



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

**(11) PI 1007721-9 B1**



\* B R F I 1 0 0 7 7 2 1 B 1 \*

**(22) Data do Depósito: 12/05/2010**

**(45) Data de Concessão: 28/04/2020**

---

**(54) Título:** COMPOSIÇÃO DE VACINA PARA USO NA INDUÇÃO DE UMA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA UM ROTAVÍRUS EM UM INDIVÍDUO, CEPA DE ROTAVÍRUS ISOLADO DE CDC-9 E CEPA DE ROTAVÍRUS ISOLADO DE CDC-66

**(51) Int.Cl.:** A61K 39/12; A61K 39/42; A61K 39/39; A61K 38/16; A61P 37/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 12/05/2009 US 61/177,393.

**(73) Titular(es):** THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.

**(72) Inventor(es):** BAOMING JIANG; ROGER I. GLASS; YUHUAN WANG; JON GENTSCH.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2010034537 de 12/05/2010

**(87) Publicação PCT:** WO 2010/132561 de 18/11/2010

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 11/11/2011

**(57) Resumo:** COMPOSIÇÃO DE VACINA PARA USO NA INDUÇÃO DE UMA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA UM ROTAVÍRUS EM UM INDIVÍDUO, CEPA DE ROTAVÍRUS ISOLADO DE CDC-9 E CEPA DE ROTAVÍRUS ISOLADO DE CDC-66  
Uma composição de vacina e método para vacinação são providas úteis para imunização de um indivíduo contra um rotavírus. As vacinas incluem cepas de rotavírus CDC-9 e CDC-66, fragmentos dos mesmos, homólogos dos mesmos, ou combinações dos mesmos. As vacinas da invenção podem incluir um fragmento de CDC-9, CDC-66, homólogos dos mesmos, ou combinações dos mesmos. Métodos para induzir uma resposta imunológica são providos através da administração de uma vacina da invenção.

"COMPOSIÇÃO DE VACINA PARA USO NA INDUÇÃO DE UMA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA UM ROTAVÍRUS EM UM INDIVÍDUO, CEPA DE ROTAVÍRUS ISOLADO DE CDC-9 E CEPA DE ROTAVÍRUS ISOLADO DE CDC-66""

Campo da invenção

[0001] A presente invenção refere-se genericamente a cepas de vacina de vírus, bem como as composições de vacina e métodos relacionados às mesmas. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a cepas de vacina de rotavírus A humano, composições de vacina e métodos de uso para induzir uma resposta imunológica contra o rotavírus A em um indivíduo.

Antecedentes da invenção

[0002] Dos vários vírus entéricos patogênicos causadores de diarreia severas em crianças, o rotavírus é a causa mais comum em uma média de 611.000 mortes por ano. Virtualmente, todas as crianças são infectadas pelo rotavírus em uma idade de 5 anos. Acredita-se que o vírus seja altamente contagioso e foi descrito como um vírus "democrático" uma vez que a infecção afeta desproporcionalmente, sem discriminação socioeconômica particular ou grupo geográfico. Apesar de a maioria das crianças terem acesso a um suporte adequado e a cuidados médicos paliativos, a sobrevivência à infecção sem conseqüências significantes por longos períodos, o número de mortes associadas com diarreia severa, com vômitos, desidratação e choques é inaceitável e requer, sempre que possível intervenção preventiva.

[0003] O rotavírus A é um vírus icosaédrico da família *Reoviridae* com uma morfologia distinta de roda dentada ("hub-and-spoke"). Os rotavírus particulares são classificados por

grupo, subgrupo e sorotipo de acordo com as propriedades características das proteínas do capsídeo viral. As partículas de rotavírus contém 3 camadas de proteínas em torno do genoma viral que consiste de 11 segmentos de fita duplas de RNA, cada um dos segmentos codificante de uma proteína. As proteínas virais incluem proteínas estruturais chamadas VPs e proteínas não-estruturais designadas como NSPs. Algumas das proteínas estruturas são particularmente importantes na indução de uma resposta imune em um hospedeiro uma vez que estas proteínas estão presentes na superfície externa das partículas virais. Em particular, as proteínas VP7 e VP4, ambas figuras proeminentes na resposta imune do hospedeiro e, portanto, representam também uma regra central no desenvolvimento das vacinas de rotavírus.

[0004] As variantes das proteínas estruturais VP7 e VP caracterizam rotavírus A de sorotipo distintos. Em particular, variantes de VP7 humano são identificadas como sorotipo "G" incluindo pelo menos os sorotipos G1, G2, G3, G4, bem como os menos comuns G5, G6, G8, G9, G10, G11, G12, G13 e G14. As variantes da proteína estrutural VP4 são identificadas como sorotipos "P" incluindo P1A, P1B, P2A, P3, P4, P5, P6 e P8. Uma vez que os rotavírus intactos são caracterizados por ambas as proteínas, proteína VP7 e proteína VP4, os sorotipos de vírus individuais são denominados de acordo com a identidade da variante destas duas proteínas contidas no vírus particular. Por exemplo, um rotavírus A comum contém ambas as variantes, G1 e P[8], de VP7 e VP4, respectivamente. A G1, sorotipo P[8] do rotavírus A é uma das formas mais comuns do vírus que causa a doença mundialmente. O sorotipo G1 do rotavírus A é o sorotipo mais

comum associado com a doença humana mundial. Um número de vacinas foi desenvolvido, as quais utilizam o rotavírus A cepa G1 com o objetivo de desenvolver imunidade em um hospedeiro contra o rotavírus A cepa G1, bem como para a cepa de rotavírus A tendo outros sorotipos. Entretanto, esta pesquisa foi limitada pelas importantes diferenças entre os sorotipos G1 e G2. Em particular, os rotavírus A, cepa G2, são derivados de linhagens diferentes daquelas da maioria das outras cepas de rotavírus. Isto é demonstrado através dos experimentos de hibridização do ácido nucleico mostrando que os transcritos marcados dos 11 segmentos de genes das cepas G2, também conhecidos como genogrupos DS-1, não hibridizam com os ácidos nucleicos correspondentes a partir da cepa conhecida como genogrupo Wa do rotavírus A, que inclui G1, G3, G4, e G9. A perda da hibridização destes genes homólogos indica que as diferenças nas proteínas codificantes, tal como proteínas externas do capsídeo VP4 e VP7 e proteínas internas do capsídeo VP6, são substanciais. Estas diferenças genéticas suportam as observações de que indivíduos infectados ou imunizados usando uma cepa G1 são menos suscetíveis de demonstrar proteção contra cepas G2 mais do que outras cepas do genogrupo Wa.

[0005] Em adição, para os rotavírus A comuns de cepa G1 e G2, uma diversidade de tipos de rotavírus humanos é incrivelmente reconhecida como contribuinte para atuar em doenças de diarreia severas mundiais. Esta diversidade ressalta a necessidade de vacinas robustas capazes de produzir imunidade contra várias cepas. Recentemente, o FDA dos Estados Unidos ("United States Food and Drug Administration") suspendeu o uso da vacina ROTARIX citando

contaminantes em sua preparação. Assim, o número de vacinas disponíveis para rotavírus foi diminuído em um período em que as infecções permanecem como um problema mundialmente sério. Uma outra vacina, RotaTeq®, parece segura e eficaz na prevenção de diarreia entre as crianças em países com renda média e alta e são atualmente licenciadas e recomendadas para uso em bebês em todo o mundo. Entretanto, a eficácia desta vacina é reduzida em países com baixa renda, como África e Ásia.

[0006] Portanto, existe uma necessidade contínua para vacinas contra rotavírus A humano de ambos os tipos, comum e menos comum.

#### Breve descrição dos desenhos

[0007] A figura 1A ilustra uma imagem xerográfica de uma micrografia de elétron demonstrando os vírions do rotavírus A isolado intacta, identificado como cepa CDC-9, tendo sorotipo P[8], G1;

[0008] A figura 1B ilustra uma imagem xerográfica de uma micrografia de elétron demonstrando os vírions do rotavírus A isolado intacta, identificado como cepa CDC-66, tendo sorotipo P[4], G2;

[0009] A figura 2 ilustra uma reprodução xerográfica de uma imagem de um gel de poliacrilamida ilustrando o perfil do RNA do rotavírus A cepa CDC-9, isolada a partir de uma amostra (S) de excremento e células Vero (V) e demonstrando eletroferótipos típicos de RNA longos (CDC-9) para a cepa de rotavírus;

[0010] A figura 3 ilustra uma reprodução xerográfica de uma imagem de um gel de poliacrilamida ilustrando perfil de RNA do rotavírus A da cepa CDC-66, isolada a partir de uma

amostra de excremento e células Vero e demonstrando um eletroferótipo típico de RNA curto para esta cepa de rotavírus;

[0011] A figura 4A ilustra as bandas das partículas de rotavírus purificadas CsCl de uma cepa CDC-9 de rotavírus A;

[0012] A figura 4B ilustra as proteínas virais estruturais identificadas da cepa CDC-9 do rotavírus A analisada por SDS-PAGE em comparação a um marcador de peso molecular;

[0013] A figura 5A ilustra um gráfico de barras demonstrando a titulação total dos anticorpos em resposta a um rotavírus inativado termicamente em camundongos controle e camundongos vacinados;

[0014] A figura 5B ilustra um gráfico de barras demonstrando a neutralização da titulação dos anticorpos em resposta aos rotavírus inativados termicamente em camundongo controle e camundongo vacinado;

[0015] A figura 6 ilustra um gráfico de barras demonstrando as respostas dos anticorpos em soro total para os rotavírus inativados termicamente formulados com  $Al(OH)_3$  em camundongos controle e camundongos vacinados;

[0016] A figura 7A demonstra a projeção do vírus em amostras de fezes de porcos vacinados sem o antígeno e com 750 microgramas de fosfato de alumínio em 4 animais;

[0017] A figura 7B demonstra a projeção do vírus em amostras fecais obtida de porcos imunizados com antígeno e sem adjuvante;

[0018] A figura 7C demonstra uma projeção do vírus em amostras fecais obtidas de porcos imunizados com antígeno e adjuvante;

[0019] A figura 7D demonstra uma projeção de vírus medida

em amostras fecais de porcos imunizados com tampão apenas;

[0020] A figura 8A ilustra um gráfico de barras demonstrando a resposta do anticorpo IgG específico para o rotavírus no soro de porcos vacinados sem antígeno e com 600 microgramas de fosfato de alumínio (barras sólidas) ou porcos vacinados com 50 microgramas do antígeno e com 600 microgramas de fosfato de alumínio (barras hachuradas);

[0021] A figura 8B ilustra um gráfico de barras demonstrando a resposta neutralizada do anticorpo no soro de porcos vacinados sem antígeno e com 600 microgramas de fosfato de alumínio ou porcos vacinados com 50 microgramas do antígeno e com 600 microgramas de fosfato de alumínio;

[0022] A figura 9A demonstra a projeção do vírus em amostras fecais de porcos vacinados sem antígeno e com 600 microgramas de fosfato de alumínio; e

[0023] A figura 9B demonstra a projeção do vírus em amostras fecais de porcos vacinados com 50 microgramas de antígeno e com 600 microgramas de fosfato de alumínio.

#### Sumário da invenção

[0024] Uma composição de vacina é provida incluindo uma ou mais cepas de rotavírus isolados, ilustrando a cepa CDC-9 ou CDC-66 em combinação com um veículo farmacologicamente aceitável. Uma vacina da invenção inclui, opcionalmente, um adjuvante.

[0025] As cepas CDC-9 ou CDC-66 em uma vacina da presente invenção são opcionalmente rotavírus atenuados vivos ou rotavírus atenuados.

[0026] É apreciado que uma vacina da invenção inclui, opcionalmente, pelo menos duas cepas de rotavírus isolados. Pelo menos duas cepas de rotavírus isolados cada um têm,

independentemente, um sorotipo do grupo G, de G1, G2, G3, G4, G5, G6, G6, G7, G8, G9, G10, G11, G12, G13 ou G14. Opcionalmente, pelo menos duas cepas de rotavírus isolados têm cada uma, independentemente, um grupo P de sorotipo P1A, P1B, P2A, P3, P4, P5, P6, P8, P11, ou P12.

[0027] Uma vacina da invenção é, opcionalmente, administrada parenteralmente ou oralmente.

[0028] Uma cepa de rotavírus isolada também é provida, a qual é uma cepa CDC-9 ou uma cepa CDC-66 ilustrativa.

[0029] Uma vacina inventiva é provida, a qual inclui um veículo farmacêuticamente aceitável misturada com uma cepa de rotavírus isolada caracterizada como tendo um sorotipo do grupo G1 e uma cepa do rotavírus isolada caracterizada como tendo um sorotipo do grupo G2. As cepas do sorotipo do grupo G1 ou G2 têm opcionalmente cada uma independentemente, um sorotipo do grupo P de P1A, P1B, P2A, P3, P4, P5, P6, P8, P11 ou P12. Em algumas concretizações da cepa de rotavírus humano caracterizada como tendo um sorotipo do grupo G1, é CDC-9, ou a cepa de rotavírus humano caracterizada como tendo um sorotipo do grupo G2 que é CDC-66.

[0030] Um método para induzir uma resposta imunológica para um rotavírus em um indivíduo é provido incluindo a administração de uma composição de vacina incluindo um veículo farmacêuticamente aceitável misturada com uma cepa de rotavírus humano isolada de CDC-9 Ou cdc-66.

[0031] Um método para induzir uma resposta imunológica para um rotavírus em um indivíduo é provido incluindo administração a uma composição de vacina incluindo um veículo farmacêuticamente aceitável misturado com uma cepa de rotavírus humano caracterizada como tendo um sorotipo do

grupo G1 e uma cepa de rotavírus humano isolada, caracterizada como tendo um sorotipo do grupo G2.

[0032] Também provida é uma vacina que inclui um veículo farmacêuticamente aceitável misturada com uma porção de um rotavírus humano isolado. A porção de rotavírus humana isolada é um peptídeo ou polipeptídeo incluindo uma seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 71; SEQ ID NO: 77; SEQ ID NO: 83; SEQ ID NO: 89; SEQ ID NO: 95; SEQ ID NO: 101; SEQ ID NO: 107; SEQ ID NO: 113; SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 125; SEQ ID NO: 131; SEQ ID NO: 72; SEQ ID NO: 78; SEQ ID NO: 84; SEQ ID NO: 90; SEQ ID NO: 96; SEQ ID NO: 102; SEQ ID NO: 108; SEQ ID NO: 114; SEQ ID NO: 120; SEQ ID NO: 126; SEQ ID NO: 132; um homólogo dos mesmos ou um fragmento do mesmo.

Descrição detalhada das concretizações preferidas

[0033] Cepas de rotavírus a humano isolado, vacinas incluindo cepas de rotavírus A humano, vacinas incluindo um polipeptídeo de rotavírus a humano e/ou um fragmento imunogênico do mesmo, anticorpos anti-rotavírus A e métodos para vacinação humana contra doença do rotavírus A são providos de acordo com as concretizações da presente invenção.

