

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0711608-0 A2**

(22) Data de Depósito: 11/05/2007
(43) Data da Publicação: 14/08/2012
(RPI 2171)



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

(54) Título: COMPOSIÇÃO LIOFILIZADA, USO DE ANTÍGENO VIRAL, MÉTODO DE TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE VÍRUS ASSOCIADO, MÉTODO DE ADAPTAÇÃO DE UM VÍRUS DE UMA LINHAGEM CELULAR ADEQUADA

(30) Prioridade Unionista: 12/05/2006 IN 842/CHE/2006

(73) Titular(es): Bharat Biotech International Limited

(72) Inventor(es): Krishna Murthy Ella, Smita Singhania, Victor Jerusha Augustus Harshavardhan Gutla

(74) Procurador(es): Bhering Advogados

(86) Pedido Internacional: PCT IN2007000190 de 11/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/132480de
22/11/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO LIOFILIZADA, USO DE ANTÍGENO VIRAL, MÉTODO DE TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE VÍRUS ASSOCIADO, MÉTODO DE ADAPTAÇÃO DE UM VÍRUS DE UMA LINHAGEM CELULAR ADEQUADA. A presente invenção refere-se a uma composição compreendendo um antígeno viral, uma primeira proteína e uma segunda proteína. Opcionalmente, a composição igualmente compreende três dissacarídeos diferentes, ou, opcionalmente, a composição compreende um açúcar primário e pelo menos um, preferivelmente dois açúcares secundários. A presente invenção igualmente refere-se ao uso de um antígeno viral, de uma primeira proteína e de uma segunda proteína para a fabricação de uma composição, preferivelmente uma vacina. A presente invenção, além disso, refere-se a um método de tratamento ou prevenção do vírus associado a doenças nos humanos. Além disso, a presente invenção refere-se a um método de adaptar um vírus a uma linhagem celular apropriada. A invenção é igualmente útil para a produção de suspensões de vírus apropriadas para fazer composições de vacinas de rotavírus estáveis, vivas/inativadas, monovalentes e/ou polivalentes, líquidas/liofilizadas para meio de administração oral e/ou nasal ou qualquer outro meio apropriado em humano.

**COMPOSIÇÃO LIOFILIZADA, USO DE ANTÍGENO VIRAL, MÉTODO DE
TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE VÍRUS ASSOCIADO, MÉTODO DE
ADAPTAÇÃO DE UM VÍRUS DE UMA LINHAGEM CELULAR ADEQUADA
CAMPO DA INVENÇÃO**

5 A presente invenção refere-se a uma composição compreendendo um antígeno viral, uma primeira e segunda proteínas e açúcares primário e secundário. A presente invenção também se refere ao uso de um antígeno viral, uma primeira e segunda proteínas para a produção de uma
10 composição farmacêutica, preferencialmente uma vacina. A presente invenção diz respeito ainda a um método de tratamento ou prevenção de doenças associadas a vírus em seres humanos. Além disso, a presente invenção refere-se a um método de adaptar um vírus a uma linha celular adequada.

15 A invenção também se mostra útil para a produção de suspensões de vírus adequadas para produzir composições de vacina de rotavírus estáveis, vivas/inativas, monovalentes e/ou polivalentes, líquidas/lioofilizadas para uso oral e/ou nasal ou qualquer outra forma de administração apropriada em
20 seres humanos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

 A infecção por rotavírus é a maior causa de diarreia relacionada a mortes em bebês e crianças. Todos os anos, a gastroenterite por rotavírus causa a morte de 310.000 a
25 590.000 bebês e crianças em todo o mundo. As agências internacionais de saúde têm promovido o desenvolvimento da vacina contra o rotavírus como o melhor método para a prevenção de morbidade e mortalidade associadas à infecção por rotavírus. Em 1997 e, mais uma vez, em 2000, a OMS
30 recomendou que todas as novas vacinas de rotavírus fossem testadas na Ásia e na África e que esses testes fossem realizados simultaneamente com ensaios realizados nos Estados Unidos e na Europa. Ao fazer isto, a segurança e a eficácia da vacinas poderiam ser demonstradas em países pobres, em
35 desenvolvimento já na fase de desenvolvimento, acelerando assim a disponibilidade de novas vacinas para as crianças que

mais precisam das mesmas.

Todas as vacinas de rotavírus desenvolvidas até o momento tomaram como base cepas de vírus vivos que foram isolados de seres humanos ou animais, recombinadas in vitro e adaptadas à cultura celular, formuladas para administração por via oral. Tanto as cepas monovalentes quanto multivalentes baseadas em animais mostraram eficácia como vacinas em potencial. RotaShield (Wyeth-Ayerst) foi licenciada, mas posteriormente abandonada.

A cepa de rotavírus humano 116E, recombinante natural humano-bovino, naturalmente atenuada, se caracteriza por ser uma cepa G9 humana onde um único gene VP4 bovino, homólogo ao segmento de gene P[11], é introduzido naturalmente. A I321, cepa caracterizada como um G10P[11], é composta basicamente de genes bovinos e possui apenas dois segmentos de gene, VP5 e VP7, de origem humana. Individualmente, essas duas cepas de vacina de rotavírus foram preparadas como lotes-piloto de formulações líquidas monovalentes orais de vacina de rotavírus para ensaios clínicos a serem realizados na Índia.

A Bharat Biotech International Ltd. (BBIL) obteve as cepas de rotavírus humano, 116E e I321, do National Institute of Health (NIH) através do contrato de transferência de material firmado com o National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH, Bethesda, USA. É relatada a sequência genômica completa das cepas de rotavírus 116E e I321. As 116E (G9[P11]) e I321 (G10P[11]) originais foram adaptadas para que crescessem em cultura celular por passagens em células primárias renais de macaco verde de África (AGMK), posteriormente em substrato celular MA104 e, em seguida, em AGMK com passagem em série (SPAGMK). Os substratos celulares MA104 e SPAGMK não são aprovados pelas Autoridades Reguladoras Nacionais (NRA) para a produção comercial de vacinas. Desta forma, é preferível adaptar 116E e I321 e outras cepas de vacina de rotavírus a substratos celulares aprovados, certificados, licenciados e totalmente caracterizados, como o substrato celular Vero e/ou células

diplóides humanas como a MRC-5.

A patente WO 02/11540 descreve formulações de vacina de rotavírus que incluem agentes de tamponamento adequados para a administração oral de vacinas de rotavírus. As formulações
5 constantes de WO 02/11540 incluem também compostos para estabilizar as composições de vacina contra uma perda de potência. Mais especificamente, as composições divulgadas em WO 02/11540 compreendem um açúcar, fosfato e pelo menos um carboxilato. As estabilidades alcançadas com as formulações
10 da patente WO 02/11540 variam muito e, especialmente a temperaturas acima de 20 graus centígrados, parecem mostrar perdas de potência consideráveis. Neste sentido, constitui objeto da presente invenção proporcionar composições alternativas de um antígeno viral, preferencialmente
15 composições de rotavírus que mostrem boa estabilidade.

Os objetos da presente invenção são solucionados por uma composição que compreende um antígeno viral, uma primeira proteína distinta do referido antígeno viral, sendo a primeira proteína selecionada da albumina sérica humana (HSA)
20 e albumina humana recombinante (rHA), uma segunda proteína distinta do referido antígeno viral, segunda proteína esta que é pelo menos parcialmente hidrolisada e selecionada a partir da lactalbumina. A segunda proteína confere maior estabilidade à formulação de vacina do que qualquer das
25 proteínas isoladamente.

Em uma modalidade, a composição compreende ainda três diferentes dissacarídeos, na qual, preferencialmente, esses três diferentes dissacarídeos são selecionados a partir de sacarose, lactose, maltose, trealose, celobiose, gentobiose,
30 melibiose e turanose. Quando a sacarose é utilizada, os açúcares primário e secundário são selecionados a partir da combinação de sacarose, lactose, maltose e trealose. A combinação de açúcares em concentrações específicas confere ainda estabilidade à formulação de vacina contendo aditivos
35 de proteína. O termo "açúcar primário", conforme empregado neste documento, se refere a um açúcar presente em uma

composição com outros açúcares, em uma quantidade superior à de quaisquer outros açúcares presentes. Estes outros açúcares também são denominados neste pedido "açúcares secundários". O "açúcar primário" também pode ser ora denominado "açúcar
5 bruto".

Em uma modalidade, a referida segunda proteína, que é pelo menos parcialmente hidrolisada, é selecionada a partir de hidrolisado de lactalbumina, hidrolisado de levedura, peptona e hidrolisado de gelatina.

10 Em uma modalidade, a referida proteína está presente na formulação em uma quantidade na faixa de 0,1% (p/v) a 2% (p/v), preferencialmente 0,1% (p/v) a 0,45 (p/v) e a segunda proteína, que é pelo menos parcialmente hidrolisada, está presente na formulação, como pelo menos hidrolisado parcial,
15 em uma quantidade na faixa de 0,01% (p/v) a 10% (p/v).

Preferencialmente, os três diferentes dissacarídeos mencionados, ou o referido açúcar primário e pelo menos dois açúcares secundários são uma das combinações a seguir:

- a) sacarose, lactose e maltose,
- 20 b) sacarose, maltose e trealose,
- c) sacarose, lactose e trealose,
- d) maltose, lactose e trealose.

Preferencialmente, a quantidade dos referidos três diferentes dissacarídeos juntos na formulação varia de 20%
25 (p/v) a 70% (p/v).

