAAAAGCA	TTTAGAAATA	TGGTATATGT	1100
TAGATCATT	GCAGCTAATT	TAAATTCAGT	GAAATGTACA	GGTGGAAGTT	1150
ATTATTTTCA	TATACCAGTA	GGTGCATGGC	CAGTAATGAA	TGGTGGCGCT	1200
GTTTCGTTGC	ATTTTGCCGG	AGTTACATTA	TCCACGCAAT	TTACTGATTT	1250
TGTATCATT	AATTCACTAC	GATTTAGATT	TAGTTTGACA	GTTGATGAAC	1300
CACCTTTCTC	AATACTGAGA	ACACGTACAG	TGAATTTGTA	TGGATTACCA	1350
GCCGCTAATC	CAAATAATGG	AAATGAATAC	TACGAAATAT	CAGGAAGGTT	1400
TTCACTCATT	TCTTTAGTTC	CAACTAATGA	TGATTATCAG	ACTCCAATTA	1450
TGAATTCAGT	GACGGTAAGA	CAAGATTAG	AGCGCCAACT	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
ACATTTTCA	AGCTGTACTA	AAAACAAAAA	TAGATATGTC	TACTCAAATT	1950
GGAAAAAATA	CTTTACCTGA	TATAGTTACA	GAAGCATCTG	AGAAATTTAT	2000
TCCAAAACGA	TCATATCGAA	TATTAAAGGA	TGATGAAGTA	ATGGAAATTA	2050
ATACTGAAGG	AAAATTCTTT	GCATACAAAA	TTAATACATT	TGATGAAGTG	2100
CCATTTCGAT	TAAATAAATT	CGCTGAACTA	GTAACAGATT	CTCCAGTTAT	2150
ATCAGCGATA	ATCGATTTTA	AGACATTGAA	AAATTTAAAT	GATAATTATG	2200
GAATCACTCG	TACAGAAGCG	TTAAATTTAA	TTAAATCGAA	TCCAAATATG	2250
TTACGTAAAT	TCATTAATCA	AAATAATCCA	ATTATAAGGA	ATAGAATTGA	2300
ACAGTTAATA	CTACAATGTA	AATTGTGAGA	ACGCTATTGA	GGATGTGACC	2350