[0034] Os termos científicos e técnicos utilizados aqui são pretendidos como tendo os significados comumente entendidos pelos técnicos no assunto. Os referidos termos são

pretendidos como sendo definidos e utilizados no contexto de várias referências padrões, ilustrativamente incluindo "J. Sambrook and D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd edition, 2001; f.M. Ausubel, Ed. *Short Protocols in Molecular Biology*, current Protocols; 5th Edition, 2002; B. Alberts et al, *Molecular Biology of the Cell*, 4<sup>th</sup> Ed., Garland, 2002; D.L. Nelson and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4<sup>th</sup> Ed., W.H. Freeman & Company, 2004; Wild, d., *The Immunoassay Handbook*, 3<sup>rd</sup> Ed., Elsevier Science, 2005; Gosling, J. P. *Immunoassays: A Practical Approach*, Practical Approach Series, Oxford University Press, 2005; *Antibody Engineering*, Kontermann, R. and Dübel, S. (Eds.), Springer, 2001; Harlow, E. and Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Ausubel, F. et al., (Eds.), *Short Protocols in Molecular Biology*, Wiley, 2002; J. D. Pound (Ed.), *Immunochemical Protocols*, Methods in Molecular Biology, Humana Press; 2<sup>nd</sup> ed., 1998; B.K.C. Lo (ed.), *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2003; and Kohler, G. and Milstein, C., *Nature*, 256:495-497 (1975)"; o conteúdo de cada uma dessas referências sendo incorporado aqui por referência.

#### Rotavírus humano

[0035] As novas cepas de rotavírus A humano da presente invenção são ilustrativamente identificadas como CDC-9 e CDC-66, fragmentos dos mesmos ou homólogos dos mesmos.

[0036] A cepa de rotavírus a CDC-9 foi isolada de uma espécime fecal de um garoto de 5 meses, de Providence, Rhode Island. A cepa de rotavírus humana CDC-9 foi caracterizada

por RT-PCR usando primers tipo específico G e P. a análise RT-PCR indica que a cepa isolada CDC-9 é uma cepa tendo um genótipo P[8], G1. As características particulares de CDC-9, sua identificação, isolamento, e passagens nas células Vero foram descritos por Esona, MD, et al., "*Human Vaccines*", 2010; 6:1-7, o conteúdo total do qual sendo incorporado aqui por referência.

[0037] O isolamento a seguir a partir da amostra fecal, da cepa de rotavírus isolada CDC-9 foi adaptada para crescimento em células MA104 que foram preparadas e congeladas antes de 1980 e têm documentação completa. A cepa CDC-9 foi então adaptada ao crescimento em células Vero qualificadas para produção de vacina. A CDC-9 foi purificada através da realização de 3 rodadas de diluição limitativa e após a amplificação em células Vero, foi purificada adicionalmente através de 3 rodadas de análise em placas. A cepa isolada CDC-9 foi passada 7 e 38 vezes em células MA104 e células Vero, respectivamente (total de 45 passagens). A adaptação e todas as passagens são feitas utilizando procedimentos de operação padrão e materiais brutos certificados e reagentes e sob o Guia de boas práticas laboratoriais. Apesar de outras referências ou cepas de laboratórios, a cepa isolada CDC-9 teve um relatório histórico e documentação completos.

[0038] A titulação da cepa de rotavírus humano passada CDC-9 foi de cerca de  $10^7$  pfu/ml.

[0039] A cepa de rotavírus humana isolada CDC-9 foi estudada através de microscopia eletrônica usando vírions CDC-9 isolados a partir do meio de culturas de célula Vero infectadas. A figura 1A mostrou uma micrografia de elétron dos vírions CDC-9 isolados. A micrografia mostra que os

vírions tinham uma morfologia típica dos vírions do rotavírus humano.

[0040] A cepa CDC-9 de rotavírus humano isolado foi ainda examinada utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida do RNA isolado obtido da cepa. Como mostrado na figura 2, o CDC-9 teve um eletroferótipo de RNA longo típico e o perfil de RNA de ambos, o isolado original obtido de excremento e do rotavírus passado em Vero foram idênticos. Também foi mostrado na figura 2 um padrão para comparação, incluindo um perfil de RNA de um genogrupo Wa do rotavírus humano.

[0041] A cepa CDC-9 do rotavírus humanos isolada de excremento e de células Vero (27 passagens) foi analisada através do ensaio de sequência do genoma total.

[0042] As sequências de aminoácidos de CDC-9 das proteínas codificadas através dos ácidos nucleicos isolados obtidos de uma amostra de excremento: CDC9 NSP1 aa - no excremento foi SEQ ID NO: 2; CDC9 NSP 2 aa - foi SEQ ID NO: 5; CDC9 NSP3 aa - foi SEQ ID NO: 8; CDC9 NSP4 aa - foi SEQ ID NO: 11; CDC9 NSP 5 aa - foi SEQ ID NO: 14; CDC9 VP1 aa - foi SEQ ID NO: 17; CDC9 VP 2 aa - foi SEQ ID NO: 20; CDC9 VP 3 aa - foi SEQ ID NO: 23; CDC9 VP 4 aa - foi SEQ ID NO: 26; CDC9 VP 6 aa - foi SEQ ID NO: 29; e CDC9 VP 7 aa - foi SEQ ID NO: 32.

[0043] As sequências de nucleotídeos CDC9 dos ácidos nucleicos isolados de uma amostra de excrementos: CDC9 NSP1 nt - no excremento foi SEQ ID NO: 35; CDC9 NSP2 nt - foi SEQ ID NO: 38; CDC9 NSP 3 nt - foi SEQ ID NO: 41; CDC9 NSP 4 nt - foi SEQ ID NO: 44; CDC9 NSP 5 nt - foi SEQ ID NO: 47; CDC9 VP1 nt - foi SEQ ID NO: 50; CDC9 VP 2 nt - foi SEQ ID NO: 53; CDC9 VP 3 nt - foi SEQ ID NO: 56; CDC9 VP 4 nt - foi SEQ ID NO: 59; CDC9 VP 6 nt - foi SEQ ID NO: 62; e CDC9 VP 7 nt -

foi SEQ ID NO: 65.

[0044] As sequências de aminoácidos CDC9 das proteínas codificadas por ácidos nucleicos isolados do rotavírus CDC9 em 27 passagens isoladas de células Vero: CDC9 NSP1 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 3; CDC9 NSP 2 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 6; CDC9 NSP 3 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 9; CDC9 NSP 4 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 12; CDC9 NSP 5 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 15; CDC9 VP1 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 18; CDC9 VP 2 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 21; CDC9 VP 3 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 24; CDC9 VP 4 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 27; CDC9 VP 6 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 30; e CDC9 VP 7 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 33.

[0045] As sequências de nucleotídeos CDC9 de ácidos nucleicos isoladas de rotavírus CDC9 em 27 passagens, obtidas de células Vero isoladas: CDC9 NSP1 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 36; CDC9 NSP2 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 39; CDC9 NSP 3 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 42; CDC9 NSP 4 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 45; CDC9 NSP 5 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 48; CDC9 VP1 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 51; CDC9 VP 2 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 54; CDC9 VP 3 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 57; CDC9 VP 4 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 60; CDC9 VP 6 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 63; e CDC9 VP 7 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 66.

[0046] As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do genoma total do rotavírus CDC-9 isolado, obtido do excremento e de cultura infectada, foram comparadas com sequências de aminoácidos e nucleotídeos do genoma total de uma KU de referência ou de outras cepas G1P9 do rotavírus A, como mostrado aqui.

[0047] Adicionalmente, como mostrado na tabela 2, os genes

CDC-9 (exceto para segmento 3) divide as sequências em elevada identidade com os genes correspondentes do protótipo P[8], da cepa KU humana G1.

TABELA 2

Porcentagens de identidade de nucleotídeos (NT) e de aminoácidos deduzidos (AA) dos segmentos de gene da cepa de vacina rotavírus CDC-9 comparado com as sequências de gene cognato da cepa KU do rotavírus protótipo.

Gene	CDC-9	
	% de NT	% AA
VP1	88	96
VP2	95	98
VP3	77	80
VP4	91	94
VP6	91	98
VP7	93	96
NSP1	83	81
NSP2	90	94
NSP3	93	95
NSP4	93	94
NSP5	93	94

[0048] Em adição, as mudanças nas sequências de NT e AA do genoma total da cepa CDC-9 obtida do excremento com 27 passagens nas células Vero foi documentado, como mostrado na Tabela 3.

TABELA 3:

Mudanças de NT e AA nos genes de CDC-9 obtido do excremento com 27 passagens em células Vero

Segmento de gene	# de mudanças em nt	Posição nt	# de mudanças em aa	Posição aa
NSP1	1	396 A→G	1	122 Q→R
NSP2	0		0	
NSP3	0		0	
NSP4	0	0	0	
NSP5	1	155→T	1	45 A→I
VP1	0		0	
VP2	0		0	
VP3 (DS-1)	0		0	
VP4	6	161→A, 1001C→T, 1101G→A, 1162G→C, 1171A→C, 2025T→C,	5	51G→D, 331S→F, 364M→I, 385D→H, 388I→L
VP6	1	325C→T	1	101A→V
VP7	1	678G→A	0	
TOTAL	10		8	

[0049] O rotavírus CDC-9 isolado em células Vero é uma reordenada que tem todos (exceto o segmento 3) os genes de uma cepa do tipo KU. CDC-9 tem um segmento 3 derivado de uma cepa do tipo DS-1 como CDC-9 VP3 divide uma elevada identidade com o gene cognato da cepa DS-1. Este reordenamento pode ter ocorrido durante a infecção natural ou quando os rotavírus G1P8 e G2P4 no espécime fecal foram adaptados e passados em cultura de célula. O rotavírus VP3 foi descrito por possuir guanililtransferase e pode ser envolvido em replicação viral e morfogênese.

[0050] A cepa CDC-66 do rotavírus A foi isolada a partir de um espécime fecal de uma garota de 11 meses, de Providence, Rhode Island. A cepa de rotavírus humano CDC-66 foi caracterizado através de RT-PCR usando primers tipo-

específicos G e P. A análise de RT-PCR indica que a cepa isolada CDC-66 foi uma cepa tendo um sorotipo P[4], G2.

[0051] Após o isolamento da amostra fecal, a cepa de rotavírus isolada CDC-66 foi adaptada para crescer em células MA104 que foram preparadas e congeladas antes de 1980 e tiveram um historio de passagens completas e documentação. A cepa CDC-66 foi então adaptada para crescer em células Vero, qualificadas para produção de vacinas. CDC-66 foi purificado através da realização de três rodadas de diluição limitativa e após amplificação em células Vero, foi purificada novamente por realização de 3 rodadas de análise de placas. A cepa CDC-66 isolada foi passada 5 e 40 vezes em células MA104 e Vero, respectivamente (45 passagens totais). A adaptação e todas as passagens foram feitas usando procedimentos de operação padrão e materiais brutos certificados e reagentes e sob o Guia de boas práticas Laboratoriais. Apesar de outras referências e cepas laboratoriais, a cepa isolada CDC-66 teve seu historio de passagem e documentação completos.

[0052] A titulação das passagens da cepa de rotavírus humano CDC-66 foi de cerca de  $10^7$  pfu/ml.

[0053] A cepa de rotavírus humana isolada CDC-66 foi estudada através de microscopia eletrônica usando vírions CDC-66 isolados a partir do meio de culturas de célula Vero infectadas. A figura 1B mostrou uma micrografia de elétron dos vírions CDC-66 isolados. A micrografia mostra que os vírions tinham uma morfologia típica dos vírions do rotavírus humano.

[0054] A cepa CDC-66 de rotavírus humano isolado foi ainda examinada utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida do RNA isolado obtido da cepa. Como mostrado na figura 3, o CDC-

66 teve um eletroferótipo de RNA curto típico e o perfil de RNA de ambos, o original isolado obtido do excremento e do rotavírus passado em células Vero são idênticos. Também foi mostrado na figura 3 um padrão para comparação, incluindo um DNA marcador III de peso molecular (Roche) na coluna da extrema-esquerda e um perfil de RNA do rotavírus Rhesus, RRV.

[0055] A cepa CDC-66 do rotavírus humanos isolado de excremento e de células Vero (27 passagens) foi analisada através da análise de seqüência do genoma total.

[0056] As seqüências de aminoácidos de CDC-66 das proteínas codificadas pelos ácidos nucléicos isolados, obtidos de uma amostra de excremento: CDC66 NSP1 aa - no excremento foi SEQ ID NO: 71; CDC66 NSP 2 aa - foi SEQ ID NO: 77; CDC66 NSP3 aa - foi SEQ ID NO: 83; CDC66 NSP4 aa - foi SEQ ID NO: 89; CDC66 NSP 5 aa - foi SEQ ID NO: 95; CDC66 VP1 aa - foi SEQ ID NO: 101; CDC66 VP 2 aa - foi SEQ ID NO: 107; CDC66 VP 3 aa - foi SEQ ID NO: 113; CDC66 VP 4 aa - foi SEQ ID NO: 125; CDC66 VP 6 aa - foi SEQ ID NO: 125; e CDC9 VP 7 aa - foi SEQ ID NO: 131.

[0057] As seqüências de nucleotídeos CDC-66 das proteínas codificadas pelos ácidos nucléicos isolados, obtidos de uma amostra de excrementos: CDC66 NSP1 nt - no excremento foi SEQ ID NO: 68; CDC66 NSP2 nt - foi SEQ ID NO: 74; CDC66 NSP 3 nt - foi SEQ ID NO: 80; CDC66 NSP 4 nt - foi SEQ ID NO: 86; CDC66 NSP 5 nt - foi SEQ ID NO: 92; CDC66 VP1 nt - foi SEQ ID NO: 98; CDC66 VP 2 nt - foi SEQ ID NO: 104; CDC66 VP 3 nt - foi SEQ ID NO: 110; CDC66 VP 4 nt - foi SEQ ID NO: 116; CDC66 VP 6 nt - foi SEQ ID NO: 122; e CDC66 VP 7 nt - foi SEQ ID NO: 128.

[0058] As seqüências de aminoácidos CDC-66 das proteínas

codificadas por ácidos nucleicos isolados, em isolados com 27 passagens, nas células Vero: CDC66 NSP1 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 72; CDC66 NSP 2 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 78; CDC66 NSP 3 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 84; CDC66 NSP 4 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 90; CDC66 NSP 5 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 96; CDC66 VP1 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 102; CDC66 VP 2 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 108; CDC66 VP 3 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 114; CDC66 VP 4 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 120; CDC66 VP 6 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 126; e CDC66 VP 7 aa - em Vero foi SEQ ID NO: 132.

[0059] As sequências de nucleotídeos CDC66 das proteínas codificadas pelos ácidos nucleicos isoladas em isolados de 27 passagens, em células Vero: CDC66 NSP1 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 69; CDC66 NSP 2 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 75; CDC66 NSP 3 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 81; CDC66 NSP 4 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 87; CDC66 NSP 5 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 93; CDC66 VP1 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 99; CDC66 VP 2 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 105; CDC66 VP 3 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 111; CDC66 VP 4 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 117; CDC66 VP 6 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 123; e CDC66 VP 7 nt - em Vero foi SEQ ID NO: 129.

[0060] As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do genoma total do rotavírus CDC-66 isolado, obtidas do excremento e das células Vero, foram comparadas com sequências de aminoácidos e nucleotídeos do genoma total de uma cepa de rotavírus A considerada como sendo mais próxima em relação ao rotavírus A conhecido, cepa de rotavírus DS-1 humano ou outras cepas proximamente relacionadas, como mostradas aqui.

[0061] Como mostrado na Tabela 4, os genes CDC-66 dividem

uma sequência altamente idênticas com os genes correspondentes do protótipo P[4], G2 cepa DS-1.