Em uma modalidade preferida, a quantidade de sacarose, se presente, varia de 40% (p/v) a 55% (p/v), preferencialmente 50% (p/v), a quantidade de lactose, se presente, varia de 0,1% (p/v) a 10,0% (p/v),
30 preferencialmente 0,5% (p/v), a quantidade de maltose, se presente, varia de 0,1% (p/v) a 10,0% (p/v), preferencialmente 0,5% (p/v), e a quantidade de trealose, se presente, varia de 0,1% (p/v) a 10,0% (p/v), preferencialmente 0,5% (p/v).

35 Em uma modalidade, o antígeno viral é um vírus vivo, a exemplo de um vírus vivo atenuado, onde, preferencialmente,

esse vírus vivo é selecionado a partir do grupo que abrange os rotavírus.

Preferencialmente, o vírus vivo é um vírus vivo humano, como o rotavírus humano.

5 Em uma modalidade particularmente preferida, o rotavírus humano é uma cepa de rotavírus 116E ou I321.

Em uma modalidade, a composição segundo a presente invenção compreende um rotavírus vivo com titulação na faixa de 10^4 a 10^7 FFU/0,5 ml, albumina de soro humano na faixa de
10 0,1% (p/v) a 0,45% (p/v), hidrolisado de lactalbumina na faixa de 0,01% (p/v) a 10% (p/v), e ou

a) sacarose em uma quantidade na faixa de 40% a 55% (p/v), e lactose em uma quantidade na faixa de 0,1% a 10,0% (p/v), e maltose em uma quantidade na faixa de 0,1% a 10,0%
15 (p/v), ou

b) sacarose em uma quantidade na faixa de 40% a 55% (p/v), e maltose em uma quantidade na faixa de 0,1% a 10,0% (p/v), e trealose em uma quantidade na faixa de 0,1% a 10,0% (p/v).

20 Em uma modalidade, a composição segundo a presente invenção compreende ainda um tampão para corrigir o pH da referida composição para um valor na faixa de 6,8 a 7,8, onde, preferencialmente, o tampão é um tampão de fosfato/citrato.

25 Em uma modalidade, a composição segundo a presente invenção se constitui de meio essencial mínimo Eagles, onde, preferencialmente, o mesmo é tamponado em tampão de fosfato/citrato a pH entre 6,8 e 7,8.

Preferencialmente, o referido tampão de fosfato/citrato
30 tem aproximadamente 310 mM de fosfato e aproximadamente 100 mM de citrato.

Em uma modalidade, a composição segundo a presente invenção é uma vacina.

A preparação de formulação de vacina estável apresenta
35 desafios significativos. As interações entre os excipientes incorporados na composição da vacina determinam a

estabilidade da formulação. Ligações de hidrogênio de proteína e açúcar precisam ser dominantes para acarretar a estabilização da vacina. Os contatos efetivos de açúcar e vacina de proteína antigênica devem apresentar a proporção adequada para manter a vacina estável. É preciso uma concentração de açúcar crítica para ter o número de ligações de hidrogênio de proteína e açúcar a fim de manter a vacina estável por determinado tempo e a uma determinada temperatura. Os açúcares têm a capacidade de efetuar ligações de hidrogênio com membrana com fosfolipídeos e proteínas ao ocorrer a substituição por água estrutural. O presente estudo fornece os estabilizadores utilizados para estabilizar o rotavírus vivo atenuado 116 E e I321 contra 2,8°C, 23°C e 37°C por um período mais prolongado.

Combinações adequadas de açúcares e proteínas com o componente de tamponamento preservam e permitem a sobrevivência e atividade do vírus por um longo período de armazenagem. Esses aditivos conferem apoio estrutural ao rotavírus suspenso em estado líquido. Dá-se preferência à trealose para uso como estabilizador na formulação de vacina, uma vez que estabiliza a estrutura da proteína do vírus e restaura a potência em caso de armazenamento prolongado. A combinação de sacarose e maltose torna efetivos contatos de açúcar e proteína (vacina) para manter a vacina estável. Albumina sérica humana suportada por hidrolisado de lactalbumina desempenha um papel de destaque no contato efetivo do açúcar e proteína de vacina para manter a vacina estável.

Os objetos da presente invenção também são solucionados pelo uso de um viral antígeno, uma primeira proteína e uma segunda proteína, cada uma definida acima, e, opcionalmente, três diferentes dissacarídeos, segundo definição acima, para a produção de uma composição segundo a presente invenção, preferencialmente para a produção de uma vacina, para tratamento ou prevenção de doenças associadas a vírus, preferencialmente ao rotavírus, tais como diarreia e

gastroenterite.

Preferencialmente, o tratamento ou prevenção compreende a administração de três doses orais de uma quantidade segura e eficaz da composição a um bebê de 8 a 20 semanas de idade à época da primeira dose.

Preferencialmente, o uso segundo a presente invenção destina-se à prevenção de infecção por vírus, principalmente infecção e/ou gastroenterite por rotavírus em seres humanos.

Os objetos da presente invenção are também são solucionados por um método de tratamento ou prevenção de doenças associadas a vírus, preferencialmente ao rotavírus, em seres humanos mediante administração em humanos de uma quantidade eficaz da composição segundo a presente invenção.

Preferencialmente, o método segundo a presente invenção, compreende administrar três doses orais de uma quantidade segura e eficaz da composição a um bebê de 8 a 20 semanas de idade à época da primeira dose.

Em uma modalidade, o método segundo a presente invenção, para a prevenção de uma infecção por vírus em seres humanos, preferencialmente infecção e/ou gastroenterite por rotavírus.

Os objetos da presente invenção são solucionados por um método de adaptar um vírus a uma linha celular adequada, como células Vero, compreendendo a passagem em série do referido vírus por culturas de tal linha celular adequada, ocorrendo cada passagem em um meio na presença de cloreto de cálcio e tripsina.

Preferencialmente, o cloreto de cálcio está presente na faixa de 0,1 mg/ml a 1 mg/ml, e a tripsina na faixa de 0,1 µg/ml a 30 µg/ml.

Em uma modalidade, as passagens em série compreendem de 2 a 20 passagens, preferencialmente de 2 a 5.

Preferencialmente, cada passagem ocorre por um período na faixa de 24 horas a 10 dias.

Preferencialmente, o referido vírus é um rotavírus humano.

Os inventores desta patente descobriram que, ao incluir

uma primeira proteína selecionada dentre albumina sérica humana, albumina humana recombinante e uma segunda proteína pelo menos parcialmente hidrolisada, em uma composição farmacêutica, a estabilidade desta composição pode ser
5 aumentada no que diz respeito à sua potência viral. Especialmente nas temperaturas de 25°C e 37°C, as composições segundo a presente invenção mostram maior estabilidade.

A frase "a segunda proteína é pelo menos parcialmente hidrolisada", conforme empregada neste documento, se refere a
10 um cenário em que esta segunda proteína foi pelo menos parcialmente desmembrada nos seus respectivos blocos construtivos de aminoácidos. Portanto, a frase acima também significa incluir cenários em que a segunda proteína não mais existe como uma molécula completa, mas apenas como uma
15 coleção de fragmentos da mesma. Além disso, ela significa a inclusão de um cenário onde a segunda proteína se encontra totalmente hidrolisada. Todos esses cenários também são interpretados como incluídos no termo "proteína hidrolisada", como "hidrolisado de lactalbumina", que pode incluir uma
20 proteína totalmente hidrolisada, ou seja, uma proteína desmembrada nos seus respectivos aminoácidos, ou uma proteína parcialmente desmembrada, de forma que existe uma coleção de peptídeos e aminoácidos. Essas proteínas hidrolisadas podem ser facilmente obtidas pelos versados na técnica, por
25 exemplo, por hidrólise de ácido, ou ser obtidas comercialmente.

O efeito estabilizador obtido pela presença da primeira e da segunda proteínas é opcionalmente acentuado pela presença de uma combinação de três dissacarídeos diferentes,
30 ou de uma combinação de um açúcar primário e pelo menos dois açúcares secundários. As combinações preferidas são sacarose, lactose e maltose, e sacarose, maltose e trealose. As composições segundo a presente invenção podem ser utilizadas como vacina para imunização contra infecção por vírus e
35 doenças associadas a vírus. Preferencialmente, essas composições são tamponadas a um pH apropriado, em geral entre

6 e 8, preferencialmente entre 6,8 e 7,8. Por exemplo, em uma modalidade, pode-se formular a composição segundo a presente invenção em meio essencial mínimo Eagles. Preferencialmente, esta composição é tamponada, por exemplo, com um tampão de fosfato/citrato.

Os inventores desta patente também conceberam um método de adaptar um vírus a uma linha celular apropriada, método este que pode, por exemplo, ser utilizado com rotavírus. Ele é realizado ao se efetuar uma passagem em série do vírus por culturas celulares, o que se dá na presença de cloreto de cálcio e tripsina. Isto proporciona uma forma fácil de adaptar o vírus a uma determinada linha celular, além de permitir a produção de vírus com títulos elevados.

Mais especificamente e a título de exemplo, os inventores da presente patente adaptaram cepas de rotavírus 116E e I321 a células Vero a fim de produzir uma colheita de rotavírus de título elevado e ainda caracterizaram os 116E e I321 adaptados para produzir composições líquidas estáveis, vivas e monovalentes de vacina de rotavírus. Antes da imunização, uma composição antiácida oral de tampão citrato-bicarbonato é dada para tamponar a acidez do estômago da criança.