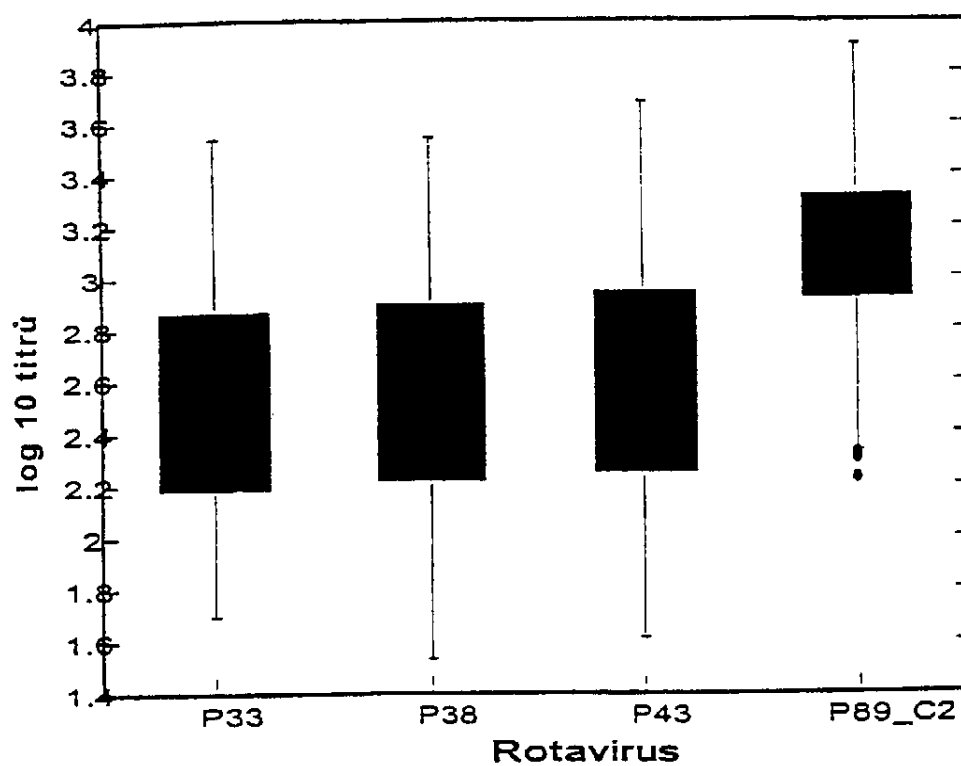
Obr. 2

VP7 sekvence 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	TTCTGTGCGAT	CCACAATTAT	400
ATTGTGATTA	TAACCTAGTA	CTAATGAAAT	ATGATCAAAA	TCTTGAATTA	450
GATATCTCAG	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
ATCATAAAAT	AAATTTGACA	ACTACGACAT	GTACTATTCTG	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					