TABELA 4: Porcentagens de identidade do nucleotídeo (NT) e dos aminoácidos deduzido (AA) do genoma da cepa de vacina de rotavírus CDC-66 comparada com a sequência de genoma da cepa do rotavírus protótipo DS-1.

TABELA 4

Gene	nt%	aa%
VP1	90,85	97,24
VP2	94,11	98,86
VP3	92,9	95,69
VP4	94,02	96,52
VP6	87,98	98,74
VP7	93,88	96,32
NSP1	93,12	93,21
NSP2	86,89	93,99
NSP3	95,31	97,12
NSP4	94,76	95,43
NSP5	92,57	96,5

[0062] As mudanças nas sequências de nt e aa do genoma total da cepa CDC-66 obtida do excremento para a passagem em células Vero foi documentado, como mostrado na tabela 5.

TABELA 5:

Mudanças de nt e aa nos genes de CDC-66 obtido do excremento para 27 passagens em células Vero

Gene	Mudança de nt	Mudança de aa
NSP1	Nenhuma	Nenhuma
NSP2	470 C → T	142 H → Y
NSP3	Nenhuma	Nenhuma
NSP4	Nenhuma	Nenhuma
NSP5	126 T → C, 199 A → G	60 I → V
VP1	440 A → G	141 N → S
VP2	Nenhuma	Nenhuma
VP3	760 T → C, 1143 T → C, 1882 A → G	365 L → S
VP4	770C→A, 1109T→C, 1162G→A, 1184A→G	254T→K, 367V→A, 385D→N, 392E→G
VP6	nenhuma	Nenhuma
VP7	nenhuma	Nenhuma

Vacinas:

[0063] As vacinas e os métodos para seu uso para induzir imunidade ativa e proteção contra rotavírus indutor de doenças em um indivíduo são providos de acordo com a presente invenção.

[0064] Em uma concretização particular, as composições de vacina para aumentar a proteção imunológica contra uma doença mediada por rotavírus em um indivíduo são providas de acordo com a presente invenção, as quais incluem uma cepa de rotavírus humano misturado com um veículo farmacêuticamente aceitável.

[0065] O termo "composição de vacina" é utilizado aqui para referir-se a uma composição incluindo um agente biológico capaz de induzir uma resposta imune em um indivíduo inoculado com a composição de vacina. Em concretizações particulares, o agente biológico é um rotavírus atenuado vivo e/ou um rotavírus inativo. Em uma concretização adicional, o agente biológico é uma porção antigênica de um rotavírus.

[0066] Em concretizações particulares, uma cepa de rotavírus humano incluída em uma composição de vacina da presente invenção é CDC-9 ou CDC-66. Combinações destas cepas de rotavírus humanos são opcionalmente incluídas em composições de vacinas da presente invenção. Adicionalmente, uma outra cepa de rotavírus humano além de CDC-9 ou CDC-66 é opcionalmente incluída em uma composição de vacina da presente invenção.

[0067] Em concretizações particulares de uma composição de vacina de acordo com a presente invenção, pelo menos duas cepas de rotavírus estão incluídas. Duas ou mais cepas de rotavírus tem, cada uma independentemente, um sorotipo G: G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11, G12, G13, ou G14. Assim, por exemplo, pelo menos um de CDC-9 ou CDC-66 está presente em uma composição de vacina da presente invenção junto com pelo menos uma segunda cepa do rotavírus humano que tem um sorotipo G: G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11, G12, G3 ou G14.

[0068] Cada uma de pelo menos duas cepas de rotavírus incluída em uma composição de vacina tem um sorotipo P que é P1A, P1B, P2A, P3, P4, P5, P6, P8, P11, ou P12, em concretizações particulares.

[0069] Uma composição de vacina para melhorar a proteção imunológica contra uma doença mediada pelo rotavírus em um indivíduo inclui uma primeira cepa de rotavírus humano caracterizada como tendo um sorotipo G1 e uma segunda cepa de rotavírus humano caracterizada como tendo um sorotipo G2 em uma concretização particular de uma composição de vacina da presente invenção. Cada uma de duas cepas de rotavírus tem independentemente um sorotipo do grupo P, que é P1A, P1B,

P2A, P3, P4, P5, P6, P8, P11 ou P12.

[0070] Em algumas concretizações, a cepa de rotavírus humano tendo o sorotipo G1 é CDC-9.

[0071] Em algumas concretizações, a cepa de rotavírus humano tendo um sorotipo G2 é CDC-66.

[0072] Combinações de cepas de rotavírus humano nas concretizações particulares, para uma composição de vacina da presente invenção incluem CDC-9 e CDC-66.

[0073] Uma cepa de rotavírus humano incluída em uma composição de vacina, de acordo com a presente invenção é um rotavírus vivo atenuado ou um rotavírus inativado. A escolha de rotavírus vivo atenuado, ou de rotavírus inativado depende de fatores tais como, a rota de administração da composição de vacina.

[0074] Em uma concretização particular, uma composição de vacina incluindo uma cepa de rotavírus A humano, CDC-9 e/ou CDC-66, um ou mais dos polipeptídeos do rotavírus A humano das cepas CDC-9 e/ou CDC-66, e/ou um fragmento imunogênico de um ou mais dos polipeptídeos da cepa de rotavírus A, CDC-9 e/ou CDC-66, estimulam a produção de anticorpos neutralizados para uma cepa de rotavírus A, CDC-9 e/ou CDC-66.

[0075] As composições de vacina são providas de acordo com as concretizações da presente invenção, as quais incluem um ou mais polipeptídeos do rotavírus A e/ou um fragmento imunogênico de um ou mais polipeptídeos do rotavírus A. Em uma concretização particular de uma composição de vacina da invenção, um polipeptídeo de CDC-9 e/ou CDC-66, um homólogo do mesmo, e/ou um fragmento imunogênico do mesmo está incluído.

[0076] O termo "homólogo" refere-se a um polipeptídeo

caracterizado pela homologia da sequência de aminoácidos para um polipeptídeo do rotavírus A da cepa CDC-9 ou CDC-66 de referência.

Sequências CDC-9:

[0077] Conseqüentemente, a presente invenção provê um vírus incluindo uma NSP1 tendo a SEQ ID NO:2 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, é maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99%, maior que 90%, de identidade com a SEQ ID NO:2. Adicionalmente, a presente invenção provê um vírus incluindo uma NSP1 tendo a SEQ ID NO:3 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:3.

[0078] A presente invenção provê um vírus incluindo uma NSP2 tendo a SEQ ID NO:5 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:5.

[0079] A presente invenção provê um vírus incluindo uma

NSP3 tendo a SEQ ID NO:8 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:8.

[0080] A presente invenção provê um vírus incluindo uma NSP4 tendo a SEQ ID NO:11 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:11.

[0081] A presente invenção provê um vírus incluindo uma NSP5 tendo a SEQ ID NO:14 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:14. Adicionalmente, a presente invenção provê um vírus incluindo uma NSP5 tendo a SEQ ID NO:15 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%,

maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:15.

[0082] Logo, a presente invenção provê um vírus incluindo uma VP1 tendo a SEQ ID NO:17 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:17.

[0083] A presente invenção provê um vírus incluindo uma VP2 tendo a SEQ ID NO:20 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:20.

[0084] Consequentemente, a presente invenção provê um vírus incluindo uma VP3 tendo a SEQ ID NO:23 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:23.

[0085] Consequentemente, a presente invenção provê um vírus incluindo uma VP4 tendo a SEQ ID NO:26 ou um homólogo

tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:26. Adicionalmente, a presente invenção provê um vírus incluindo uma VP4 tendo a SEQ ID NO:27 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:27.

[0086] A presente invenção provê um vírus incluindo uma VP6 tendo a SEQ ID NO:29 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:29. Adicionalmente, a presente invenção provê um vírus incluindo uma VP6 tendo a SEQ ID NO:30 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%,

maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:30.

[0087] A presente invenção provê um vírus incluindo uma VP7 tendo a SEQ ID NO:32 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:32.

Sequências CDC-66:

[0088] A presente invenção provê um vírus incluindo uma NSP1 tendo a SEQ ID NO:71 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, é maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99%, maior que 90%, de identidade com a SEQ ID NO:2.

[0089] A presente invenção provê um vírus incluindo uma NSP2 tendo a SEQ ID NO:77 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:77. Adicionalmente, presente invenção provê um vírus incluindo uma NSP2 tendo a SEQ ID NO:78 ou um homólogo tendo uma

sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:78.

[0090] A presente invenção provê um vírus incluindo uma NSP3 tendo a SEQ ID NO:83 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:83.

[0091] A presente invenção provê um vírus incluindo uma NSP4 tendo a SEQ ID NO:89 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:89.

[0092] A presente invenção provê um vírus incluindo uma NSP5 tendo a SEQ ID NO:95 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que

98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:95. Adicionalmente, a presente invenção provê um vírus incluindo uma NSP5 tendo a SEQ ID NO:96 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:96.

[0093] Conseqüentemente, a presente invenção provê um vírus incluindo uma VP1 tendo a SEQ ID NO:101 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:101. Adicionalmente, a presente invenção provê um vírus incluindo uma VP1 tendo a SEQ ID NO:102 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:102.

[0094] A presente invenção provê um vírus incluindo uma VP2 tendo a SEQ ID NO:107 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que

82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:107.

[0095] A presente invenção provê um vírus incluindo uma VP3 tendo a SEQ ID NO:113 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:113. Adicionalmente, a presente invenção provê um vírus incluindo uma VP3 tendo a SEQ ID NO:114 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:114.

[0096] A presente invenção provê um vírus incluindo uma VP4 tendo a SEQ ID NO:119 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:119.

Adicionalmente, a presente invenção provê um vírus incluindo uma VP4 tendo a SEQ ID NO:120 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:120.

[0097] A presente invenção provê um vírus incluindo uma VP6 tendo a SEQ ID NO:125 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:125.

[0098] A presente invenção provê um vírus incluindo uma VP7 tendo a SEQ ID NO:131 ou um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:131.

[0099] A presente invenção provê NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6, VP1, VP2, VP3, VP4, PV6, ou VP7 isolado ou purificado. O termo "purificado" ou "isolado" como utilizado aqui pretende refere-se a uma composição, isolável de outros componentes, sendo que a composição é purificada em qualquer

grau em relação ao seu estado naturalmente obtido, ou seja, neste caso, em relação a sua pureza dentro de uma célula, em relação a sua pureza dentro de um vírion, ou em relação a sua pureza dentro de um organismo infectado. Uma composição isolada, portanto, também se refere a uma proteína, peptídeo, ácido nucléico, ou oligonucleotídeo, substancialmente livre obtido no meio no qual ele pode ocorrer naturalmente.

[0100] É reconhecido que numerosas variantes, análogos, ou homólogos estão dentro do escopo de proteção da presente invenção, incluindo substituições de aminoácidos, alterações, modificações, ou outras mudanças nos aminoácidos que aumentam, diminuem, ou não alteram a função ou a propensão imunogênica do imunógeno ou vacina da invenção. Deve ser ainda apreciado que as sequências da invenção são, opcionalmente, modificadas através da adição de um ou mais aminoácidos, açúcares, nucleotídeos, grupos pendentos, fluoróforos, lumíforos, moléculas radioativas, lipídios, ácidos graxos, derivados dos mesmos, ou outros grupos conhecidos da técnica. Ilustrativamente, um imunógeno da invenção é conjugado a uma proteína. Opcionalmente, um imunógeno da invenção é conjugado a uma proteína que promove a imunogenicidade de um imunógeno. Ilustrativamente, a hemocianina do molusco Keyhole limpet (KLH), albumina de soro bovino (BSA), ou modificações dos mesmos, bem como uma proteína imunogênica BLUE CARRIER, obtida da "Thermo Scientific", Rockford, IL. Outras fontes de conjugados protéicos imunogênicos naturais ou artificiais são conhecidas do estado da técnica. Opcionalmente, um imunógeno da invenção é conjugado a um anticorpo. Opcionalmente, um imunógeno da invenção é conjugado a outras regiões da proteína G que pode

ou não pode também conter epítomos.

[0101] Em algumas concretizações, o NSP1 tem a SEQ ID NO:2 ou a SEQ ID NO:3, ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior do que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:2 ou a SEQ ID NO:3. Em uma concretização adicional, o NSP1 tem SEQ ID NO:71 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:71.

[0102] A presente invenção prove um NSP2 isolado ou purificado. Em uma concretização, NSP2 tem SEQ ID NO:5 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:5. Em uma concretização adicional, o NSP2 tem SEQ ID NO:77 ou SEQ ID NO:78 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que

88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:77 ou SEQ ID NO:78.

[0103] A presente invenção prove um NSP3 isolado ou purificado. Em uma concretização, NSP3 tem SEQ ID NO:8 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:8. Em uma concretização adicional, o NSP3 tem SEQ ID NO:83 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:83.

[0104] A presente invenção prove um NSP4 isolado ou purificado. Em uma concretização, NSP4 tem SEQ ID NO:11 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:11. Em uma concretização

adicional, o NSP4 tem SEQ ID NO:89 ou SEQ ID NO:78 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:89.

[0105] A presente invenção prove um NSP5 isolado ou purificado. Em uma concretização, NSP5 tem SEQ ID NO:15 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:14 ou SEQ ID NO:15. Em uma concretização adicional, o NSP5 tem SEQ ID NO:95 ou SEQ ID NO:96 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:95 ou SEQ ID NO:96.

[0106] A presente invenção prove um VP1 isolado ou purificado. Em uma concretização, VP1 tem SEQ ID NO:17 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior

que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:17. Em uma concretização adicional, o VP1 tem SEQ ID NO:101 ou SEQ ID NO:102 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:101 ou SEQ ID NO:102.

[0107] A presente invenção prove um VP2 isolado ou purificado. Em uma concretização, VP2 tem SEQ ID NO:20 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:20. Em uma concretização adicional, o VP2 tem SEQ ID NO:107 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:107.

[0108] A presente invenção prove um VP3 isolado ou

purificado. Em uma concretização, VP3 tem SEQ ID NO:23 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:23. Em uma concretização adicional, o VP3 tem SEQ ID NO:113 ou SEQ ID NO:114 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:113 ou SEQ ID NO:114.

[0109] A presente invenção prove um VP4 isolado ou purificado. Em uma concretização, VP4 tem SEQ ID NO:26 ou SEQ ID NO:27 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:26 ou SEQ ID NO:27. Em uma concretização adicional, o VP4 tem SEQ ID NO:119 ou SEQ ID NO:120 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que

91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:119 ou SEQ ID NO:120.

[0110] A presente invenção prove um VP6 isolado ou purificado. Em uma concretização, VP6 tem SEQ ID NO:29 ou SEQ ID NO:30 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:29 ou SEQ ID NO:30. Em uma concretização adicional, o VP6 tem SEQ ID NO:125 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:125.

[0111] A presente invenção prove um VP7 isolado ou purificado. Em uma concretização, VP7 tem SEQ ID NO:32 ou é um homólogo tendo uma sequência de aminoácidos que é maior que 80%, maior que 81%, maior que 82%, maior que 83%, maior que 84%, maior que 85%, maior que 86%, maior que 87%, maior que 88%, maior que 89%, maior que 90%, maior que 91%, maior que 92%, maior que 93%, maior que 94%, maior que 95%, maior que 96%, maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:32. Em uma concretização adicional, o VP7 tem SEQ ID NO:131 ou é um homólogo tendo uma

sequência de aminoácidos que é maior que 97%, maior que 98%, maior que 99% de identidade com a SEQ ID NO:131.