Todas as cepas para vacina de rotavírus relatadas até o momento são ou cepas de rotavírus naturais, vivas, humanas, bovinas, natural ou artificialmente atenuadas ou cepas humanas e bovinas geneticamente modificadas com várias combinações de VP4, VP7 e outros genes de cepas de rotavírus humanos e bovinos. As cepas de rotavírus 116E (G9P[11]) e I321 (G10P[11]) são recombinantes naturais humanos-bovinos, naturalmente atenuados e conferem num nível substancial de imunidade em bebês e crianças. Também a capacidade de a cepa 116E se replicar em recém-nascidos sem provocar doença na presença de títulos elevados de anticorpos maternos a torna um candidato ainda mais promissor de vacina monovalente contra rotavírus vivo e naturalmente atenuado.

A presente invenção fornece composições farmacêuticas de

vírus, preferencialmente rotavírus, que apresentam grande estabilidade e longevidade especialmente a temperaturas acima de 20°C. A presente invenção também fornece um método de adaptar rotavírus, por exemplo, cepas de rotavírus recombinate humano-bovino natural, naturalmente atenuado 116E (G9P [H]) e I321 (G10P[11]), a células adequadas, por exemplo, Células Vero. O método inclui uma dose otimizada de tripsina (0,1µg/ml a 30µg/ml) e/ou cloreto de cálcio (100µg/ml a 1000µg/ml) para ativação de vírus e meio de manutenção de vírus onde o elevado título (10^4 a 10^8 FFU/ml) de colheita de vírus se dá de uma a dez dias. Também está previsto o uso das cepas adaptadas para produzir uma composição líquida estável, viva e monovalente de vacina de rotavírus. Além disso, a presente invenção proporciona o uso de um antígeno viral, uma primeira proteína, a segunda proteína e, opcionalmente, uma combinação de três diferentes dissacarídeos para a produção de uma composição segundo a presente invenção para o tratamento ou prevenção de doenças associadas a vírus, preferencialmente ao rotavírus.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Dados de estabilidade para formulação líquida de rotavírus com diferentes estabilizadores após armazenagem a 2-8°C por 50 semanas.

Figura 2: Dados de estabilidade para formulações líquidas de rotavírus com diferentes estabilizadores após armazenagem a 25°C.

Figura 3: Dados de estabilidade para formulações líquidas de rotavírus com diferentes estabilizadores após armazenagem a 37°C.

Figura 4: Dados de estabilidade para formulação líquida de rotavírus após armazenagem a 2-8°C, 25°C e 37°C para a amostra 1.

Figura 5: Dados de estabilidade para formulação líquida de rotavírus após armazenagem a 2-8°C, 25°C e 37°C para a amostra 2.

Figura 6: Dados de estabilidade para formulação líquida

de rotavírus após armazenagem a 2-8°C, 25°C e 37°C para a amostra 3.

Figura 7: Dados de estabilidade para formulação líquida de rotavírus após armazenagem a 2-8°C, 25°C e 37°C para a amostra 4.

Figura 8: Dados de estabilidade para formulação líquida de rotavírus após armazenagem a 2-8°C, 25°C e 37°C para a amostra 5.

Figura 9: Dados de estabilidade para formulação líquida de rotavírus após armazenagem a 2-8°C, 25°C e 37°C para a amostra 6 e

Figura 10: Dados de estabilidade para formulação líquida de rotavírus após armazenagem a 2-8°C, 25°C e 37°C para a amostra 7.

Figura 11: Dados de estabilidade para formulação liofilizada de rotavírus após armazenagem a 2-8°C, 25°C e 37°C por 50 semanas, para a amostra 1 -4.

Figura 12: Ensaio quantitativo (Ensaio de Imunoperoxidase) de colheita de rotavírus adaptado a diferentes concentrações de tripsina.

Figura 13: Eletroferotipagem de 116E RNA em gel de poliacrilamida a 10% visualizada por coloração com prata. Perfil de Faixa:

- 1 Rotavírus 116E, SP AGMK Referência
- 2 Rotavírus 116E, Lote final # 61 4004
- 3 Mistura de [Rotavírus 116E, SPAGMK Referência + Rotavírus 116E, Lote final # 61 4004]
- 4 Rotavírus 116E, Lote final # 61 4004
- 5 Rotavírus 116E, SPAGMK Referência 6 Rotavírus 116E, Lote bruto # 61BP4004
- 7 Rotavírus 116E, Banco de Vírus de Trabalho

Figura 14: Eletroferotipagem de Rotavírus I321 em gel de poliacrilamida a 10% visualizada por coloração com prata. Perfil de Faixa:

- 1 Rotavírus I321, SPAGMK Referência
- 2 Rotavírus I321, Lote final # 64 4004

- 3 Mistura de [Rotavírus I321, SPAGMK
Referência + Rotavírus I321, Lote final # 64 4004]
4 Rotavírus I321, Lote final # 64 4004
5 Rotavírus I321, SPAGMK Referência
5 6 Rotavírus I321, Lote bruto # 64BP4004
7 Rotavírus I321, Banco de Vírus de Trabalho

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Conforme exigido, as modalidades detalhadas da presente invenção são divulgadas no presente documento; entretanto, 10 cabe lembrar que as modalidades divulgadas têm caráter meramente exemplificativo da invenção, que pode ser incorporada de várias formas. Desta forma, detalhes estruturais e funcionais específicos divulgados no presente documento não devem ser interpretados como restritivos, mas 15 tão-somente como base para as reivindicações e como uma base representativo de ensinamento aos versados na técnica sobre como empregar de maneira variada a presente invenção em praticamente qualquer estrutura detalhada da maneira apropriada. Além disso, os termos e frases ora empregados não 20 se destinam a limitar a invenção, mas fornecer uma descrição compreensível da mesma.

Os termos "um" ou "uma", conforme utilizados neste documento, são definidos como um(a) ou mais de um(a). O termo "pluralidade", conforme empregado neste documento, é definido 25 como dois (duas) ou mais de dois (duas). O termo "outro(a)", conforme empregado neste documento, é definido como pelo menos um(a) segundo(a) ou mais. Os termos "incluindo" e/ou "possuindo", conforme empregados neste documento, são definidos no sentido de abranger (isto é, linguagem aberta).

30 Os rotavírus humanos apresentam uma faixa muito estreita de hospedeiro de cultura de tecido. Por conseguinte, o isolamento e a passagem em série de várias cepas são realmente realizados em culturas celulares como a MA-104 de símios ou de células renais primárias de macaco (AGMK), sendo 35 ambas inadequadas para a produção de vacinas. As primeiras células não foram validadas como substrato para a produção de

vacina e as últimas são notórias pela sua contaminação com vários agentes microbianos de símios, dentre os quais os retrovírus.

Muitos rotavírus bem caracterizados foram isolados, foram submetidos a passagem em série e a purificação tripla em placa em sistemas de cultura celular disponíveis comercialmente e não indicados para a produção de vacina. Nos casos em que foi preciso utilizar esses vírus no desenvolvimento de vacina, os vírus foram posteriormente submetidos a passagem e clonados biologicamente em um substrato celular certificado para o desenvolvimento e a produção de vacina. Idealmente, os vírus para uso em vacinas devem ser isolados e submetidos a passagem unicamente em células de cultura de tecido certificadas como aceitáveis para a produção de vacina. As linhas celulares Vero e MRC-5 atendem a esse requisito por suportarem um crescimento eficiente de rotavírus.

A presente invenção diz respeito a composições que compreendem um antígeno viral e a um método de adaptação de rotavírus recombinante natural humano-bovino e cepas naturalmente atenuadas de 116E (G9P[11]) e I321 (G10P[11]) a células Vero. As cepas de rotavírus originais 116E e I321 para vacina foram adaptadas a substrato celular AGMK, MA104 e SPAGMK. O SPAGMK é uma linha celular sem aprovação da Autoridade Reguladora Nacional (NRA) para a produção comercial de vacinas. Portanto, deu-se preferência não somente a adaptar a cepas de rotavírus para vacina (116E, I321) a substratos celulares aprovados pela FDA ou NRA, como as células Vero, células diplóides humanas, MRC-5 etc., mas também a obter a colheita do vírus de alto título no menor prazo possível para a produção comercial da vacina de rotavírus. Segundo os dados disponíveis na literatura científica, diversos métodos de adaptação foram estudados, porém não considerados satisfatórios em termos de rendimento de colheita de vírus e prazo. O novo método de adaptação de vírus no qual o uso de cloreto de cálcio e tripsina a várias

concentrações por períodos distintos, para a ativação do vírus e em meio de manutenção padronizado por nós, foi preferido para a produção em massa de cepas de rotavírus para vacina. Para a composição oral de vacina de rotavírus, o

5 vírus é estabilizado em uma composição que compreende uma primeira proteína selecionada dentre albumina sérica humana, albumina humana recombinante, albumina sérica bovina e albumina sérica suína e uma segunda proteína que é pelo menos parcialmente hidrolisada, sendo esta segunda proteína

10 selecionada dentre lactalbumina humana, lactalbumina bovina e lactalbumina suína. Opcional e preferencialmente, a composição compreende também a combinação de três diferentes dissacarídeos selecionados dentre sacarose, lactose, maltose, trealose, celubiose, gentobiose, melibiose e turanose.

15 Entre os outros componentes que podem ser adicionados à composição estão gelatina, gelatina hidrolisada, casitona, D-sorbitol, aminoácidos como alanina, histidina, arginina, glutamina e antibióticos. Antes da administração da vacina, administra-se uma composição antiácida por via oral, por

20 exemplo, tampão de acitrato-bicarbonato para tamponar a acidez estomacal e garantir a entrega da vacina ativa.