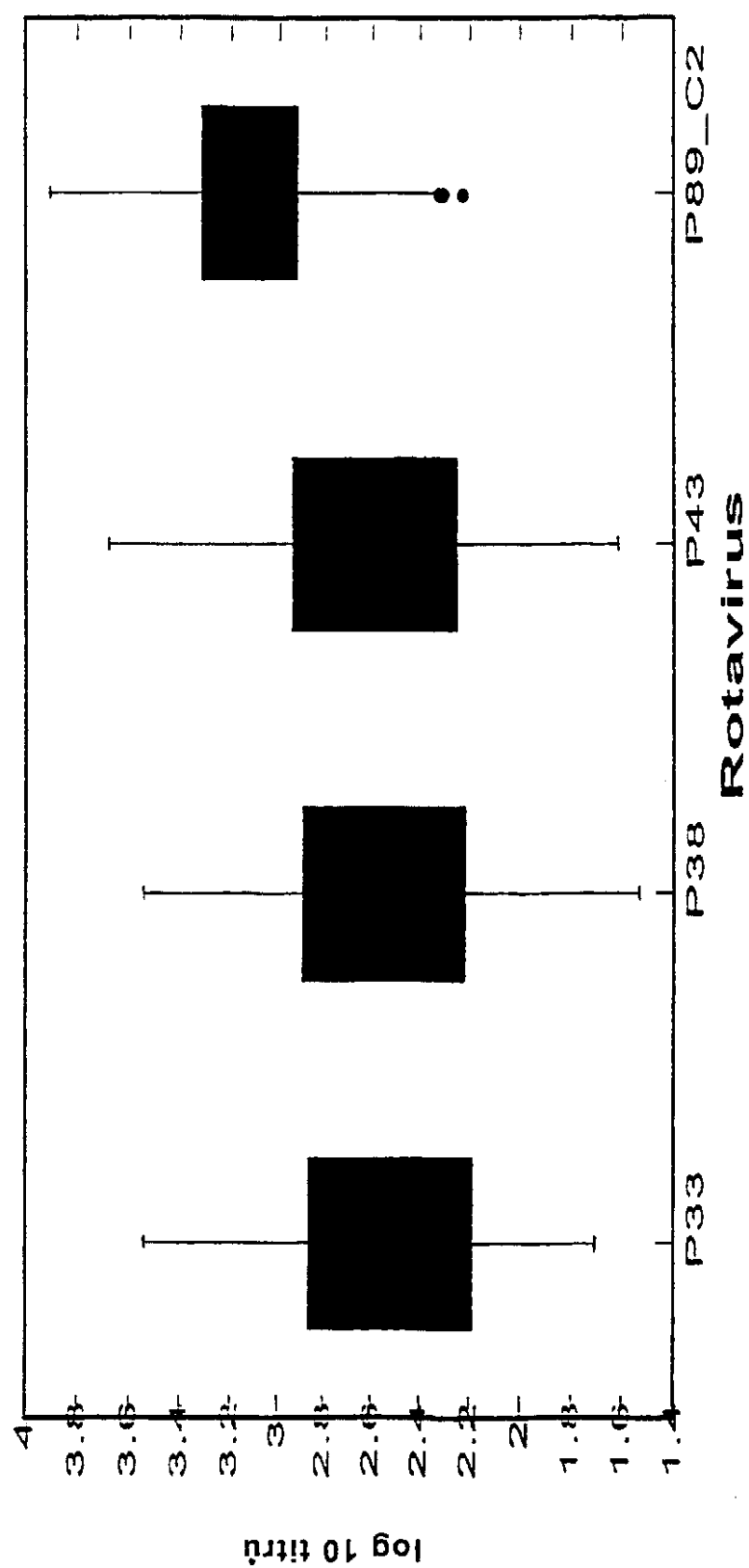
Obr. 3a

Neutralizační titry sér, odebraných kojencům, očkovaným pomocí P33
vůči rotavirovým klonům, odvozeným od P33.



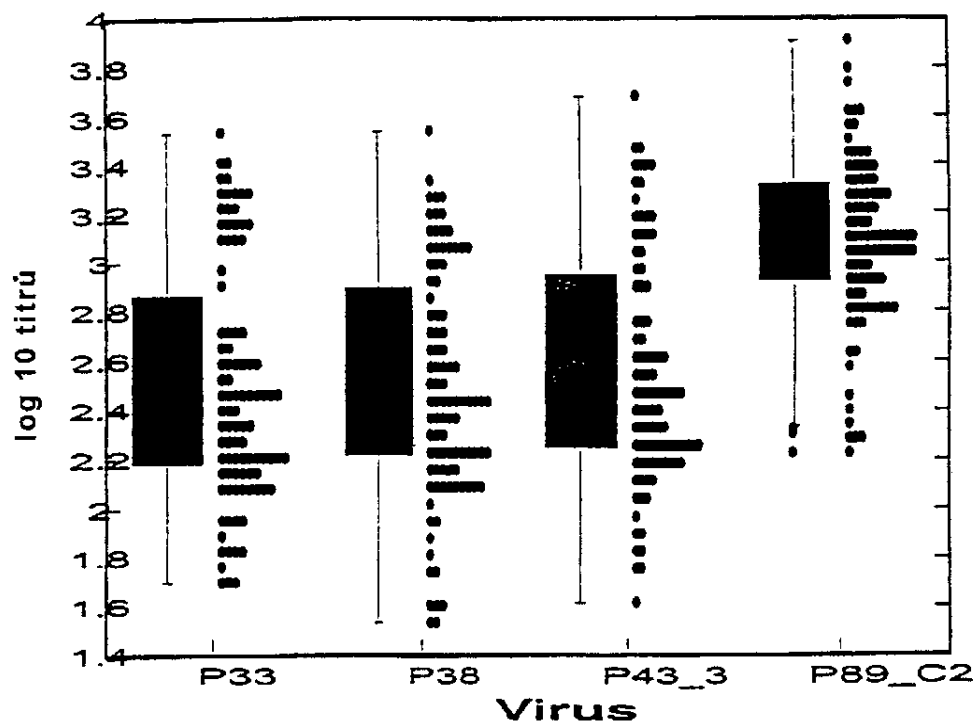
Obr. 3b

Neutralizační titry sér, odebraných kojencům, očkovaným pomocí P33
vůči rotavirovým klonům, odvozeným od P33.