[0112] Um ácido nucléico isolado ou purificado codificante de uma proteína ou fragmento acima descrito do mesmo é provido de acordo com as concretizações da presente invenção. Opcionalmente, o ácido nucléico isolado ou purificado codificante de uma proteína ou fragmento acima descrita do mesmo é incluída em um vetor.

[0113] Um ácido nucléico codificante de NSP1 inclui a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:35; SEQ ID NO:36; SEQ ID NO:68; ou um fragmento do mesmo codificante de pelo menos nove aminoácidos contínuos. Um ácido nucléico codificante de NSP2 inclui a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:38; SEQ ID NO:74; SEQ ID NO:75; ou um fragmento do mesmo codificante de pelo menos nove aminoácidos contínuos. Um ácido nucléico codificante de NSP3 inclui a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:41; SEQ ID NO:80; ou um fragmento do mesmo codificante de pelo menos nove aminoácidos contínuos. Um ácido nucléico codificante de NSP4 inclui a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:44; SEQ ID NO:86; ou um fragmento do mesmo codificante de pelo menos nove aminoácidos contínuos. Um ácido nucléico codificante de NSP5 inclui a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:47; SEQ ID NO:48; SEQ ID NO:92; SEQ ID NO:93; ou um fragmento do mesmo codificante de pelo menos nove aminoácidos contínuos. Um ácido nucléico codificante de VP1 inclui a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:50; SEQ ID NO:98; SEQ ID NO:99; ou um fragmento do mesmo codificante de pelo menos nove aminoácidos contínuos. Um ácido nucléico codificante de VP2 inclui a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:53; SEQ ID NO:104; ou um fragmento do mesmo codificante de pelo menos

nove aminoácidos contínuos. Um ácido nucléico codificante de VP3 inclui a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:110; SEQ ID NO:111; ou um fragmento do mesmo codificante de pelo menos nove aminoácidos contínuos. Um ácido nucléico codificante de VP4 inclui a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:59; SEQ ID NO:60; SEQ ID NO:116; SEQ ID NO: 117; ou um fragmento do mesmo codificante de pelo menos nove aminoácidos contínuos. Um ácido nucléico codificante de VP6 inclui a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:62; SEQ ID NO:63; SEQ ID NO:122; ou um fragmento do mesmo codificante de pelo menos nove aminoácidos contínuos. Um ácido nucléico codificante de VP7 inclui a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:65; SEQ ID NO:128; SEQ ID NO:129; ou um fragmento do mesmo codificante de pelo menos nove aminoácidos contínuos.

[0114] Um técnico no assunto irá apreciar que, devido a degeneração do código genético, um polipeptídeo particular ou fragmento do mesmo pode ser codificado por mais do que uma sequência do ácido nucléico.

[0115] As mutações podem ser introduzidas usando técnicas de biologia molecular padrão, tais como mutagênese sítio-direcionada e mutagênese mediada por PCR. Um técnico no assunto irá reconhecer que um ou mais mutações de ácidos nucléicos podem ser introduzidas sem alterar as propriedades funcionais dos polipeptídeos de rotavírus. Por exemplo, um ou mais substituições de aminoácidos, adições, ou deleções podem ser feitas sem alterar as propriedades funcionais dos polipeptídeos de rotavírus. Deve ser apreciado que várias mutações aumentam ou diminuem, opcionalmente, ou não alteram a imunogenicidade de um polipeptídeo da invenção.

[0116] As substituições de aminoácidos conservativas podem ser feitas nos polipeptídeos de rotavírus para produzir homólogos. As substituições de aminoácidos conservativas são substituições reconhecidas da técnica de um aminoácido para um outro aminoácido tendo características similares. Por exemplo, cada aminoácido pode ser descrito como tendo um ou mais das características a seguir: eletropositivo, eletronegativo, alifático, aromático, polar, hidrofóbico e hidrofílico. Uma substituição conservativa é uma substituição de um aminoácido tendo uma característica estrutural ou funcional especificada por um outro aminoácido tendo a mesma característica. Os aminoácidos ácidos incluem aspartato, glutamato; aminoácidos básicos incluem histidina, lisina, arginina, aminoácidos alifáticos incluem isoleucina, leucina e valina; aminoácidos aromáticos incluem fenilalanina, glicina, tirosina e triptofano; aminoácidos polares incluem aspartato, glutamato, histidina, lisina, asparagina, glutamina, arginina, serina, treonina e tirosina; e aminoácidos hidrofóbicos incluem alanina, cisteína, fenilalanina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, valina e triptofano; e substituições conservativas incluem substituição entre aminoácidos dentro de cada grupo. Os aminoácidos podem também ser descritos em termos relacionados ao tamanho, alanina, cisteína, aspartato, glicina, asparagina, prolina, treonina, serina, valina, todos considerados tipicamente por serem menores.

[0117] No preparo das referidas mudanças, o índice hidropático de aminoácidos pode ser considerado. A importância do índice do aminoácido hidropático na conferência da função biológica interativa sobre um

polipeptídeo é geralmente entendido na técnica. É conhecido que determinados aminoácidos podem ser substituídos por outros aminoácidos tendo um índice hidropático ou pontuação e ainda resulta em um polipeptídeo com a atividade biológica similar. Cada aminoácido foi designado em um índice hidropático com base em sua hidrofobicidade e características de carga. Aqueles índices são: isoleucina (+4,5); valina (+,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cisteína (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptofano (-0,9); tirosina (-1,3); proleína (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); e arginina (-4,5).

[0118] Acredita-se que o caráter relativo à hidropatia do aminoácido determina a estrutura secundária dos polipeptídeos resultantes, que em consequência define a interação do polipeptídeo com outra molécula, tal como enzimas, substratos, receptores, anticorpos, antígenos, e do gênero. É conhecido do estado da técnica que um aminoácido pode ser substituído por um outro aminoácido tendo um índice de hidropatia similar e ainda obter um polipeptídeo funcionalmente equivalente. Na referida mudança, a substituição dos aminoácidos cujos índices hidropáticos estão dentro de  $\pm 2$  é preferido, aqueles dentro de  $\pm 1$  são particularmente preferidos, e aqueles dentro de  $\pm 0,5$  são ainda mais particularmente preferidos.

[0119] A substituição do tipo aminoácidos pode também ser feita com base na hidrofilicidade, particularmente, onde o polipeptídeo ou o peptídeo equivalente biologicamente funcional desse modo criado é pretendido para uso nas

concretizações imunológicas. Os valores de hidrofiliicidade a seguir foram designados para os resíduos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0  $\pm$  1); glutamato (+3,0  $\pm$  1); serina (+3,0); asparagina (+0,2); glutamina (+ 0,2); glicina (0); prolina (-0,5  $\pm$  1); treonina (-0,4); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptofano (-3,4). Deve ser entendido que um aminoácido pode ser substituído por um outro tendo um valor de hidrofiliicidade similar e ainda obter um equivalente biológico e, em particular, um polipeptídeo imunologicamente equivalente. Na referida mudança, a substituição de aminoácidos cujos valores de hidrofiliicidade estão dentro de  $\pm$  2 é preferido, aqueles dentro de  $\pm$  1 são particularmente preferidos, e aqueles dentro de  $\pm$  0,5 são ainda mais particularmente preferidos.

[0120] Como destacado acima, as substituições de aminoácidos são geralmente com base na similaridade relativa dos substituintes de cadeias laterais dos aminoácidos, por exemplo, sua hidrofobicidade, hidrofiliicidade, carga, tamanho, e do gênero. Substituições exemplificativas que tomam várias das características anteriores dentro da consideração são bem conhecidas dos técnicos no assunto e incluem (resíduos originais: exemplo de substituição): (Ala: Gly, Ser), (Arg: Lys), (Asn: Gln, His), (Asp: Glu, Cys, Ser), (Gln: Asn), (Glu:Asp), (Gly: Ala), (His: Asn, Gln), (Ile: Leu, Val), (Leu: Ile, Val), (Lys: Arg), (Met:Leu, Tyr), (Ser: Thr), (Thr: Ser), (Trp: Tyr), (Tyr: Trp, Phe), e (Val: Ile, Leu). Concretizações desta invenção contemplam, assim, os equivalentes funcionais ou biológicos de um polipeptídeo como

representado acima. Em particular, as concretizações dos polipeptídeos podem incluir variantes tendo cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, e 95% de identidade de sequência com o polipeptídeo de interesse.

[0121] As partículas de rotavírus, ácidos nucleicos, polipeptídeos e fragmentos dos mesmos podem ser produzidos em células hospedeiras recombinantes bem como técnicas convencionais. Qualquer constructo de ácido nucleico, que é eficaz na produção da proteína codificada ou fragmento do mesmo em uma célula hospedeira, pode ser utilizado para produzir partículas de rotavírus, polipeptídeos rotavírus ou fragmentos dos mesmos.

[0122] Um técnico no assunto reconhece muitos caminhos para se preparar o vírus CDC-9 ou o CDC-66 da invenção para uso em uma composição de vacina da invenção ou nos processos da invenção. Ilustrativamente, é prática comum para um, isolar um rotavírus putativo a partir de um excremento ou de outra amostra biológica inclui, opcionalmente, a passagem em cultura de célula tal como em células Vero similares aos métodos ilustrados em Esona, MD, et al., "Human Vaccines", 2010; 6:1-7; o conteúdo do qual são incorporados aqui por referência. Um técnico no assunto isola regularmente cepas de vírus e caracteriza a sequência de genoma por técnicas bem conhecidas do estado da técnica. É prática comum de um técnico no assunto para sequenciar um genoma viral e compara a sequência de saída para uma sequência modelo tal como as sequências de CDC-9 de CDC-66 descreve aqui para determinar se o vírus isolado tem a sequência genética requerida para ser CDC-9, CDC-66, ou homólogos dos mesmos.

[0123] Um técnico no assunto também reconhece os métodos

para modificar um rotavírus modelo tal como KU ou DS-1 para preparar os vírus CDC-9 ou CDC-66. Um dos referidos métodos utilizam a pesquisa de genética reversa de Komoto, S., et al., PNAS USA, 2006; 103: 4646-4651, o conteúdo do qual são incorporados aqui por referência. Resumidamente, cada um dos genes da cepa KU pode ser isolado e amplificado tomando o fluido da cultura obtida de células MA104 infectadas, extraíndo o dsRNA viral e sintetizando o cDNA usado com a transcriptase reversa do vírus mieloblastose de aves (Seikagaku Kogyo, Tóquio, Japão) usando um primer inicial. Está bem dentro do nível de um técnico no assunto a construção de primers para sintetizar cDNA. Vários programas livres e comercialmente disponíveis para síntese de primer são conhecidos pelos técnicos no assunto. Ilustrativamente, os primers para o gene VP4 de KU estão descritos em Komoto, S., et al., PNAS USA, 2006; 103:4646-4651. A modificação das seqüências de KU ou qualquer outra cepa para aquelas de CDC-9 ou CDC-66 são ilustrativamente acompanhadas pelo estabelecimento das modificações das sequências tais como por alinhamento de sequênciã. Uma vez que as substituições de nucleotídeos são elucidadas, modificações do cDNA podem ser conseguidas pelo uso do kit de mutagênese sítio direcionada QUICKCHANGE XL disponível na "Agilent Technologies Santa Clara", CA. As sequências de gene modificados, para conformar aquela de CDC-9, CDC-66, ou homólogos dos mesmos são opcionalmente inseridos dentro de uma linha de célula tal como, as células CHO-7 junto com um vírus auxiliar tal como KU usado para servir como base para inserção do gene dentro de novos vírus. Os vírus modificados são subsequentemente isolados por técnicas conhecidas. Um processo interativo

opcional é utilizado, portanto, em cada gene individual de CDC-9 ou CDC-66 que é substituído pelo gene do vírus auxiliar intercaladamente, assim, a cepa do vírus isolado substituído, a partir da substituição do primeiro gene é utilizada como um vírus auxiliar para substituição do segundo gene e assim por diante até CDC-9 ou CDC-66 ser criado a partir de uma cepa fonte.

[0124] Os exemplos ilustrativos de vírus auxiliares ou rotavírus modelos podem ser encontrados sob o número de acesso no GenBank Nos.: (a) cepa VP3: RV161-00 (DQ490547); RV176-00 (DQ490553), DRC88 (DQ005112), DRC86 (DQ005123), TB-Chen (AY787654), DS-1 (AY2779140, AU-1 (DQ490537), T152 (DQ146701), Hosokawa (DQ870491), Hochi (AY277915), Wa (AY267335), L26 (AY277918), KU (AB022767), Dhaka25-02 (DQ14651), Dhaka12-03 (DQ146662), B4633-03 (DQ146640), PO-13(AB009631).

[0125] (b) cepas VP7 (G1): SK417 (EU839907), DH415 (EU839906), MMC82 (EU839913), Dhaka18-02 (AY631051), MMC56 (EU839911), Matlab159-02 (AY631055), ISSO-4 (AY098670), Thai-2104 (DQ512982), CMH042/04 (EF199713), 417 (D16328), T73 (AF450291), TE1 (D17721), K18 (D16319), Chi-87 (DQ512998), J-4825 (DQ512989), 88H249 (AB081795), 421 9D163260, RV-4 (M64666), AU007 (AB081799), HOU8697 (U88717), Mvd9607 (AF480295), 80(D163250), DC03 (AF183859), KU (AB222788), K2 (D16323), K8 (D16344), Egy-8 (U26374), Brz-5 (U26367), Wa (K02033), D(AB118022), C95 (L24165), T449 (M92651), DS-1(AB118023).

[0126] (c) cepas VP4 P[8]: ITO (AB008280), D (EF672570), Wa (L34161), Hochi (AB008295), Odelia (AB008296), VA70 (AJ540229), CH32 (AB008274), MO (AB008278), KU (AB222784),

Wi61 (EF672619), F45 (U30716) P (EF672598), AI-39 (AB008283), 90-544 (AB008304), B4633-03 (DQ146641), Dhaka25-02 (DQ146652), SK438 (EU839955), DH402 (EU839958), DH415 (EU839955), DS-1 (AB118025).

[0127] (d) cepas NSP4: Dhaka16-03 (DQ492678), 1099 (AJ236759), Dhaka12-03 (DK146669), Dhaka25-02 (DQ146658), KU (AB022772), Wa (AF0931999), RMC321 (AF541921), OSU (D88831), AU-1 (D89873), CMH120/04 (DQ923799), B4106 (AY740732), C-11 (AF144793), DRC86 (DQ005116), DRC88 (DQ005105), DS-1 (AF174305), TB-Chen (AY787650), Ch-1 (AB065287).

[0128] Cada um dos arquivos e sequências nos números de acesso acima mencionados são incorporados aqui por referência.

[0129] Outros métodos, primers, técnicas de isolamento, técnicas de sequenciamento, e técnicas de caracterização são conhecidos do estado da técnica e são similarmente operáveis aqui. Ilustrativamente, um pode reconstituir o vírus CDC-9 ou CDC-66, novamente obtido dos genes isolados, tais como por arranjo das partículas virais com genes capturados, ilustrativamente, por técnicas de ou modificações de Gonzalez, AS, e Affranchino, JL., "J. Gen. Virol"., 1995; 76:2357-2360, o conteúdo das quais sendo incorporado aqui por referência.