De acordo com uma modalidade, a adaptação de cepas de rotavírus para vacina 116E e I321 a substrato celular Vero (Número ATCC - CCL-81) para conferir uma colheita de vírus de

25 alto título em dez dias foi obtida mediante padronização da concentração de cloreto de cálcio variando de 100µg/ml a 1000µg/ml e/ou concentração de tripsina variando de 0,1µg/ml a 30µg/ml a intervalos distintos de colheita de vírus. O rendimento da colheita de vírus foi avaliado por ELISA, bem

30 como em termos de títulos de infectividade de vírus em substrato celular apropriado por medição das Unidades Formadoras de Foco (FFU)/ml.

Sabe-se no estado da técnica que a infectividade por rotavírus é intensificada pela clivagem com tripsina de VP4

35 em VP5 e VP8 (7,8). VP5 permeabiliza a membrana celular hospedeira para o ingresso do rotavírus.

O candidato de vacina de rotavírus adaptado foi caracterizado ainda por eletroferotipagem (Figuras 13 e 14) e sequenciamento de nucleotídeos (dados não exibidos).

Os anticorpos são levantados contra as cepas de vacina
5 contra rotavírus seguindo o protocolo padrão para a
preparação de finalidades imunodiagnósticas e
imunoterapêuticas.

As cepas de rotavírus para vacina são detectadas
mediante reação em cadeia da polimerase via transcriptase
10 reversa (RT-PCR), onde os genes VP4 e VP7 e/ou VP4 e VP7, que
hibridizam seletivamente o ácido nucléico, são amplificados
com o uso de *primers forward* e reversos para o gene VP4 (tipo
Pl 1) e/ou gene VP7 e um segundo *primer*, localizado ou no
gene VP4 (G9P [11], G10P [11]) e/ou no VP7 gene, ou ainda em
15 um gene adjacente.

Os exemplos a seguir foram incluídos única e
exclusivamente para auxiliar em um entendimento mais completo
da invenção descrita e reivindicada neste documento, sem
restringirem de forma alguma o âmbito da mesma.

20 **EXEMPLO 1**

As cepas originais de rotavírus para vacina 116E
(G9P[11]) e I321 (G10P[11]) foram fornecidas por NIAID, NIH,
Bethesda, USA à Bharat Biotech International Limited como
cepas de material de Vacina Starting Material, tendo sido
25 cultivadas em AGMK, MA1 04 e substrato celular SPAGMK. Para a
produção comercial de vacina de rotavírus, estas cepas de
rotavírus foram adaptadas ao substrato celular Vero e a
células diplóides humanas, substrato celular MRC-5 por
passagem em série do rotavírus. A concentração de cloreto de
30 cálcio variando de 100µg/ml a 1000µg/ml e/ou de tripsina,
variando de 0,1µg/ml a 30µg/ml, é avaliada para a ativação do
rotavírus e em meio de manutenção pelos períodos que variam
de 24 horas a 10 dias para colheita de vírus de alto título,
a cada passagem viral no substrato celular. O rendimento do
35 vírus em sobrenadante de cultura celular é testado por kit
Rotaclone ELISA quanto à detecção do antígeno de rotavírus

sobre poços ELISA pré-revestidos com anti-rotavírus específicos.

O título de infectividade de pool de rotavírus é titulado em termos de Unidade Formadora de Foco (FFU)/ ml por Ensaio de Imunoperoxidase. Em suma, o Ensaio de Imunoperoxidase para títulos de infectividade de rotavírus foi estimado ao se cultivar camadas confluentes de células MA104 em placas de cultura de tecido com 24 poços. As células são então lavadas duas vezes e infectadas com rotavírus ativado diluído (diluições de log) adequado e incubadas por 12 horas. Após a incubação, as células foram fixadas em formalina a 3,5% e amostradas com antígeno de rotavírus. Para tanto, o anticorpo secundário conjugado com HRPO é identificado e tingido com AEC Chromogen.

É possível obter a colheita máxima de vírus, variando de 10^6 - 10^8 FFU/ml a várias concentrações de tripsina, no período de um a dez dias (Figura 12).

EXEMPLO 2

As cepas de rotavírus 116E e I321 podem ser caracterizadas por uma série de métodos conhecidos na técnica. Dentre eles se encontram, sem limitação, RT-PCR, hibridização de RNA, análise de sequência e agrupamento de genes isto é, eletroferotipagem de RNA. Os rotavírus de cepas 116E e I321 possuem um padrão diferente de eletroforese de RNA/híbrido de RNA, se comparado a outras cepas de rotavírus. Eles possuem genoma de RNA (dsRNA) de fita dupla consistindo de 11 segmentos cujo peso molecular varia de aproximadamente $2,0 \times 10^6$ a $0,2 \times 10^6$ quilodaltons, dos quais 88.000 daltons são de proteína VP4, 44.000 daltons de proteína VP6 e 38.000 daltons de proteína VP7. A diferença sutil na mobilidade dos 11 segmentos genômicos acarreta um padrão de banda eletroforética característico.

O padrão de banda eletroforética das cepas de rotavírus 116E e I321 pode ser verificado por isolamento do dsRNA genômico pelo método fenol-clorofórmio seguido de purificação com matriz de troca de ânion CC41. O dsRNA purificado é

submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, seguido de coloração com prata para ácidos nucleicos. O padrão de banda de 11 segmentos pode ser comparado ao padrão de referência dos rotavírus 116E e I321 (Figuras 13 e 14).

5 **EXEMPLO 3**

As cepas de rotavírus 116E e I321 podem ser detectadas por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR). Em geral, o RT-PCR compreende o contato entre RNA obtido de amostra contendo vírus com *primers*, o que hibridiza
10 seletivamente a seqüência de gene VP4 (tipo P11) e/ou VP7 (tipo G9/G10) e sintetiza a primeira cepa de produto RT-PCR. Um segundo conjunto de *primers*, no gene VP4 e/ou no gene VP7, ou ainda localizado no gene adjacente serviria de primer para a síntese da segunda cepa. Os *primers* podem ter
15 substituições, contando que haja bases complementares suficientes para a hibridização seletiva.

EXEMPLO 4

O exemplo a seguir, de caráter não restritivo, é apresentado a fim de ilustrar melhor a estabilidade da
20 formulação líquida preparada para vacinas orais contra rotavírus vivo e naturalmente atenuado (116E e/ou I321).

Estabilizadores são excipientes farmacêuticos gerais e/ou compostos químicos específicos que interagem e estabilizam moléculas biológicas, adicionados a uma vacina e
25 empregados em conjunto com armazenagem a baixas temperaturas.

A estabilidade do rotavírus nas diferentes faixas de temperatura de 2-8°C, 25°C e 37°C foi testada em diversas combinações de estabilizador.

Células Vero infectadas com rotavírus são colhidas,
30 clarificadas e purificadas em estabilizadores e formuladas como preparação líquida. O mesmo lote de rotavírus colhidos de células Vero infectadas é utilizado em diferentes formulações de dose. As preparações líquidas de vacinas de rotavírus são então encubadas a 2-8°C, 25°C e 37°C para
35 estudos de estabilidade acelerada. Para um estudo de estabilidade em tempo real, as preparações líquidas de

vacinas de rotavírus são encubadas a 2-8°C Por 12 meses. Após essas encubações, os títulos de vírus foram medidos por Ensaio de Imunoperoxidase.

Além disso, uma série de amostras foi produzida para
5 chegar a uma composição segundo a presente invenção:

Amostra 1 formulada com meio essencial mínimo Eagles tamponado em 310 mM de fosfato e 100 mM de citrato contendo sacarose a 50%, lactose a 0,5%, maltose a 0,5%, albumina sérica humana a 0,4% e hidrolisado de lactalbumina a 0,05%
10 com pH 7,4, apresentou título de $10^{6,02}$ FFU/0,5 ml no dia 0 e, a 2-8°C, não mostra queda do título depois de 50 semanas. (Figuras 1 e 4)

A 25°C, a amostra 1 é estável até 14 semanas e, em seguida, observa-se uma queda de 0,5 no log de título depois
15 de 24 semanas. (Figuras 2 e 4)

A 37°C, a amostra 1 apresenta uma queda de título de 0,7 log após 3 semanas, depois queda de 1,41 de log após 6 semanas, outra queda de 1,28 de log após 8 semanas e outra de 0,11 de log após 10 semanas (Figuras 3 e 4).

Amostra 2, formulada com meio essencial mínimo Eagles tamponado em 310 mM de fosfato e 100 mM de citrato contendo sacarose a 50%, maltose a 0,5%, trealose a 0,5%, albumina sérica humana a 0,4% e hidrolisado de lactalbumina a 0,05%
20 com pH 7,4, apresentava título de $10^{6,41}$ FFU/0,5 ml no dia 0 e, a 2-8°C, mostra queda de 0,06 de log no título após 50 semanas (Figuras 1 e 5).

A 25°C, a amostra 2 apresenta uma queda de 0,91 de log após 24 semanas (Figuras 2 e 5).

A 37°C, a amostra 2 apresenta uma queda de 0,94 de log
30 após 3 semanas, mais uma queda de 1,78 de log após 6 semanas, outra queda de 3,18 de log após 8 semanas, não houve queda de títulos da 8ª à 10ª semana, mas uma queda de 3,15 de log após 10 semanas (Figuras 3 e 5).

Amostra 3, formulada com meio essencial mínimo Eagles
35 tamponado em 310 mM de fosfato e 100 mM de citrato contendo sacarose a 50%, maltose a 0,5%, trealose a 0,95%, albumina

sérica humana a 0,4% e hidrolisado de lactalbumina a 0,05% a pH 7,4, apresentou título de $10^{6,22}$ FFU/0,5 ml no dia 0 e, a 2-8°C, não mostra queda de título após 50 semanas (Figuras 1 e 6).