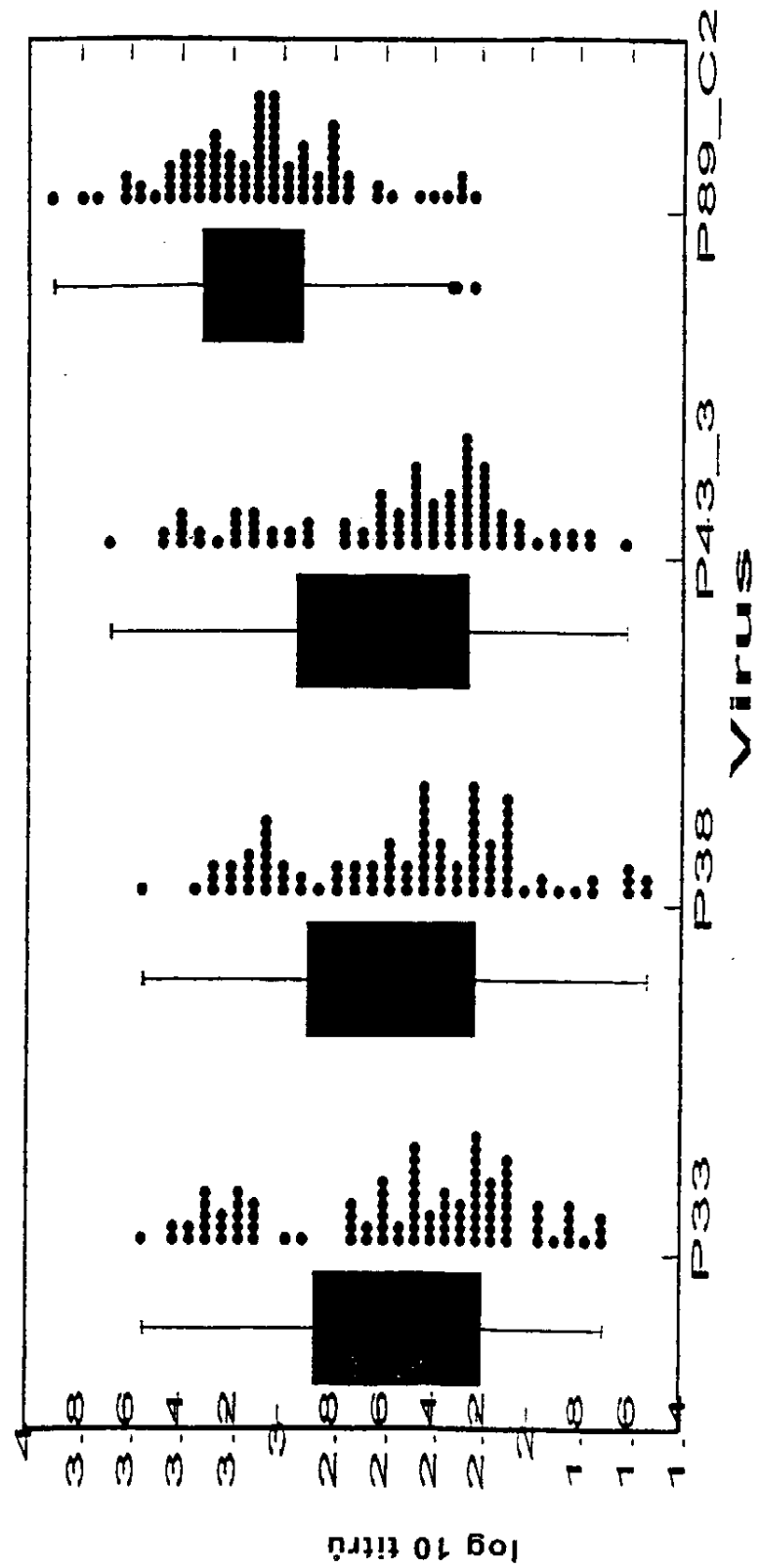
Obr. 3c

Neutralizační titry, sér odebraných kojencům, očkovaným pomocí P33
vůči rotavirovým klonům, odvozeným od P33.



Obr. 3d

Neutralizační titry sér, odebraných kojencům, očkovaným pomocí P33
vůči rotavirovým klonům, odvozeným od P33.



Konec dokumentu