[0130] Os constructos de expressão e os métodos para sua produção e uso para expressar uma proteína desejada são conhecidos da técnica, como descrito, por exemplo, em Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; Ausubel, F. et al., (Eds.), Short protocols in Molecular Biology", Wiley, 2002; e s. J. Higgins and B.D. Hames (Eds.), Protein Expression: A

*Practical Approach, Oxford University Press., USA, 1999".*

[0131] Ilustrativamente, uma molécula de ácido nucléico codificante de um ou mais polipeptídeos de rotavírus e/ou fragmentos de polipeptídeo de rotavírus é operativamente ligado as sequências regulatórias que controlam a expressão da transcrição em um vetor de expressão. O vetor de expressão é introduzido dentro de uma célula hospedeira e as partículas de rotavírus produzidas, um ou mais polipeptídeos de rotavírus e/ou fragmentos de polipeptídeos de rotavírus podem então ser isolados. Os constructos ilustrativos incluem uma ligação operativa de uma molécula de ácido nucléico de rotavírus dentro de um plasmídeo pT7 através de uma primeira amplificação da molécula de ácido nucléico usando primers incluindo uma sequência do promotor T7 e a ligação dos ácidos nucléicos amplificados dentro do vetor de expressão T7 pX8dT como descrito por Schnell, MJ, et al., EMBO J., 1994; 13:4195-4203, o conteúdo das quais sendo incorporado aqui por referência.

[0132] Exemplos não limitativos de sequências regulatórias que controlam a expressão de transcrição em um vetor de expressão incluem, ilustrativamente, um promotor, um amplificador, um sinal de anelamento, um sítio de início de transcrição, um sinal de fim de transcrição, um sinal de poliadenilação, um sítio de entrada de ribossomo interno (IRES) e combinações destes ou outras sequências regulatórias.

[0133] Os vetores de expressão incluem, mas não estão limitados a, vetores virais e vetores bacterianos utilizados para expressar uma proteína desejada. Exemplos não limitativos de vetores de expressão incluem plasmídeos

bacterianos, bacteriófagos, adenovírus, vírus associado ao adeno, vírus da herpes, vírus vaccínia, e lentivirus.

[0134] Uma célula hospedeira para expressão dos polipeptídeos e de fragmentos destes, podem ser procarióticos ou eucarióticos, tais como bactérias, plantas, insetos, fungos, leveduras, e células de mamíferos.

[0135] Um vetor de expressão é introduzido dentro de uma célula hospedeira usando técnicas bem conhecidas tais como infecção ou transfecção, incluindo transfecção de fosfato de cálcio, transfecção mediada por lipossomo, eletroporação e sonoporação.

[0136] Em adição à metodologia recombinante, técnicas de químicos sintéticos podem ser utilizadas para produzir polipeptídeos e fragmentos destes. Por exemplo, a síntese de fase sólida, síntese de fase de solução, síntese de fase sólida parcial ou de condensação de fragmento podem ser utilizadas.

[0137] O termo "isolado" como utilizado aqui se refere a uma substância que foi separada a partir de outros componentes celulares associados com a substância *in natura*, ou quando recombinantemente produzida não pretende estar associada com a substância e que pode interferir com o uso da substância terapêutica, da profilática, de diagnóstico, de pesquisa ou para outros usos. Geralmente, uma substância isolada descrita aqui tem pelo menos cerca de 80% de pureza, pelo menos cerca de 90% de pureza, pelo menos cerca de 95% de pureza, ou mais que cerca de 99% de pureza. A purificação é conseguida utilizando a metodologia padrão bem conhecida, tal como fracionamento e/ou cromatografia, tal como precipitação com sulfato de amônio e cromatografia por eluição, tal como

cromatografia por exclusão de tamanho, cromatografia de deslocamento, cromatografia de troca iônica, e cromatografia de bioafinidade. Exemplos de metodologia de purificação estão descritos em "S. Doonan: Protein Purification Protocols Human, Press, 1996".

[0138] A porcentagem de identidade é determinada por comparação das sequências de aminoácido ou de ácido nucléico, incluindo uma referência a sequência de aminoácido ou de ácido nucléico do rotavírus A e um homólogo putativo do aminoácido ou da sequência de ácido nucléico. Os algoritmos utilizados para determinação da porcentagem de identidade incluem ilustrativamente, os algoritmos de S. Karlin e S. Altshul, PNAS, 85:2444-2448, 1988, e outros incorporados dentro dos implementos computadorizados, tais como, mas não limitados a GAP, BESTFIT, FASTA, TFASTA; e BLAST, por exemplo, incorporado em *Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI* e publicamente disponíveis na "National Center for Biotechnology Information".

[0139] Os polipeptídeos de CDC-9 e/ou CDC-66 do rotavírus A, um homólogo do mesmo, e/ou um fragmento imunogênico dos mesmos podem ser preparado por qualquer um de vários métodos, incluindo isolamento de partículas virais de fontes, tais como, células cultivadas ou amostras de pacientes, isolamento de um ou mais polipeptídeos e/ou um ou mais fragmentos de polipeptídeos a partir de partículas virais, produção de recombinantes de polipeptídeos virais, fragmentos e/ou partículas virais, incluindo partículas do tipo virais e partículas intactas, e/ou técnicas de síntese química. Os métodos de isolamento de partículas virais, polipeptídeos

virais e/ou um ou mais fragmentos de polipeptídeos virais, produção recombinante de polipeptídeos virais, fragmentos de polipeptídeos virais e/ou partículas virais estão descritos em detalhes aqui, nas referências citadas, e são conhecidas pelos técnicos no assunto.

[0140] Um antígeno pode ser feito mais imunogênico se desejado através da ligação com uma molécula veículo, tal como, albumina de soro bovina ou hemocianina de molusco Keyhole limpet e/ou através do uso de um adjuvante. A ligação do veículo pode ser acompanhada por qualquer uma de várias técnicas, incluindo, ilustrativamente, mas não limitada a, conjugação e expressão de uma proteína de fusão.

[0141] Os polipeptídeos ou peptídeos recombinantemente expressos podem ser marcados para permitir para um isolamento fácil. Por exemplo, os referidos peptídeos e polipeptídeos são opcionalmente marcados ilustrativamente, Fc-marcado, 6xHIS-marcado, FLAG-marcado, ou através de outros marcadores apropriados para isolamento de um polipeptídeo marcado.

Formulação de vacina:

[0142] Nas concretizações particulares da invenção, uma cepa de rotavírus A, para inclusão em uma composição de vacina da presente invenção, é preparados por meio de métodos padrões, tipicamente utilizados para preparar o rotavírus vivo ou inativado. Por exemplo, geralmente um tipo de célula compatível é inoculado com uma cepa de rotavírus e as células são mantidas sob condições que permitem sua replicação viral e a produção de partículas infecciosas.

[0143] Um exemplo particular de um tipo de célula que permite a infecção por rotavírus, replicação e produção de partícula é uma linha de célula de mamífero, tal como uma

linha de célula Vero.

[0144] As partículas de rotavírus são colhidas, tipicamente a partir do sobrenadante da cultura de célula para inclusão em uma composição de vacina. As partículas de rotavírus podem ser isoladas a partir do sobrenadante de uma cultura de célula, por exemplo, através da filtração e/ou centrifugação. As partículas de rotavírus isolados são opcionalmente liofilizadas, tais como, para re-suspensão tardia em um veículo farmacologicamente aceitável.

[0145] O termo "veículo farmacologicamente aceitável" se refere a um veículo que é substancialmente não tóxico para um indivíduo e substancialmente inerte para o rotavírus incluído em uma composição de vacina. Um veículo farmacologicamente aceitável é uma forma sólida, líquida ou gel e é tipicamente estéril e livre de pirogênio.

[0146] Uma composição de vacina da presente invenção pode estar em qualquer forma apropriada para administração a um indivíduo.

[0147] Uma composição de vacina é administrada por qualquer rota apropriada de administração incluindo oral e parenteral, tal como intravenosa, intradérmica, intramuscular, via mucosa, nasal, ou rotas de administração subcutânea.

[0148] Por exemplo, uma composição de vacina para administração parenteral pode ser formulada como um líquido injetável incluindo um rotavírus e um veículo farmacologicamente aceitável. Exemplos de veículos aquosos e não-aquosos apropriados incluem água, etanol, polióis, tais como propileno glicol, polietileno glicol, glicerol, e do gênero, misturas apropriadas dos mesmos; óleos vegetais, tais

como, óleo de oliva; e éster orgânico injetável, tal como etiloleato. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, através do uso de um revestimento tal como lecitina, através da manutenção de um tamanho de partícula desejável no caso de dispersão, e/ou através do uso de um surfactante, tal como lauril sulfato de sódio. Um estabilizante é opcionalmente incluído, tal como, por exemplo, sacarose, EDTA, EGTA, e um antioxidante.

[0149] Uma forma de dosagem sólida para administração ou para suspensão em um líquido antes da administração inclui, ilustrativamente, cápsulas, tabletes, pós, e grânulos. Na referida forma de dosagem sólida, um rotavírus é misturado com pelo menos um veículo incluindo, ilustrativamente, um tampão, tal como, por exemplo, citrato de sódio ou um fosfato de metal alcalino ilustrativamente incluindo fosfato de sódio, fosfato de potássio e fosfato de cálcio; um material de carga, tal como, por exemplo, amido, lactose, sacarose, glicose, manitol, e ácido silícico; um ligante tal como, por exemplo, carboximetilcelulose, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sucrose, e acácia; um agente umectante, tal como, por exemplo, glicerol; um agente desintegrante tal como, por exemplo, agar-agar, carbonato de cálcio, amido de planta, tal como batata ou amido de tapioca, ácido algínico, determinados complexos de silicatos, e carbonato de cálcio, uma solução retardante, tal como, por exemplo, uma solução retardadora, tal como, por exemplo, parafina; um acelerador de absorção tal como, por exemplo, um composto de amônio quaternário; um agente umectante, tal como, por exemplo, álcool cetílico, monoestearato de glicerol, e um glicol; um adsorvente tal como, por exemplo, Caolin e bentonita; um

lubrificante, tal como, por exemplo, talco, estearato de cálcio, estearato de magnésio, um polietileno glicol sólido ou um lauril sulfato de sódio; um conservante tal como um agente antibacteriano e um agente antifúngico, incluindo, por exemplo, ácido sórbico, gentamicina e fenol; e um estabilizante, tal como, por exemplo, sacarose, EDTA, EGTA, e um antioxidante.

[0150] As formas de dosagem sólidas opcionalmente incluem um revestimento, tal como, um revestimento entérico. O revestimento entérico é tipicamente um material polimérico. Os materiais de revestimento entérico preferidos têm a característica de serem polímeros bio-consumíveis, gradualmente hidrolisáveis e/ou gradualmente solúveis em água. A quantidade de material de revestimento aplicada a uma dosagem sólida dita geralmente o intervalo de tempo entre a ingestão e a liberação do fármaco. Um revestimento é aplicado tendo uma espessura tal que o revestimento total não dissolve nos fluidos gastrointestinal em pH abaixo de 3, associado com os ácidos do estômago, mas dissolve acima do pH 3 no meio do intestino delgado. É esperado que qualquer polímero aniônico apresentando um perfil de solubilidade dependente do pH é facilmente utilizado como um revestimento entérico na prática da presente invenção para se conseguir a liberação do agente ativo para o trato gastrointestinal inferior. A seleção do material de revestimento entérico específico depende das propriedades tais como, resistência à desintegração no estômago; impermeabilidade aos fluidos gástricos, e a difusão do agente ativo enquanto no estômago; capacidade em dissipar no sítio alvo do intestino; estabilidade física e química durante o armazenamento; não-toxicidade; e fácil aplicação.

[0151] Os materiais de revestimento entérico apropriado incluem ilustrativamente os polímeros celulósicos tais como hidroxipropil celulose, hidroxietil celulose, hidroxipropil metil celulose, metil celulose, etil celulose, acetato de celulose, ftalato de acetato de celulose, trimelitato de acetato de celulose, ftalato de hidroxipropilmetil celulose, succinato de hidroxipropilmetil celulose e carboximetilcelulose de sódio; polímeros de ácido acrílico e copolímeros, preferivelmente formados a partir de ácido acrílico, ácido metacrílico, acrilato de metila, metil-acrilato de amônio, acrilato de etila, metacrilato de metila e/ou etila; polímeros de vinil e copolímeros tais como, polivinil pirrolidona, acetato de polivinila, ftalato de polivinil-acetato, copolímero de ácido crotônico de vinil-acetato, e copolímeros de acetato de etileno-vinila, goma-laca, e combinações destes. Um material de revestimento entérico particular inclui polímeros de ácido acrílico e copolímeros descritos, por exemplo, na patente norte-americana No.: US 6,136,345.

[0152] O revestimento entérico contém, opcionalmente, um plastificante para prever a formação de poros e fendas que permitem a penetração dos fluidos gástricos dentro da forma de dosagem sólida. Os plastificantes apropriados incluem, ilustrativamente, citrato de trietila (Citroflex 2), triacetina (triacetato de glicerila), citrato de acetil-trietila (Citroflex A2), Carbowax 400 (polietileno glicol 400), ftalato de dietila, citrato de tributila, monoglicerídeos acetilados, glicerol, ésteres de ácido graxo, propileno glicol, e ftalato de dibutila. Em particular, um revestimento composto de um polímero acrílico carboxílico

aniônico, contém, tipicamente, aproximadamente 10% a 25% em peso de um plastificante, particularmente, ftalato de dibutila, polietileno glicol, citrato de trietila e triacetina. O revestimento pode também conter outros excipientes de revestimentos tais como, desfixantes ("detackfiers"), agentes anti-espuma, lubrificantes (por exemplo, estearato de magnésio), e estabilizantes (por exemplo, hidroxipropil-celulose, ácidos ou bases) para solubilizar ou dispersar o material de revestimento, e para aperfeiçoar o desempenho e o produto revestido.

[0153] As formas de dosagens líquidas para administração oral incluem rotavírus e um veículo farmacologicamente aceitável como uma emulsão, solução, suspensão, xarope ou elixir. Uma forma de dosagem líquida de uma composição de vacina da presente invenção pode incluir uma gente umectante, um agente emulsificante, um agente de suspensão, um adoçante, um aromatizante ou um agente de odorização.

[0154] A informação detalhada relativa aos ingredientes costumeiros, equipamentos e processos para preparar as formas de dosagens é encontrado em formas de dosagens farmacêuticas: "Tablets, Eds., H. A. Lieberman et al., New York: Marcel Dekker, Inc., 1989; e em L.v. Allen, Jr. Et al., Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 8th Ed., Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004, toda a Referência e no capítulo 16; A. R. Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins, 21<sup>st</sup> ed., 2005, particularmente, capítulo 89; e J.G. Hardman et al., Goodman & Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill Professional, 10<sup>th</sup> ed. 2001.

[0155] Um adjuvante é opcionalmente incluído em uma composição viral de acordo com as concretizações da presente invenção. Os adjuvantes são conhecidos do estado da técnica e inclui, ilustrativamente, o adjuvante de Freund, hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, óxido de alumínio, saponina, dextranas, tais como, DEAE-dextrana, óleos vegetais tais como óleo de amendoim, óleo de oliva, e/ou acetato de vitamina E, óleo mineral, lipopolissacarídeos bacterianos, peptidoglicanas, e proteoglicanas.