5 A 25°C, a amostra 3 shows não apresenta quedas até 12 semanas e, depois de 24 semanas, mostra uma queda de 0,88 de log no título (Figuras 2 e 6).

10 A 37°C, a amostra 3 mostra queda de 0,87 de log após 3 semanas e outra de 0,52 de log após 6 semanas, além de outra queda de 1,27 de log após 10 semanas e outra de 1,0 de depois de 12 semanas, caindo para 0,3 de log decorridas 14 semanas (Figuras 3 e 6).

15 **Amostra 4**, formulada com meio essencial mínimo Eagles tamponado em 310 mM de fosfato e 100 mM de citrato contendo sacarose a 50%, maltose a 0,5%, lactose a 0,5%, albumina sérica humana a 0,4% a pH 7,4, apresentava título de $10^{6,19}$ FFU/0,5 ml no dia 0 e, a 2-8°C, não apresenta qualquer queda de título após 50 semanas (Figuras 1 e 7).

20 A 25°C, a amostra 4 apresenta uma queda de 0,53 de log de título após 6 semanas e outra queda, de 0,42 de log, depois de 10 semanas, assim como uma queda de 0,05 de log de título após 16 semanas e outra de 1,73 de log após 24 semanas (Figuras 2 e 7).

25 A 37°C, a amostra 4 apresenta uma queda de 1,96 de log de título após 3 semanas e outra queda de 1,43 de log de título após 6 semanas (Figuras 3 e 7).

30 **Amostra 5**, formulada com meio essencial mínimo Eagles tamponado em 310 mM de fosfato e 100 e mM de citrato contendo sacarose a 40%, maltose a 5% e hidrolisado de lactalbumina a 1,0% a pH 7,4, apresentava título de $10^{6,35}$ FFU/0,5 ml no dia 0 e, a 2-8°C, não apresenta qualquer queda de título após 16 semanas, senão uma queda de 0,15 de log após 50 semanas (Figuras 1 e 8).

35 A 25°C, a amostra 5 apresenta uma queda de 0,46 de log no título a partir do dia 0 após 6 semanas. Outra queda de 0,62 no log de título é observada após 10 semanas. Uma queda

de 0,78 no log de título ainda é observada após 16 semanas e, depois de 24 semanas, verifica-se outra de 2,06 no log (Figuras 2 e 8).

5 A 37°C, a amostra 5 apresenta queda de 1,04 no log de título após 3 semanas a partir do título do dia 0 e outra queda de 1,58 no log de título após 6 semanas (Figuras 3 e 8).

10 **Amostra 6**, formulada com meio essencial mínimo Eagles tamponado em 310 mM de fosfato e 100 mM de citrato contendo sacarose a 50%, maltose a 0,5%, trealose a 0,5% e albumina sérica humana a 0,4% a pH 7,4, apresentava título de $10^{6,19}$ FFU/0,5 ml no dia 0 e, a 2-8°C, não apresenta qualquer queda de título após 50 semanas (Figuras 1 e 9).

15 A 25°C, a amostra 6 apresenta uma queda de 0,32 no log no título a partir do título do dia 0 após 6 semanas. Outra queda de 0,46 no log de título é observada após 8 semanas; após 16 semanas, observa-se outra queda de 0,82 no log do título, além de uma queda de 1,36 no log após 24 semanas (Figuras 2 e 9).

20 A 37°C, a amostra 6 apresenta uma queda de 2,17 no log de título após 3 semanas a partir do título do dia 0 e outra queda de 1,18 no log de título após 6 semanas (Figuras 3 e 9).

25 **Amostra 7**, formulada com meio essencial mínimo Eagles tamponado em 310 mM de fosfato e 100 mM de citrato contendo sacarose a 50%, trealose a 0,5%, hidrolisado de lactalbumina a 0,05% e albumina sérica humana a 0,4% a pH 7,4, apresentava título de $10^{6,34}$ FFU/0,5 ml no dia 0 e, a 2-8°C, mostra 0,24 de queda no log de título após 50 semanas (Figuras 1 e 10).

30 A 25°C, a amostra 7 apresenta uma queda de 0,67 no log de título a partir do título do dia 0 após 6 semanas. Uma queda de 3,43 no log de título é observada após 24 semanas (Figuras 2 e 10).

35 A 37°C, a amostra 7 apresenta uma queda de 3,24 no log de título após 8 semanas a partir do título do dia 0 (Figuras 3 e 10).

As amostras liofilizadas 1-4 apresentam estabilidade a 2-8°C, 25°C e 37°C até 50 semanas sem qualquer queda de título (Figura 11). Os estabilizadores utilizados são as combinações de 0,1% a 1,0% de HAS, 1% de SPG (= sacarose
5 fosfato glutamato), 1,2% L-arginina, 1% de D-sorbitol, 1% gelatina e 2% de trealose (Fig.11).

Das figuras 1-6 pode-se perceber que as amostras segundo a presente invenção, mais especificamente as amostras 1-3, apresentam longevidade e estabilidade muito maiores a
10 temperaturas elevadas, acima de 25°C, especialmente por períodos mais longos.

Desta forma, combinações particularmente preferidas de acordo com a presente invenção incluem albumina sérica humana como primeira proteína, hidrolisado de lactalbumina como
15 segunda proteína, e sacarose, maltose, trealose, ou sacarose, maltose, lactose como a combinação dos três diferentes dissacarídeos.

EXEMPLO 5

O agente de tamponamento ou os agentes de neutralização
20 de ácidos precisam ser administrados oralmente antes da administração de formulação oral líquida de vacina de rotavírus vivo e naturalmente atenuado a fim de neutralizar a acidez estomacal. O agente de tamponamento não se restringe a tampão de citrato-bicarbonato, tampão de fosfato, succinato,
25 lactato, maleato, fumarato, etc.

Composição Tampão de Neutralização de Ácido (gramas/litro): citrato de sódio 9,6, bicarbonato de sódio 25,6, pH 6,5 to 8,8.

A capacidade de neutralização de ácido (ANC) do tampão
30 de neutralização de ácido pode ser medida pelo teste USP.

A ANC de tampão de citrato-bicarbonato pode variar de 0,35 a 0,50 mEq/ml.

O efeito do tampão de citrato-bicarbonato (CB) sobre a infectividade de vacina de rotavírus monovalente na presença
35 e ausência de suco gástrico simulado (34,8 mEq HCl como suco gástrico simulado) pode ser estudado.

A formulação de vacina de rotavírus, juntamente com o tampão de citrato bicarbonato na presença de 34,8 mEq HCl como sucos gástricos simulados cai de 0,1 para 0,2 em log de título de rotavírus no prazo de duas horas.

5 **EXEMPLO 6**

Para a preparação de vacina de rotavírus liofilizada, o rotavírus é estabilizado na composição de estabilização segundo a presente invenção, conforme ilustrado no exemplo 4. Para a liofilização, o volume de rotavírus ou é submetido a
10 diálise no estabilizador para a remoção completa do meio de cultura de tecido ou diluído de 8 a 15 vezes no estabilizador. A formulação mostrou bons resultados no estudo da estabilidade.

Na especificação precedente, foram descritas modalidades
15 específicas da presente invenção. No entanto, uma pessoa de conhecimento normal da técnica estima que várias modificações e mudanças possam ser realizadas sem desviar do âmbito da presente invenção, tal como disposto nas reivindicações a seguir. Neste sentido, a especificação e as figuras devem ser
20 consideradas ilustrativas e não restritivas, e todas as referidas modificações têm por fim serem inclusas no âmbito da presente invenção. Os benefícios, vantagens, soluções de problemas e quaisquer elementos que possam acarretar benefício, vantagem ou solução a ocorrerem ou se tornarem
25 mais pronunciados não se devem interpretar como características ou elementos fundamentais, obrigatórios ou essenciais de todas ou quaisquer reivindicações. A invenção é definida única e exclusivamente pelas reivindicações em apenso, incluindo quaisquer aditamentos efetuados durante a
30 pendência deste pedido de registro e todos os equivalentes dessas reivindicações, tal como publicados.

As características da presente invenção divulgadas na especificação, as reivindicações e/ou nos desenhos anexos, podem, tanto separadamente quanto em qualquer combinação, ser
35 fundamentais para a realização da invenção nas suas várias formas.

REFERÊNCIAS

1. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. "Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children". *Emerg Infect Dis* 2003;9, 565-72.
- 5 2. Organização Mundial da Saúde (OMS). Relatório da reunião sobre os rumos futuros para a pesquisa com vacina de rotavírus em países em desenvolvimento. Genebra: OMS, 2000:1-56.
- 10 3. Bresee JS, Hummaman E, Nelson AS, Glass RI. "Rotavirus in Asia: The value of surveillance for informing decisions about the introduction of new vaccines". *J Infect Dis* 2005; 192: S1-S5.
- 15 4. Glass RI, Bhan MK, Ray P, Bahal R, Parashar UD, Greenberg H, Rao DC, Bhandari N, Maldonado Y, Ward RL, Bernstein DI, Gentsch JR. "Development of candidate rotavirus vaccines derived from neonatal strains in India". *J Infect Dis* 2005; 192: S30-S35.
- 20 5. Glass RI, Gentsch, Bhan MK, Bimal K. "Rotavirus strain G9P11". Patente dos Estados Unidos número 5.773.009, 30 de janeiro de 1998.
- 25 6. Jagannath MR, Vethanayagam Reddy BS, Raman S, Rao D. "Characterization of human symptomatic rotavirus isolates MP409 and MP480 having 'long' RNA electropherotype and subgroup I specificity, highly related to the P6[1], G8 type bovine rotavirus A5, from Mysore, India". *Arch. Virology* 2000, 145: 1-19.
- 30 7. Lopez S, Arias CF, Bell JR, Strauss JH, and Espejo RT. "Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity". *Virology* 1985, 144:11-19.
8. Ericson BL, Graham DY, Mason BB and Estes MK. "Two types of glycoprotein precursors are produced by simian rotavirus SA11". *Virology* 1983, 127:320-332.
- 35 9. Denisova E, Dowling W, LaMonica R, Shaw R, Scarlata S, Ruggeri F, and Mackow ER. "Rotavirus capsid protein VP5 permeabilizes membranes". *Journal of Virology* 1999, 73:3147-

3153.

10. Gentsch JR, Glass RI, Woods P, et. al.
"Identification of group A rotavirus gene 4 type by
polymerase chain reaction". J Clin Microbiol 1992, 30:1365-
5 73.

11. Gentsch JR, Das BK, Jiang B, Bhan MK, and Glass RI.
"Similarity of the VP4 protein of human rotavirus strain 116E
to that of the bovine B223 strain". Virology 1993,194,:424-
430.

10 12. "Stability of Pseudorabies virus during freeze
drying and storage: Effect of suspending media" Ellen M Scott
and W.Wood side. Journal of Clinical Microbiology. Julho de
1976.p 1-5. Vol.4.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, **caracterizada** pelo fato de compreender:
um antígeno viral,

uma primeira proteína diferente do dito antígeno viral,
5 a dita primeira proteína sendo selecionada a partir de
albumina de soro humano, e

uma segunda proteína diferente do dito antígeno viral,
que a segunda proteína é, pelo menos parcialmente
hidrolisada, a dita segunda proteína sendo selecionada a
10 partir de hidrolisato de lactoalbumina, hidrolisato de
levedura, peptona, hidrolisato de gelatina, e hidrolisato de
proteínas de ovo, e

três diferentes dissacarídeos.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1,
15 **caracterizada** pelo fato de que os ditos três diferentes
dissacarídeos são selecionados a partir de sacarose, lactose,
maltose, trealose, cellobiose, gentobiose, melibiose e
turanose.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1,
20 **caracterizada** por compreender ainda um açúcar primário e pelo
menos dois açúcares secundários, onde os açúcares primário e
secundário são independentemente selecionados a partir de uma
lista compreendendo sacarose, trealose, maltose, lactose,
gentobiose, melibiose, cellobiose e turanose.

25 4. Composição, de acordo com a reivindicação 3,
caracterizada pelo fato de que o açúcar primário é sacarose
e, pelo menos um dos açúcares secundários é lactose.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 4,
caracterizada pelo fato de que o açúcar primário é sacarose,
30 que está presente em cerca de 40% (p/v) a 55% (p/v), mais
preferivelmente a 50% (p/v).

6. Composição, de acordo com qualquer uma das
reivindicações 3-5, **caracterizada** pelo fato de que pelo menos
um dos açúcares secundários é maltose, que está presente em
35 cerca de 0,1% (p/v) a 10,0% (p/v), de preferência 0,5% (p/v).

7. Composição, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1-6, **caracterizada** pelo fato de que os três diferentes dissacarídeos, de acordo com qualquer reivindicação 2-3, ou o açúcar primário e, pelo menos dois dos açúcares secundários, de acordo com qualquer uma das
5 reivindicações 4-7, são uma combinação selecionada a partir da lista das seguintes combinações:

- a) sacarose, lactose e maltose
- b) sacarose, maltose e trealose
- c) sacarose, lactose e trealose
- 10 d) maltose, lactose e trealose.

8. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-7, **caracterizada** pelo fato de que a concentração combinada de açúcares ou dissacarídeos é de cerca de 20%-75% (p/v).

15 9. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, **caracterizada** pelo fato de que a concentração do respectivo açúcar se incluída na composição é a seguinte: sacarose cerca de 40% a 55% (p/v), preferencialmente 50% (p/v), lactose cerca de 0,1% a 10,0%
20 (p/v) preferencialmente 0,5% (p/v), maltose cerca de 0,1% (p/v) a 10% (p/v) preferencialmente 0,5% (p/v), trealose cerca de 0,1% (p/v) a 10,0% (p/v) preferencialmente 0,5% (p/v).

10. Composição, de acordo com qualquer uma das
25 reivindicações precedentes, **caracterizada** pelo fato de que a dita primeira proteína está presente na formulação em uma quantidade no intervalo de 0,1% (p/v) a 0,45% (p/v) e a dita segunda proteína que é pelo menos parcialmente hidrolisada está presente na formulação, como pelo menos hidrolisato
30 parcial, em uma quantidade no intervalo de 0,01% (p/v) a 10% (p/v).

11. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizada** pelo fato de ainda compreender um tampão para ajustar o pH da dita composição,
35 de preferência para um valor no intervalo de 6,8 a 7,8.

12. Composição, de acordo com a reivindicação 11,

caracterizada pelo fato de que o dito tampão é um tampão fosfato.

13. Composição, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizada** pelo fato de que a concentração de fosfato está
5 entre 310 mM e 400 mM.

14. Composição, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada** pelo fato de que o dito tampão é um tampão citrato.

15. Composição, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizada** pelo fato de que a concentração de citrato está
10 entre 25 mM a 150 mM.

16. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11-15, **caracterizada** pelo fato de que o tampão é um tampão citrato-fosfato em um pH cerca de 6,8 para 7,8, e
15 de preferência a concentração de fosfato é de aproximadamente 310 mM e a concentração de citrato é de aproximadamente 100 mM.

17. Composição, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada** pelo fato de que o dito tampão é um tampão citrato/carbonato em um pH entre 6,8 e 7,8.
20

18. Composição, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada** pelo fato de que o dito tampão é um tampão sacarose/fosfato/glutamato em um pH entre 6,8 e 7,8.

19. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizada** pelo fato de
25 compreender ainda pelo menos um diluente selecionado a partir de uma lista compreendendo meio de cultura de tecido, solução salina normal, solução salina tamponada com fosfato e água.

20. Composição, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizada** pelo fato de que o diluente é Meio Essencial Mínimo de Eagle.
30

21. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizada** pelo fato de que o dito antígeno viral é um vírus vivo, tal como um vírus vivo
35 atenuado naturalmente.

22. Composição, de acordo com a reivindicação 21,

caracterizada pelo fato de que o dito vírus vivo é selecionado a partir do grupo compreendendo rotavírus.

23. Composição, de acordo com qualquer reivindicações 21-22, **caracterizada** pelo fato de que o dito vírus vivo é um
5 vírus vivo humano, tais como rotavírus humano, rotavírus bovino, rotavírus suíno e vírus remisturado humano-bovino.

24. Composição, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizada** pelo fato de que o dito rotavírus humano é reassortant natural humano-bovino, de preferência cepa de
10 rotavírus 116E ou I 321.

25. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 21-24, **caracterizada** pelo fato de compreender um rotavírus vivo em um título no intervalo de 10^4 a 10^7 FFU/0.5 ml.

15 26. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizada** pelo fato de ser uma vacina.

27. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizada** pelo fato de ser
20 uma vacina líquida.

28. Composição, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizada** pelo fato de que a dita composição é estável em pelo menos uma das seguintes condições: durante 3 semanas a 37 °C, durante seis meses a 25 °C, durante um ano a 2°C-8°C.

25 29. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizada** pelo fato de ser uma vacina liofilizada.

30 30. Composição, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizada** pelo fato de compreender um antígeno viral como definido em qualquer uma das reivindicações 1-30, albumina de soro humano, Gelatina, em pelo menos um dissacarídeo, tais como maltose, trealose, sacarose, lactose, em pelo menos um aminoácido, tais como L-glutamina, L-arginina, pelo menos um açúcar-álcool, como D-manitol ou D-Sorbitol, onde cada um dos
35 componentes acima referidos está em um intervalo de concentração de 0,1% a 10% (p/v), em um tampão veículo

farmaceuticamente aceitável.

31. Composição liofilizada, como definida em qualquer uma das reivindicações 29-30, **caracterizada** pelo fato de que a dita composição é estável por mais de 50 semanas a 2°C-8°C, 25°C, 37°C.

32. Uso de antígeno viral, uma primeira proteína e uma segunda proteína, cada uma delas sendo como definida em qualquer reivindicação, e, três diferentes dissacarídeos, como definidos em qualquer uma das reivindicações 1-31, para a fabricação de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-31, **caracterizado** pelo fato de ser de preferência para a fabricação de uma vacina, para o tratamento ou prevenção de vírus associado, de preferência doenças associadas a rotavírus, tais como diarreia e gastroenterite.

33. Uso, de acordo com a reivindicação 32, **caracterizado** pelo fato de que o dito tratamento ou prevenção compreende administrar mais de três doses orais de uma quantidade segura e eficaz da composição a um bebê de 8-20 semanas de idade no momento da dose 1.

34. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32-33, **caracterizado** pelo fato de ser para a prevenção de uma infecção por vírus, de preferência uma infecção por rotavírus e/ou gastroenterite por rotavírus em humanos.

35. Método de tratamento ou prevenção de vírus associado, **caracterizado** pelo fato de compreender de preferência doenças associadas a rotavírus em humanos por meio de administração a humano de uma quantidade eficaz da composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 1-31.

36. Método, de acordo com a reivindicação 35, **caracterizado** pelo fato de compreender não administrar mais de três doses de uma quantidade segura e eficaz da composição a um bebê dentro de 8-20 semanas de idade no momento da dose 1.

37. Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 35-36, **caracterizado** pelo fato de ser para a prevenção de uma infecção por vírus, de preferência uma infecção por rotavírus e/ou gastroenterite por rotavírus em humanos.