[0156] O termo "indivíduo" é utilizado aqui para referir-se a um humano. Animais não-humanos, incluindo ilustrativamente outros primatas, vacas, cavalos, carneiros, cabras, porcos, cachorros, gatos, pássaros, aves, e roedores, também são referidos ao termo indivíduo nas concretizações particulares da presente invenção.

[0157] O rotavírus isolado é tratado para inativar ou atenuar o rotavírus. Assim, nas concretizações particulares uma vacina para o rotavírus humano inclui um rotavírus humano atenuado vivo ou um rotavírus humano inativado.

[0158] O termo "rotavírus vivo atenuado" se refere a um rotavírus tendo a capacidade de infectar um hospedeiro apropriado ou uma célula hospedeira e replicar e o termo é utilizado para distinguir um rotavírus "inativado". O termo "rotavírus vivo atenuado" se refere a um rotavírus caracterizado por diminuir substancialmente a virulência comparada a um rotavírus humano do tipo selvagem. O termo "virulência" é utilizado para descrever o grau da patogenicidade de um rotavírus em uma célula hospedeira ou um organismo hospedeiro. A virulência é determinada utilizando qualquer um de vários ensaios reconhecidos da técnica. Por

exemplo, a virulência pode ser analisada através da exposição das células hospedeiras cultivadas para um rotavírus atenuado e determinação do número de células que participam de uma resposta patogênica e/ou a severidade da resposta patogênica obtida. A virulência diminuída está presente quando um rotavírus atenuado tem capacidade diminuída para induzir um ou mais efeitos patogênicos em uma célula hospedeira e/ou organismo hospedeiro.

[0159] O termo rotavírus "inativado" é utilizado aqui para referir-se a um rotavírus que foi morto e o qual não é, portanto, de capaz de replicar e nem de infectar a célula hospedeira ou o organismo hospedeiro.

[0160] A inativação é conseguida por qualquer das várias técnicas incluindo, ilustrativamente, a inativação utilizando um ou mais agentes químicos, inativação térmica e/ou inativação por luz UV.

[0161] Os agentes químicos para inativar um rotavírus são conhecidos do estado da técnica e incluem os referidos agentes como etileno iminas, tais como etilenoimina binário; aldeídos reticulantes tais como formaldeído e glutaraldeído; proteases incluindo, ilustrativamente, pronase, tripsina e/ou quimotripsina; e detergentes tais como sais etoxilados de octilfenol e trimetilamônio de alquila. O rotavírus pode ser inativado através do tratamento com uma base, por exemplo, através da incubação do rotavírus em um pH acima do pH 10,0.

[0162] A inativação térmica pode ser conseguida através do aquecimento em temperaturas acima de 50°C, por exemplo.

[0163] A inativação é analisada por técnicas padrões do estado da técnica, incluindo, ilustrativamente, a amostragem do vírus em vários períodos durante um procedimento de

inativação e observação dos efeitos citopáticos ou da infectividade de uma amostra sobre as células apropriadas, tais como, células Vero.

[0164] Deve ser apreciado que, em adição ao rotavírus vivo atenuado e rotavírus inativado, uma porção antigênica de um rotavírus é opcionalmente incluída em uma composição de vacina da presente invenção. Assim, por exemplo, uma proteína derivada do rotavírus ou peptídeo capaz de induzir uma resposta imunológica em um indivíduo é considerado dentro do escopo da presente invenção. Em particular, uma porção antigênica de uma cepa de rotavírus humano identificada como CDC-9 ou CDC-66 está opcionalmente incluída em uma composição de vacina da presente invenção.

[0165] Métodos de indução de uma resposta imunológica contra uma doença mediada por rotavírus, em um indivíduo são providos de acordo com as concretizações da presente invenção, os quais incluem a administração de uma quantidade terapêutica de uma composição de vacina incluindo pelo menos uma cepa de rotavírus humano.

[0166] A frase "quantidade terapeuticamente eficaz" é utilizada aqui para referir-se a uma quantidade eficaz para induzir uma resposta imunológica suficiente para prevenir ou melhorar os sinais ou sintomas de uma doença mediada por rotavírus. A indução de uma resposta imunológica em um indivíduo pode ser determinada por qualquer uma de várias técnicas conhecidas do estado da técnica, ilustrativamente, incluindo a detecção de um anticorpo anti-rotavírus, medida da titulação do anticorpo anti-rotavírus e/ou análise da proliferação de linfócitos. Os métodos ilustrativos para detecção de anticorpos anti-rotavírus são ilustrados por

Tsunemitsu, H., et al., "J. Clin. Microbiol.", 1992; 30:2129-2134", o conteúdo das quais são incorporadas aqui por referência. Os sinais e os sintomas da doença mediada por rotavírus pode ser monitorada para detectar a indução de uma resposta imunológica para administração de uma composição de vacina da presente invenção em um indivíduo. Uma resposta imunológica é ilustrativamente uma redução dos sinais clínicos e dos sintomas da doença mediada pelo rotavírus tal como, redução da quantidade do vírus perdido nas fezes, redução do número de dias nos quais o vírus é disperso nas fezes, redução do número de dias que o indivíduo tem diarreia, redução da mortalidade, redução da morbidez, redução na perda de peso ou ganho de peso. Uma resposta imunológica é ilustrativamente, desenvolvida nos anticorpos anti-rotavírus, ativação das células T, células B, ou outras células imune após a administração de uma composição da invenção, ou outras respostas imune conhecidas da técnica.

[0167] Em uma concretização particular, um método para induzir uma resposta imunológica contra uma doença mediada pelo rotavírus em um indivíduo inclui a administração de  $10^4$  a  $10^8$  pfu da vacina viva atenuada ou 1 a 25 microgramas de vírus inativado em uma composição de vacina típica.

[0168] Em algumas concretizações, um método para induzir uma resposta imunológica contra uma doença mediada por rotavírus em um indivíduo inclui a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição de vacina incluindo uma cepa de rotavírus humano CDC-9 e/ou CDC-66, fragmentos de polipeptídeos da mesma, homólogos das mesmas, ou combinações das mesmas.

[0169] Em uma concretização adicional, um método para

induzir uma resposta imunológica contra uma doença mediada pelo rotavírus em um indivíduo inclui a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição de vacina incluindo um sorotipo do grupo G1 e uma segunda cepa de rotavírus humano caracterizada como tendo um sorotipo do grupo G2.

[0170] A administração de uma composição de vacina de acordo com um método da presente invenção inclui a administração de um ou mais doses de uma composição de vacina para um indivíduo em um intervalo de tempo, nas concretizações particulares. Alternativamente, duas ou mais doses de uma composição de vacina são administradas em intervalos de tempo de dias, semanas ou anos. Uma tabela apropriada para a administração das doses da composição de vacina depende de vários fatores, incluindo a idade e o status de saúde do indivíduo, tipo de composição de vacina utilizado e a rota de administração, por exemplo. Um técnico no assunto será capaz de determinar, facilmente, uma dose e a tabela de administração a ser adotada para um indivíduo particular.

[0171] As concretizações da composição da invenção e dos métodos são ilustradas nos exemplos a seguir. Estes exemplos são providos com o propósito ilustrativo e não são considerados limitações do escopo de proteção das composições da invenção e dos métodos.

#### EXEMPLOS

##### Exemplo 1

Adaptação e passagem:

[0172] Um ml de uma suspensão de 10% de vírus em DMEM é suplementada com neomicina em um tubo de baixa ligação

estéril de 1,7 ml, misturado bem e então centrifugado durante 10 minutos em 3.000 rpm em uma micro-centrífuga de Eppendorf. O sobrenadante é transferido para um novo tubo e centrifugado durante 10 minutos a 10.000 rpm (8.000xg). O sobrenadante clarificado é esterilizado através da passagem através de um filtro com poros de 0,45 microns. O sobrenadante é testado por EIA (Rotaclone; Meridian Biosciences) e se o valor OD for > 1,0, ele é armazenado a 4°C antes do uso para infecção. A ferramenta de extração e o teste de rotaclone podem ser feitos um dia antes da infecção.

[0173] O meio de cultura é removido a partir das monocamadas de célula em tubos cilíndricos individuais. Cada tubo cilíndrico foi lavado com 2 ml do meio de manutenção, então 2 ml de meio de manutenção foi adicionado em cada tubo e incubado a 37°C em um aparelho de rotação até o inoculo do vírus estar pronto.

[0174] Uma alíquota de 0,5 ml do sobrenadante é transferida para um tubo estéril e 1 microlitro do estoque de CaCl<sub>2</sub> (300 gramas por litro) é adicionado para preparar uma concentração final de 800 microgramas por mililitro. O tubo é incubado em temperatura ambiente durante 30 minutos antes da adição de 3 microlitros do estoque de tripsina-porcina (2,5 miligramas por mililitros) - concentração final de 15 microgramas por mililitros. A mistura é incubada durante 60 minutos a 37°C. O mesmo volume de MEM é tratado no mesmo sentido que um inoculo simulado. Todas as pipetas do vírus poderiam ser feitas dentro da cabine de segurança biológica.

[0175] O meio é removido a partir de cada tubo cilíndrico e 0,2 a 0,3 mililitros da suspensão do vírus tripsinizado ou inoculo simulado é adicionado a cada tubo cilíndrico usando

pipeta estéril separada. As coberturas são apertadas e os tubos incubados a 37°C sobre o aparelho de tubo cilíndrico localizado em uma incubadora. Após duas horas de incubação, o inóculo é removido usando uma pipeta de 1 ml e lavado gentilmente com 2 ml do meio de manutenção.

[0176] Dois mililitros do meio de manutenção contendo várias concentrações (10, 20 ou 30 microgramas por ml dependendo da cepa) de tripsina são adicionados dentro de cada tubo e incubados durante 2 horas a 37°C em um aparelho de tubo cilíndrico localizado em uma incubadora.

[0177] As células são observadas diariamente para o efeito citopático (CPE), colhidas no dia 4 e armazenada a -70°C. As células são submetidas a dois períodos de congelamento-descongelamento antes da próxima passagem.

[0178] Os lisados de células congeladas-descongeladas são tratados com CaCl<sub>2</sub> e tripsina como descrito acima e, subseqüentes passagens são realizadas como acima. As células são submetidas ao congelamento-descongelamento pelo menos uma vez e analisadas quanto ao antígeno do rotavírus através do kit da Rotaclone ou a titulação do vírus é determinada através da análise FFA.

#### Exemplo 2

Produção e Purificação das cepas de Rotavírus:

[0179] A produção de rotavírus é completada pelo uso da produção em grande escala de garrafas cilíndricas. Resumidamente descritos, as células Vero são cultivadas em meio Dulbecco Eagle modificado suplementado com 5% de soro bovino fetal (Invitrogen Corp, Grand Island, NY) e 50 microgramas/mililitro de neomicina (Sigma Corp., St. Louis, MO). As monocamadas confluentes de células Vero em garrafas

cilíndricas são infectadas com uma cepa de rotavírus particular em uma multiplicidade de infecção de 0,1.

[0180] O rotavírus obtido pela produção em grande escala é purificado de acordo com os procedimentos de operação padrão. Resumidamente descrito, o rotavírus é colhido a partir das culturas infectadas das células Vera quatro dias após infecção. As partículas de rotavírus em tri-camadas são purificadas a partir dos sobrenadantes por centrifugação através de um amortecimento com 40% de sacarose em tampão TNC durante 2 horas a 106,750 x g usando um rotor SW32Ti e então através de centrifugações isopícnico em gradientes CsCl durante 17 horas em 111,160 g usando um rotor SW40Ti. As partículas de rotavírus podem também ser purificadas usando gradientes de sacarose. O tampão TNC é 10 mM de Tris, pH 8,0, 140 mM de NaCl, e 10mM de CaCl<sub>2</sub>. As partículas de rotavírus purificadas são re-suspensas em tampão diluente que é uma solução de sal balanceada Hanks com CaCl<sub>2</sub> e MgCl<sub>2</sub> obtido da Invitrogen Corp., Grand Island, NY, suplementado com 10% de sorbitol (Sigma Corp., St. Louis, MO). A re-suspensão de rotavírus isolada é armazenada a -70°C até ser inativada e administrada em um indivíduo neste exemplo.

[0181] O rotavírus purificado é analisado quanto à pureza e identidade por qualquer uma de várias técnicas, ilustrativamente incluindo SDS-PAGE seguido por coloração com Coomassie Blue, Western blot usando um anticorpo rotavírus específico e/ou microscopia de elétrons. Em adição, a pureza e a identidade das cepas de rotavírus purificado são completadas através da identificação de proteínas virais de estruturas particulares.

[0182] A figura 4 A mostra o rotavírus purificado CsCl da

cepa CDC-9. A figura 4B mostram proteínas virais estruturais identificadas como CDC-9 com dupla e tripla-camadas analisadas por SDS-PAGE em comparação aos marcadores de peso molecular.

### Exemplo 3

Imunogenicidade do rotavírus inativado (IRV):

[0183] A imunogenicidade das cepas de rotavírus é testada em um modelo de camundongo. As partículas de rotavírus mortas purificadas são administradas intramuscularmente aos camundongos sem um adjuvante. Os animais são imunizados com quantidades da proteína de rotavírus mortas na faixa entre 2 e 20 microgramas.

[0184] A imunogenicidade é analisada através da medida da titulação da imunoglobulina incluindo IgM, IgA e IgG nas amostras de sangue obtidas em vários períodos após administração. A neutralização da titulação do anticorpo são medidas pela análise da micro-neutralização como descrito em detalhes em Jiang, B., "Vaccine", 17:1005-1013, 1999, o conteúdo do qual são incorporados aqui por referência. Resumidamente descrito, o soro do camundongo foi serialmente diluído duas vezes em poços duplicados e incubado com o rotavírus RRV tripsina-inativado. O rotavírus ativado ou similarmente tratado com meio MEM livre de soro é incubado na ausência do soro do camundongo e serve como controle positivo e negativo, respectivamente. As células MA104 no meio MEM suplementado com uma concentração final de 10 microgramas/mililitros de tripsina e 0,5% de soro de pinto, obtido da Invitrogen Corp., Grand Island, NY, são adicionados a cada poço. Após a incubação a 37°C durante 18 horas, células são fixadas com formalina. Os antígenos de rotavírus

nas células MA104 são detectados através das células de incubação com o soro hiper-imune anti-RRV de coelho, a IgG anti-coelho marcado com HRP, e então tetrametil benzidina. A titulação do anticorpo de neutralização em um soro é definido como a reciprocidade das maiores diluições resultantes de uma redução de 70% no valor de absorvância comparado àquele do vírus controle.

[0185] As titulações do anticorpo no camundongo injetado com as partículas de rotavírus morto purificado são comparadas com as dos títulos de anticorpo nos camundongos controle. Os títulos dos anticorpos no camundongo controle são tipicamente menos que 100. As figuras 5A e 5B ilustram o anticorpo total e os títulos de anticorpo de neutralização nos camundongos controle e vacinados. O soro total do anticorpo (Figura 5A) e o anticorpo de neutralização (Figura 5B) respondem ao rotavírus inativado termicamente no camundongo. Os camundongos são vacinados I.M. duas vezes com os YK-1 mortos e rotavírus total específico (IgA, IgG, e IgM) e anticorpos de neutralização são determinados por EIA como descrito. Para o anticorpo total, cada espécie de soro é testado em uma diluição inicial de 1:100. Nos espécimes de soro pré-sangrados não foram detectáveis os anticorpos nesta diluição. Um valor de 20 é utilizado para determinação da titulação do meio geométrico e a ilustração. O anticorpo de neutralização é testado em uma diluição inicial de 1:20. A titulação d anticorpo foi expressão como o meio geométrico para cada grupo (n = 7 ou 6). A barra de erro representa 1 erro padrão.