5 38. Método de adaptação de um vírus de uma linhagem celular adequada, tais como células Vero, **caracterizado** pelo fato de compreender a passagem serialmente do dito vírus através de culturas da dita linhagem celular adequada, cada
10 passagem ocorrendo em um meio na presença de cloreto de cálcio e tripsina.

 39. Método, de acordo com a reivindicação 38, **caracterizado** pelo fato de que o dito cloreto de cálcio está presente no intervalo de 0,1 mg/ml a 1 mg/ml, e a dita tripsina está presente no intervalo de 0,1 µg/ml para 30
15 µg/ml.

 40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38-39, **caracterizado** pelo fato de que as ditas passagens seriais compreendem 2-20 passagens, de preferência 2-5 passagens.

20 41. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38-40, **caracterizado** pelo fato de que cada passagem ocorre ao longo de um período de tempo no intervalo de 24 horas a 10 dias.

 42. Método, de acordo com qualquer uma das
25 reivindicações 38-41, **caracterizado** pelo fato de que o dito vírus é um rotavírus.

Fig 1. Dados de estabilidade para formulação líquida de rotavírus com diferentes estabilizadores depois do armazenamento a 2-8°C

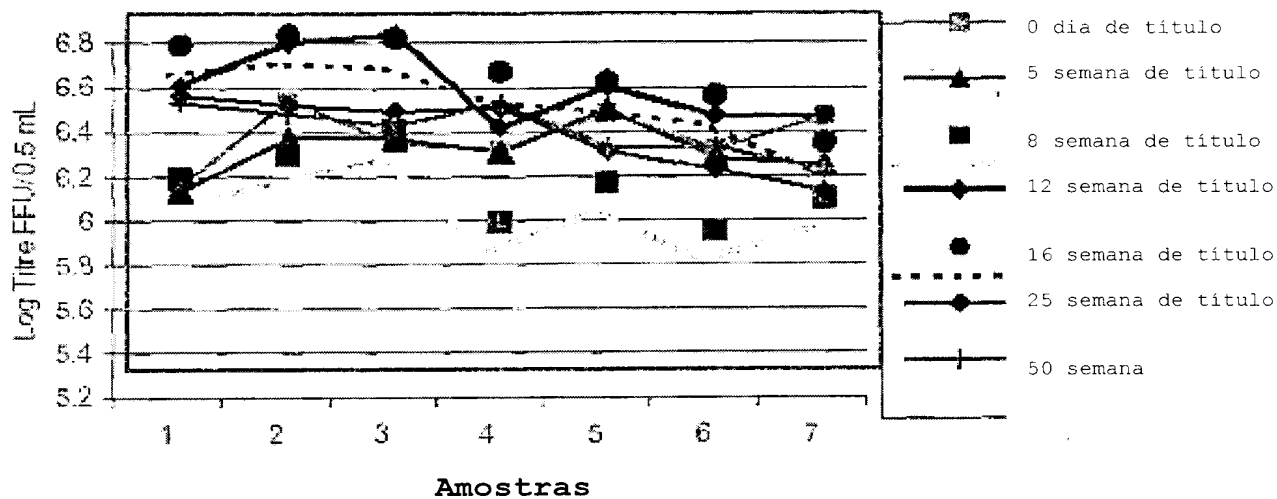


Fig. 1

Fig 2. Dados de estabilidade para formulação líquida de rotavírus com diferentes estabilizadores depois do armazenamento a 25°C

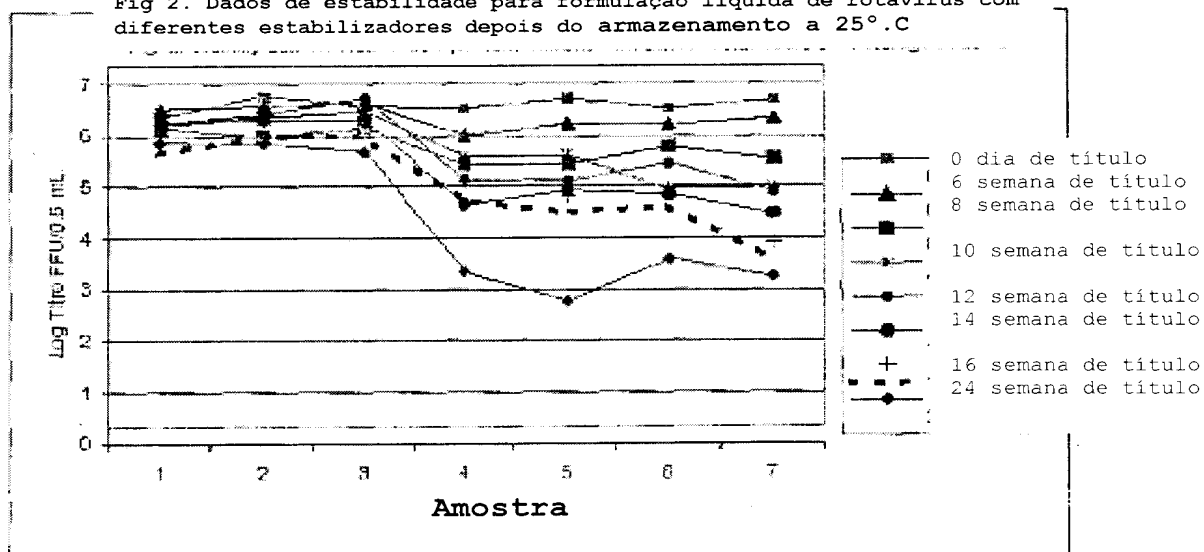


FIG. 2

Fig 3. Dados de estabilidade para formulação líquida de rotavírus com diferentes estabilizadores depois do armazenamento a 37°

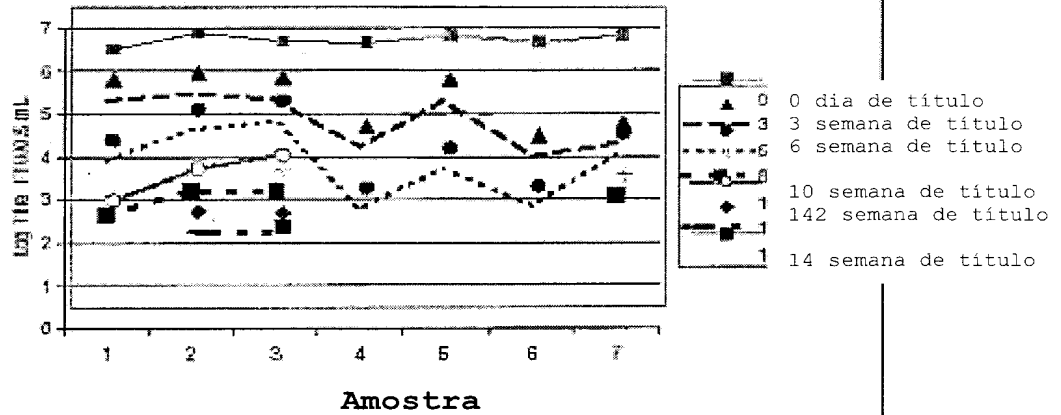


Fig. 3

Fig 4. Dados de estabilidade para formulação líquida de rotavírus com diferentes estabilizadores depois do armazenamento a 2-8°C, 25°C e 37°C-Amostra 1.

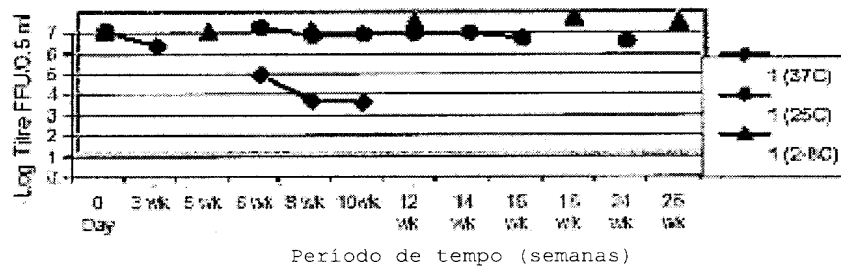


Fig. 4

Fig 5. Dados de estabilidade para formulação líquida de rotavírus com diferentes estabilizadores depois do armazenamento a 2-8°C, 25°C e 37°C-Amostra 2

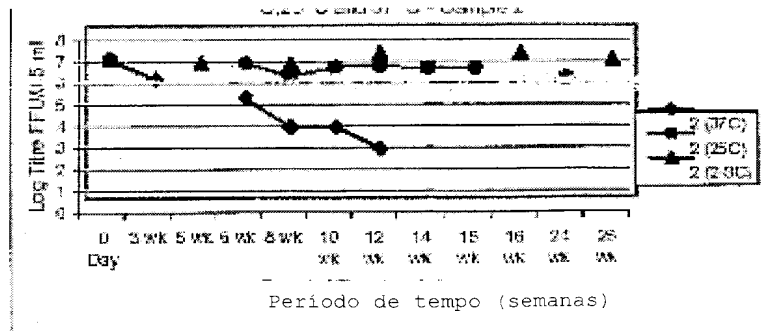


Fig. 5

Fig 6. Dados de estabilidade para formulação líquida de rotavírus com diferentes estabilizadores depois do armazenamento a 2-8°C, 25°C e 37°C-Amostra 3