#### Exemplo 4

Adjuvante:

[0186] Em um exemplo adicional,  $\text{Al}(\text{OH})_3$  é adicionado como um adjuvante para as partículas de rotavírus em uma vacina administrada ao camundongo. Os animais são imunizados intramuscularmente uma vez com 2 microgramas ou com 0,2 microgramas das partículas de rotavírus mortos purificados na presença ou na ausência de 600 microgramas  $\text{Al}(\text{OH})_3$ .  $\text{AlOH}$  aumenta dramaticamente os títulos de anticorpo total no camundongo em ambas as concentrações do rotavírus administrado. Nenhuma titulação do anticorpo (menos que 100 diluições) são detectados no camundongo controle imunizado com 600 microgramas de  $\text{Al}(\text{OH})_3$ .

[0187] A figura 6 é um gráfico de barras mostrando as respostas do anticorpo no soro total para o rotavírus termicamente inativado formulado com  $\text{Al}(\text{OH})_3$  nos camundongos controle e vacinados. Os camundongos são vacinados I.M., uma vez com YK-1 morto na ausência ou na presença de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  e nos anticorpos totais rotavírus-específico (IgA, IgG e IgM) são determinados por EIA como descrito. Para o anticorpo total, cada espécime de soro é testado em uma diluição inicial de 1:100. A espécie de soro de pré-sangramento não foi detectável no anticorpo nesta diluição. Um valor de 20 é utilizado para determinação dos títulos no meio geométrico e na ilustração. Os títulos do anticorpo são expressos como o meio geométrico para cada grupo ( $n = 6$ ). A barra de erro representa 1 padrão de erro.

#### Exemplo 5

Modelo em leitão gnotobiótico:

[0188] Um modelo em leitão gnotobiótico da doença de rotavírus foi utilizado. Este modelo de leitão permite testar sob condições definidas evitando problemas de exposição ao

meio de animais e usando a doença como a variável resultante. Este modelo também permite testar uma vacina de rotavírus inativado tendo um sorotipo G1 contra um desafio Wa homotípico. O leitão gnotobiótico são os melhores modelos animais atualmente para infecção e a doença com as cepas de rotavírus humano. (Ver Saif LJ., et al., "Archives of Virology", 1996; 12:S153-61; e Iosef C., et al., "Vaccine", 2002; 20:1741-53; o conteúdo de cada um dos quais sendo incorporado aqui por referência).

[0189] Treze filhotes de leitões gnotobióticos são selecionados e aleatoriamente designados em 4 grupos como indicado Tabela 6.

TABELA 6

Designação do estudo dos leitões

Nome do grupo	Numero de leitões no Grupo	Antígeno CDC-9 (microgramas)	Fosfato de alumínio (microgramas)
AA	4	0	750
BB	4	75	0
CC	3	75	750
DD	2	0 (tampão)	0 (tampão)

[0190] Cada grupo de animais indicado na Tabela 6 é mantido em isolamentos separados. Os animais nos grupos BB e CC foram vacinados intramuscularmente 3 vezes com uma vacina de rotavírus inativado com ou sem um adjuvante, respectivamente. A formulação de vacina neste exemplo inclui 75 microgramas do rotavírus CDC-9, morto e purificado, em diluente misturado com 750 microgramas do fosfato de alumínio. Os animais do grupo AA e DD foram vacinados com 750 microgramas do fosfato de alumínio e tampão, respectivamente, da mesma maneira. A adsorção do antígeno foi determinada através do método de Bradford que demonstrou que 50% dos

antígenos foram ligados ao fosfato de alumínio. Ambos os antígenos ligados e não-ligados foram injetados nesta imunização.

[0191] Como mostrado na tabela 6, os leitões foram imunizados com uma formulação de vacina sem inclusão de antígeno e 750 microgramas de fosfato de alumínio; 75 microgramas de antígeno e sem fosfato de alumínio; 75 microgramas de antígeno e 750 microgramas de fosfato de alumínio; ou sem antígeno e sem fosfato de alumínio, ou seja, apenas o tampão. Cada vacinação é realizada através da injeção de 0,5 mililitros da formulação de vacina nos músculos das pernas traseiras dos leitões. Após 3 doses da formulação de vacina administradas em intervalos de 10-12 dias, os leitões foram oralmente administrados com o rotavírus Wa virulento. Antes da carga de vírus, cada leitão foi inoculado com 3 mililitros de bicarbonato de sódio para neutralizar os ácidos no estômago. Os espécimes fecais são colhidos diariamente dos porcos administrados durante 10 dias. As amostras de sangue são colhidas durante o experimento em intervalos de 7-14 dias. A figura 7A demonstra o vírus que cai nas amostras de fezes dos leitões vacinados sem o antígeno e com 750 microgramas de fosfato de alumínio em 4 animais. A figura 7B mostra o vírus que cai nas amostras de fezes a partir dos leitões imunizados com antígeno e adjuvante. A figura 7D mostra a medida do vírus que caiu nas amostras de fezes dos leitões imunizados apenas com tampão. Isto ilustra que os porcos que tiveram uma vacinação simulada apenas com fosfato de alumínio ou apenas com tampão diluído tiveram uma queda do rotavírus em até 5 dias e em uma titulação maior. Ao contrário, os leitões que foram vacinados

com o rotavírus inativado sem fosfato de alumínio estão parcialmente protegidos, como é evidenciado por uma queda reduzida em 1 dia ou um retardo e redução na queda. Dos 3 leitões que são vacinados com rotavírus inativado e fosfato de alumínio, 2 são completamente protegidos e 1 tem apenas uma curta redução na queda em 1 dia. Assim, estes resultados demonstram a eficácia da formulação de vacina de acordo com as concretizações da presente invenção.

#### Exemplo 6

[0192] Para repetir o experimento acima, onze leitões filhotes gnotobióticos foram selecionados e aleatoriamente designados em 2 grupos como indicado na tabela 7.

TABELA 7

Estruturação do estudo de leitões

Nome do grupo	Número de Leitões no grupo	Antígeno CDC-9 (microgramas)	Fosfato de alumínio (microgramas)
GG	5	0	600
HH	6	50	600

[0193] Como mostrado na Tabela 7, e como descrito por Wang, Y, et al., "Inactivated rotavirus vaccine induces protective immunity in gnotobiotic piglets", impresso cujo conteúdo é incorporado aqui por referência, os leitões são imunizados com uma formulação de vacina sem inclusão do antígeno e 600 microgramas de fosfato de alumínio ou 50 microgramas do antígeno e 600 microgramas de fosfato de alumínio. Cada vacinação é realizada através da injeção de 0,5 mililitros da formulação de vacina nos músculos das pernas traseiras dos leitões. Após 3 doses da formulação de vacina administrada em intervalos de 10-12 dias, os leitões foram oralmente administrados com rotavírus Wa virulento. Antes da administração do vírus, cada leitão foi inoculado

com 3 mililitros de bicarbonato de sódio para neutralizar os ácidos do estômago. Os espécimes fecais foram colhidos a partir dos porcos administrados diariamente durante 10 dias. As amostras de sangue foram colhidas durante o experimento em intervalos de 7-14 dias.

[0194] A figura 8A mostra o nível de resposta do anticorpo IgG específico para rotavírus no soro dos leitões vacinados sem o antígeno e com 600 microgramas de fosfato de alumínio (barras sólidas) ou leitões vacinados com 50 microgramas de antígeno e com 600 microgramas de fosfato de alumínio (barras hachuradas). A figura 8B mostra a resposta do anticorpo neutralizado no soro de leitões vacinados sem o antígeno e com 600 microgramas de fosfato de alumínio (barras sólidas) ou leitões vacinados com 50 microgramas de antígeno e com 600 microgramas de fosfato de alumínio (barras hachuradas). Os leitões vacinados com antígeno desenvolveram níveis significantes de IgG no soro. A carga oral com rotavírus aumenta ainda os níveis de IgG no soro. Os níveis de atividade de neutralização são significativamente maiores em leitões vacinados com 50 microgramas de antígeno e com 600 microgramas de fosfato de alumínio do que com os animais com imunização simulada.

[0195] A figura 9A mostra a queda do vírus nas amostras fecais dos leitões vacinados com 50 microgramas do antígeno e com 600 microgramas de fosfato de alumínio. A figura 9B mostra a queda de vírus nas amostras fecais dos leitões vacinados sem o antígeno e com 600 microgramas de fosfato de alumínio. Estas figuras ilustras que os leitões que tem uma vacinação simulada apenas com fosfato de alumínio ou tampão diluente apenas com uma queda total do rotavírus em até 5

dias e em uma titulação maior. Em contraste, os leitões que foram vacinados com o rotavírus inativado e fosfato de alumínio são protegidos da queda.

[0196] Estes resultados mostram a eficácia da formulação de vacina de acordo com as concretizações da presente invenção e confirmam os resultados no primeiro experimento com leitões. Estes resultados demonstram claramente que IRV formulado com alumínio é altamente imunogênico e protege contra a infecção em leitões e, conseqüentemente, estabelece a prova do conceito para a vacina com rotavírus inativado.

Exemplo 7:

[0197] Modelo em leitões gnotobióticos - III - Imunização com CDC-66:

[0198] Para repetir o experimento acima usando o rotavírus CDC-66, onze filhotes de leitões gnotobióticos foram selecionados e aleatoriamente designados em 2 grupos como indicado na tabela 8.

TABELA 8

Estruturação do estudo com leitões

Nome do grupo	Número de Leitões no grupo	Antígeno CDC-66 (microgramas)	Fosfato de alumínio (microgramas)
GG	5	0	600
HH	6	50	600

[0199] Como mostrado na tabela 7, os leitões foram imunizados com uma formulação de vacina sem inclusão do antígeno e 600 microgramas de fosfato de alumínio ou 50 microgramas do antígeno e 600 microgramas de fosfato de alumínio (AIPO<sub>4</sub>). Cada vacinação foi realizada através da injeção de 0,5 mililitros da formulação de vacina nos músculos das pernas traseiras dos leitões. Após 3 doses da formulação de vacina administradas em intervalos de 10-12

dias, os leitões foram oralmente administrados com rotavírus DS-1 virulento. Antes da administração do vírus, cada leitão foi inoculado com 3 mililitros de bicarbonato de sódio para neutralizar os ácidos do estômago. Os espécimes fecais foram colhidos a partir dos porcos administrados diariamente durante 10 dias. As amostras de sangue foram colhidas durante o experimento em intervalos de 7-14 dias.

[0200] Os leitões vacinados com o antígeno desenvolveram níveis significantes de IgG no soro. A administração oral com o rotavírus melhora ainda os níveis de IgG no soro. Os níveis de atividade de neutralização são significativamente maiores em leitões vacinados com 50 microgramas do antígeno CDC-66 e com 600 microgramas de fosfato de alumínio do que os animais com simulação de imunização.

[0201] Os leitões que tiveram uma vacinação simulada apenas com o fosfato de alumínio ou com tampão diluente apenas tiveram uma queda total do rotavírus em até 5 dias e uma titulação maior. Em contraste, os leitões que foram vacinados com rotavírus CDC-66, inativado e fosfato de alumínio foram protegidos da queda.

[0202] Estes resultados demonstram a eficácia da formulação de vacina de acordo com as concretizações da presente invenção e confirmam os resultados no primeiro experimento em leitões. Estes resultados demonstram, claramente, que o IRV formulado com alumínio é altamente imunogênico e protege contra a infecção em leitões e, conseqüentemente, estabelece a prova do conceito para a vacina de rotavírus inativado.

[0203] Qualquer patente ou publicações mencionadas neste relatório descritivo foram incorporadas aqui por referência

na mesma extensão, como se cada publicação individual fosse especificamente e individualmente indicada como sendo incorporada por referência.

[0204] As composições e métodos descritos aqui são representativos das concretizações preferidas, exemplos, e não pretendem ser limitativos do escopo de proteção da invenção. Mudanças e outros usos destes poderão ocorrer aos técnicos no assunto. As referidas mudanças e outras utilizações podem ser feitas sem fugir do escopo da invenção, tal como representado nas reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de vacina para uso na indução de uma resposta imunológica contra um rotavírus em um indivíduo, caracterizada pelo fato de compreender: um veículo farmacologicamente aceitável misturada com uma cepa de rotavírus isolada de CDC-9 ou CDC-66, sendo que (a) a cepa de rotavírus é inativada por um agente químico ou inativação térmica; ou (b) a cepa de rotavírus é atenuada, ou (c) a cepa de rotavírus é inativada por luz UV e a composição compreende adicionalmente um adjuvante; e onde a cepa do rotavírus isolado é um rotavírus A humano, tendo um genótipo P[8], G1, e:

(A) uma VP1 que tem a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 17;  
uma VP2 que tem a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 20;  
uma VP3 que tem a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 23;  
uma VP4 que tem a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 26;  
uma VP6 que tem a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 29;  
uma VP7 que tem a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 32;  
uma NSP1 que tem a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 2;  
uma NSP2 que tem a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 5;  
uma NSP3 que tem a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 8;  
uma NSP4 que tem a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 11; e  
uma NSP5 que tem a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 14;

ou

(B) uma VP1 que tem a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 18;  
uma VP2 que tem a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 21;  
uma VP3 que tem a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 24;  
a VP4 que tem a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 27;  
a VP6 que tem a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 30;  
uma VP7 that has the amino acid sequence SEQ ID NO: 33;

uma NSP1 that has the amino acid sequence SEQ ID NO: 3;  
uma NSP2 that has the amino acid sequence SEQ ID NO: 6;  
uma NSP3 that has the amino acid sequence SEQ ID NO: 9;  
uma NSP4 that has the amino acid sequence SEQ ID NO: 12; e  
uma NSP5 that has the amino acid sequence SEQ ID NO: 15.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de a cepa do rotavírus humano isolado ser uma cepa de rotavírus atenuado.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de ser formulada para administração parenteral em um indivíduo.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de ser formulada para administração oral ao indivíduo.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de compreender um adjuvante.

6. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de compreender adicionalmente uma cepa de rotavírus isolada tendo um sorotipo do grupo G2.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de a cepa de rotavírus humano que tem um sorotipo do grupo G2 ter um sorotipo P do grupo P1A, P1B, P2A, P3, P4, P5, P6, P8, P11 ou P12.

8. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de a cepa de rotavírus isolada ser um rotavírus inativado.

9. Composição de vacina para uso na indução de uma resposta imunológica contra um rotavírus em um indivíduo, caracterizada pelo fato de:

- um veículo farmacologicamente aceitável misturado com uma

cepa de rotavírus isolada de CDC-9 ou CDC-66, onde (a) a cepa de rotavírus é inativada por um agente químico ou por inativação térmica; ou (b) a cepa de rotavírus é atenuada, ou (c) a cepa de rotavírus é inativada por luz UV e a composição compreende ainda um adjuvante;

sendo que a cepa de rotavírus isolada é um rotavírus humano A, tendo um genótipo P[8], G1, e

(A) uma proteína NSP1 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 71;

uma proteína NSP2 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 77;

uma proteína NSP3 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 83;

uma proteína NSP4 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 89;

uma proteína NSP5 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 95;

uma proteína VP1 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 101;

uma proteína VP2 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 107;

uma proteína VP3 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 113;

uma proteína VP4 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 119;

uma proteína VP6 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 125; e

uma proteína VP7 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 131; ou

(B) uma proteína NSP1 que tem a sequência de aminoácidos da

SEQ ID NO: 72;

uma proteína NSP2 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 78;

uma proteína NSP3 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 84;

uma proteína NSP4 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 90;

uma proteína NSP5 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 96;

uma proteína VP1 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 102;

uma proteína VP2 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 108;

uma proteína VP3 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 114;

uma proteína VP4 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 120;

uma proteína VP6 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 126; e

uma proteína VP7 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 132.

10. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de:

- a proteína NSP1 compreender a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 71;

- a proteína NSP2 compreender a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 78;

- a proteína NSP3 compreender a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 84;

- a proteína NSP4 compreender a sequência de aminoácido da

SEQ ID NO: 90;

- a proteína NSP5 compreender a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 96;

- a proteína VP1 compreender a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 102;

- a proteína VP2 compreender a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 10;

- a proteína VP3 compreender a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 114;

- a proteína VP4 compreender a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 120;

- a proteína VP6 compreender a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 125; e

- a proteína VP7 compreender a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 132.

11. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de compreender ainda um adjuvante.

12. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de ser formulada para administração oral para um indivíduo.

13. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de ser formulada para administração parenteral para um indivíduo.

14. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de a cepa de rotavírus human isolada ser um rotavírus atenuado vivo.

15. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de a cepa de rotavírus humano isolado ser um rotavírus inativado

16. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 9,

caracterizada pelo fato de compreender ainda uma cepa de rotavírus isolado que tem um sorotipo do grupo G2.

17. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de a cepa do rotavírus humano que tem um sorotipo do grupo G2 ter um sorotipo do grupo P de P1A, P1B, P2A, P3, P4, P5, P6, P8, P11 ou P12.

18. Cepa de rotavírus isolada de CDC-9, caracterizada pelo fato de ser um rotavírus A humano, tendo um genótipo P[8], G1, e

- uma VP1 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 18;

- uma VP2 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 21;

- uma VP3 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 24;

- uma VP4 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27;

- uma VP6 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 30;

- uma VP7 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 33;

- uma NSP1 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 3;

- uma NSP2 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6;

- uma NSP3 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9;

- uma NSP4 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 12; e

- uma NSP5 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:

15.

19. Cepa de rotavírus isolado de CDC-66, caracterizada pelo fato de ser um rotavírus A humano, tendo um genótipo P[8], G1, e

- uma proteína NSP1 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 72;

- uma proteína NSP2 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 78;

- uma proteína NSP3 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 84;

- uma proteína NSP4 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 90;

- uma proteína NSP5 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 96;

- uma proteína VP1 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 102;

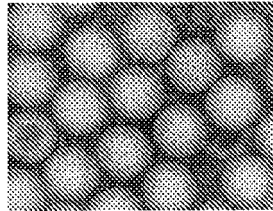
- uma proteína VP2 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 108;

- uma proteína VP3 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 114;

- uma proteína VP4 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 120;

- uma proteína VP6 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 126; e

- uma proteína VP7 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 132.

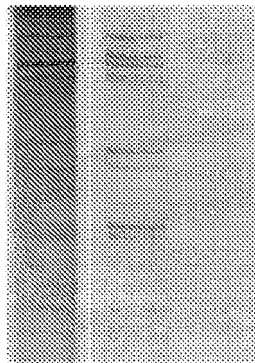


**FIG.1A**



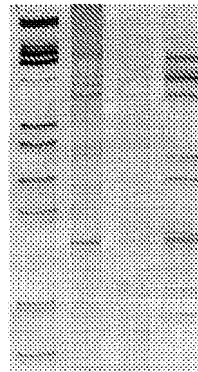
**FIG.1B**

Wa CDC-9  
Excre- Vero  
mento

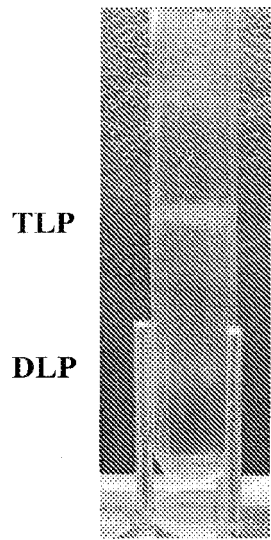


**FIG.2**

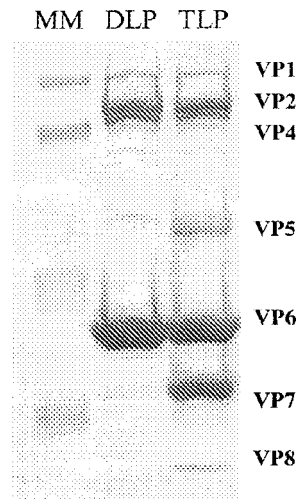
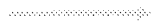
MM RRV CDC-66  
Excre- Vero  
mento



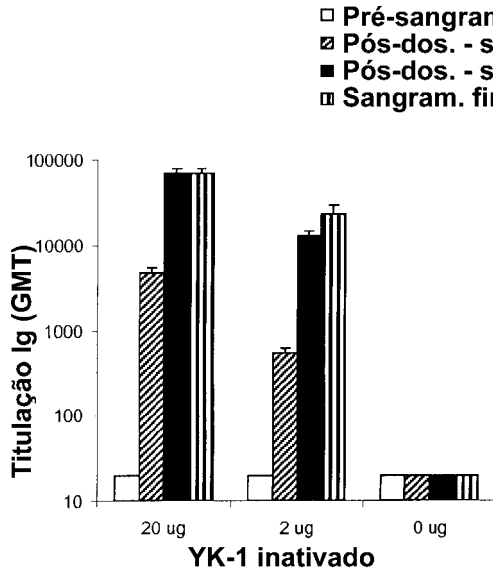
**FIG.3**



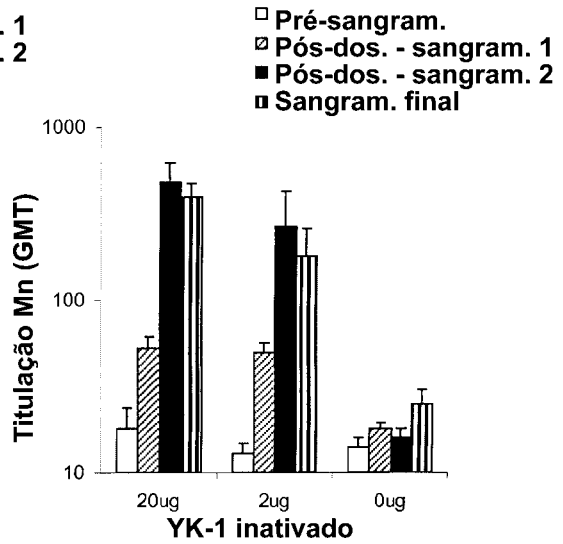
**FIG.4A**



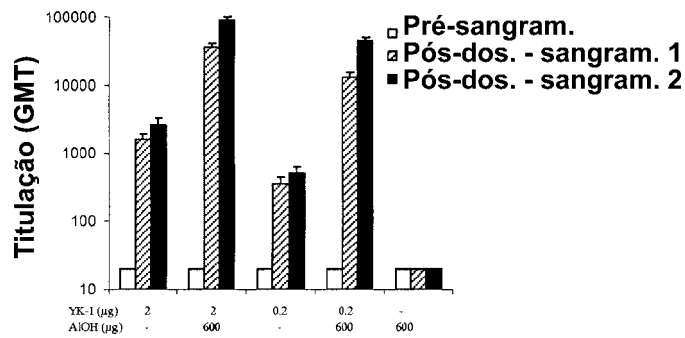
**FIG.4B**



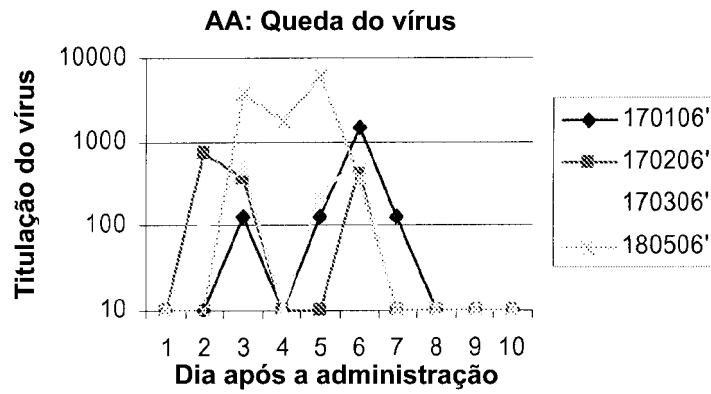
**FIG.5A**



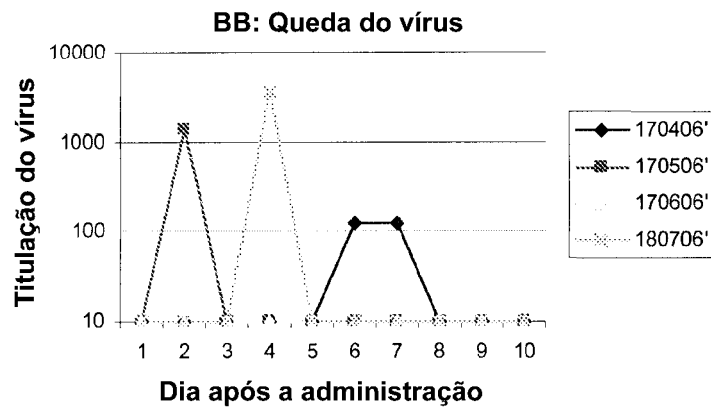
**FIG.5B**



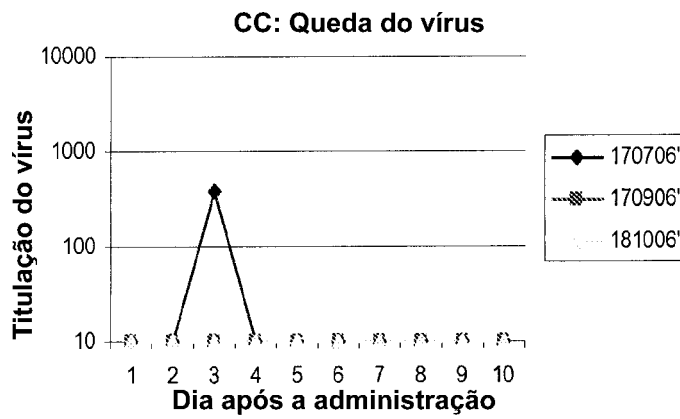
**FIG.6**



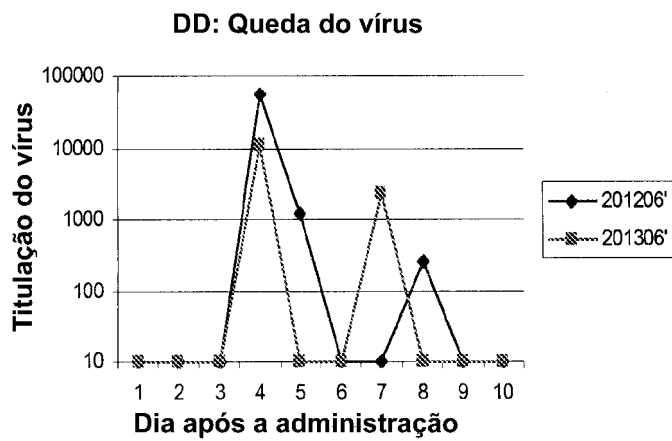
**FIG.7A**



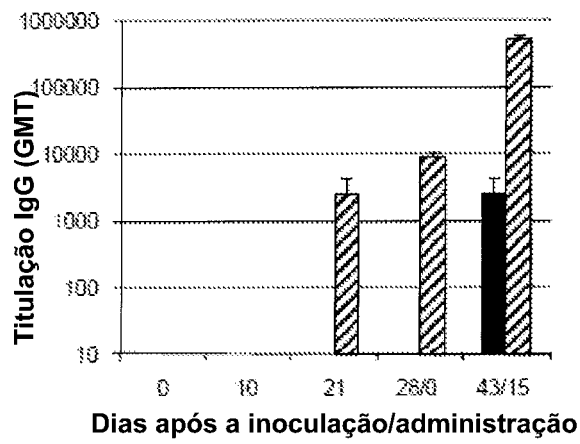
**FIG.7B**



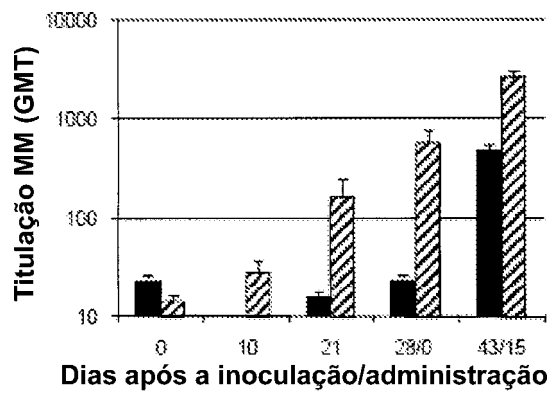
**FIG.7C**



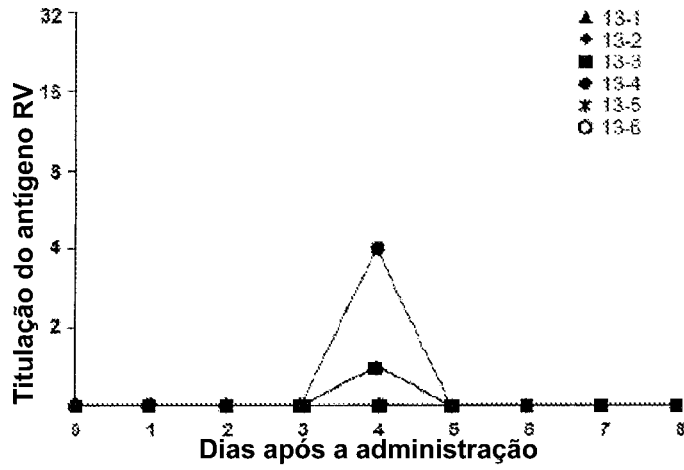
**FIG.7D**



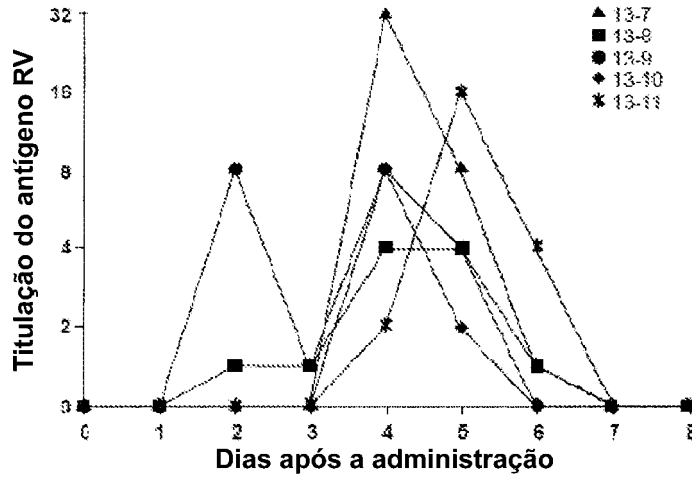
**FIG.8A**



**FIG.8B**



**FIG.9A**



**FIG.9B**