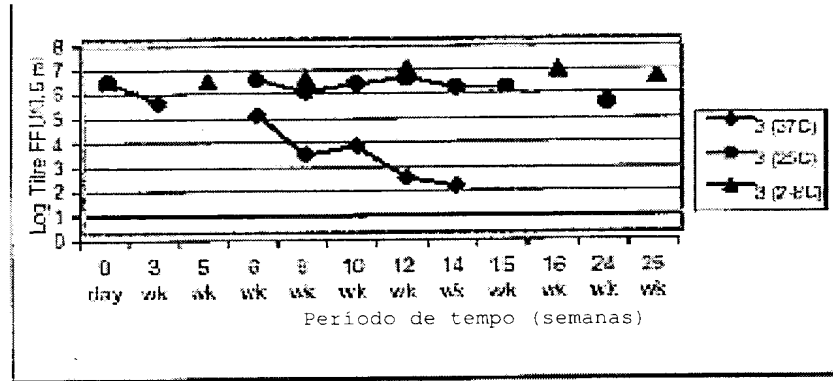


Fig. 6

Fig 7. Dados de estabilidade para formulação líquida de rotavírus com diferentes estabilizadores depois do armazenamento a 2-8°C, 25°C e 37°C-Amostra 4

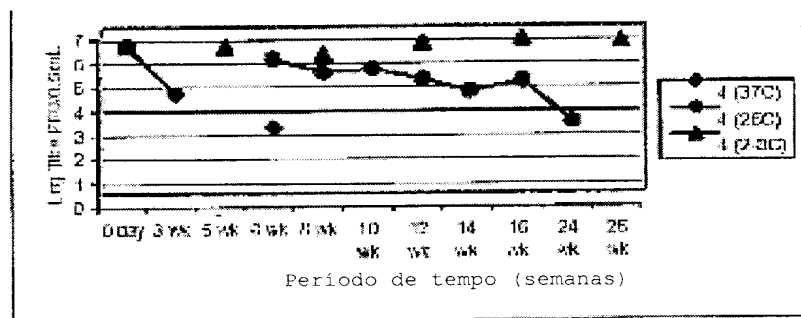


Fig. 7

Fig 8. Dados de estabilidade para formulação líquida de rotavírus com diferentes estabilizadores depois do armazenamento a 2-8°C, 25°C e 37°C-Amostra 5

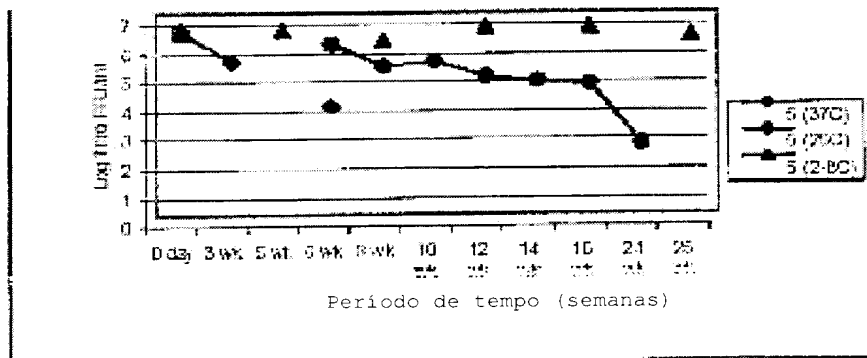


Fig. 8

Fig 9. Dados de estabilidade para formulação líquida de rotavírus com diferentes estabilizadores depois do armazenamento a 2-8°C, 25°C e 37°C-Amostra 6

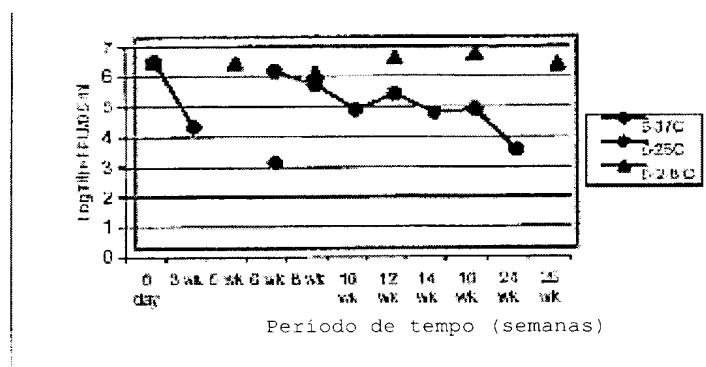


Fig. 9

Fig 10. Dados de estabilidade para formulação líquida de rotavírus com diferentes estabilizadores depois do armazenamento a 2-8°C, 25°C e 37°C-Amostra 7

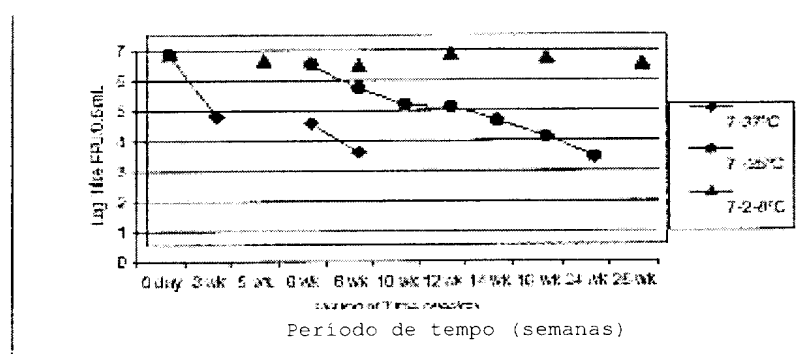


Fig. 10

Fig 11. Dados de estabilidade para formulação liofilizada de rotavírus com estabilizadores depois do armazenamento em diferentes temperaturas

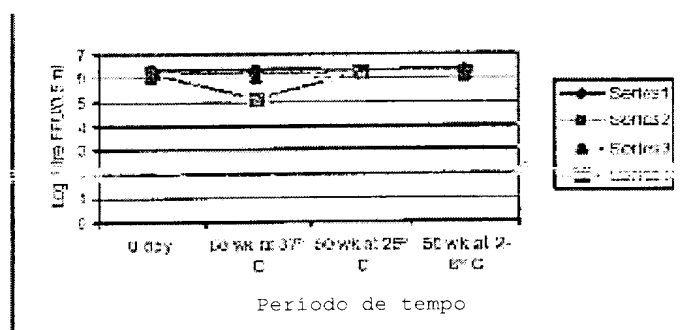


Fig. 11

Fig 12. ensaio quantitativo (ensaio imunoperoxidase) de uma cultura de rotavírus adaptada em diferentes concentrações de tripsina.

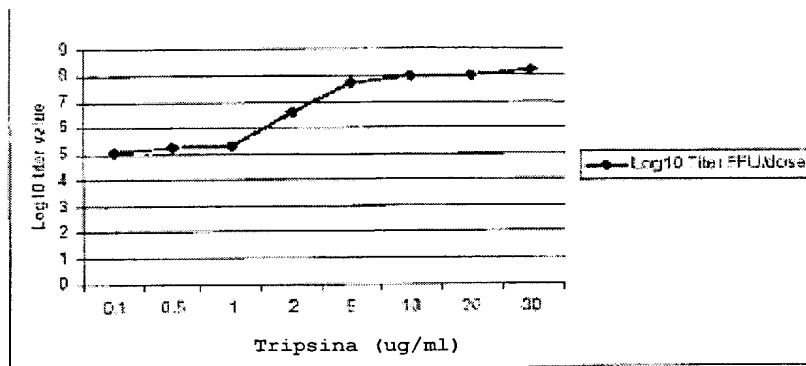


Fig. 12

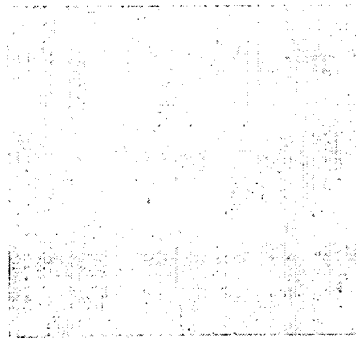


Fig. 13

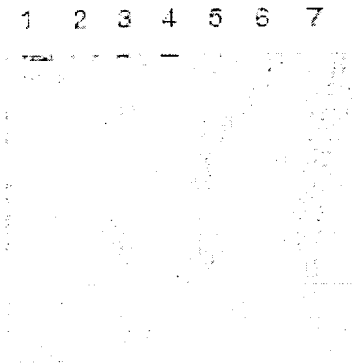


Fig. 14

**COMPOSIÇÃO LIOFILIZADA, USO DE ANTÍGENO VIRAL, MÉTODO DE
TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE VÍRUS ASSOCIADO, MÉTODO DE
ADAPTAÇÃO DE UM VÍRUS DE UMA LINHAGEM CELULAR ADEQUADA**

A presente invenção refere-se a uma composição
5 compreendendo um antígeno viral, uma primeira proteína e uma
segunda proteína. Opcionalmente, a composição igualmente
compreende três dissacarídeos diferentes, ou, opcionalmente,
a composição compreende um açúcar primário e pelo menos um,
preferivelmente dois açúcares secundários. A presente
10 invenção igualmente refere-se ao uso de um antígeno viral, de
uma primeira proteína e de uma segunda proteína para a
fabricação de uma composição, preferivelmente uma vacina. A
presente invenção, além disso, refere-se a um método de
tratamento ou prevenção do vírus associado a doenças nos
15 humanos. Além disso, a presente invenção refere-se a um
método de adaptar um vírus a uma linhagem celular apropriada.
A invenção é igualmente útil para a produção de suspensões de
vírus apropriadas para fazer composições de vacinais de
rotavírus estáveis, vivas/inativadas, monovalentes e/ou
20 polivalentes, líquidas/lioofilizadas para meio de
administração oral e/ou nasal ou qualquer outro meio
apropriado em humano.