



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

(21) BR 112012000588-0 A2



(22) Data do Depósito: 25/01/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 11/08/2020

(54) **Título:** COMPOSIÇÃO, COMPOSIÇÃO LÍQUIDA, COMPOSIÇÃO LIOFILIZADA E MÉTODO PARA PRODUIR UM ROTAVÍRUS ATENUADO

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

(30) **Prioridade Unionista:** 13/07/2009 IN 1648/CHE/2009.

(71) **Depositante(es):** BHARAT BIOTECH INTERNATIONAL LIMITED.

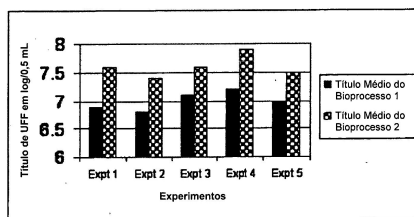
(72) **Inventor(es):** KRISHNA MOHAN VADREVVU; SELVI VEERABADRAN; SAI DEVARAJULU PRASAD.

(86) **Pedido PCT:** PCT IN2010000041 de 25/01/2010

(87) **Publicação PCT:** WO 2011/007363 de 20/01/2011

(85) **Data da Fase Nacional:** 10/01/2012

(57) **Resumo:** UMA COMPOSIÇÃO ÚTIL COMO VACINA PARA ROTAVÍRUS E UM MÉTODO A MESMA São divulgados composições e métodos relacionados aos vírus típicos e pré-condicionados atenuados ou vivos, tais como rotavírus. Os rotavírus atenuados apresentam características de melhor estabilidade e são úteis para a prevenção de uma infecção por rotavírus e/ou gastroenterite por rotavírus em crianças.



COMPOSIÇÃO, COMPOSIÇÃO LÍQUIDA, COMPOSIÇÃO
LIOFILIZADA E MÉTODO PARA PRODUZIR UM ROTAVÍRUS ATENUADO

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a formulações de
5 vacina contendo rotavírus capazes de apresentar valor de
título superior, características de estabilidade
aperfeiçoadas. A formulação pode estar na forma líquida ou
liofilizada e apresentar vida de prateleira melhorada, ao
mesmo tempo em que mantém seu efeito terapêutico. A invenção
10 refere-se também aos métodos para a produção desses vírus e
métodos para preparar essas formulações. A invenção refere-se
adicionalmente aos métodos terapêuticos e profiláticos para
sua utilização.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

15 Há várias vacinas antivirais humanas que estão
atualmente em uso. Estas incluem vacinas para o vírus da
hepatite A, vírus da hepatite B, vírus da gripe, vírus da
encefalite japonesa B, do sarampo, da caxumba, vírus da
rubéola (MMR), vírus da poliomielite, vírus da raiva, da
20 varíola, varicela-Zoster, vírus da febre amarela. Além do
número crescente de produtos de vacina, há diferentes
composições ou formulações em uso ou sendo desenvolvidas para
uma determinada vacina. O uso bem sucedido de vacinas virais
vivas depende não só da escolha adequada e entrega do vírus,
25 mas também da manutenção do título suficiente ou potência
necessária para uma resposta imunológica. A labilidade
inerente de vírus vivos apresenta um desafio particular de
formulação em termos de estabilização e conservação da
viabilidade da vacina durante a fabricação, armazenamento e
30 administração. Há várias formulações conhecidas nas técnicas
de vacinas para rotavírus, mas sofrem de uns ou outros
problemas em relação à estabilidade durante o armazenamento.

O rotavírus é um gênero de vírus de RNA de dupla

fita da família Reoviridae e é transmitido por via fecal-oral. Ele infecta as células que revestem o intestino delgado e produz uma enterotoxina, que induz gastroenterite, levando à diarreia grave e, por vezes, morte por desidratação. A
5 infecção por rotavírus é a maior causa de mortes relacionadas à diarreia entre infantes e crianças jovens. Todos os anos, a gastroenterite por rotavírus causa a morte de 310.000-590.000 infantes e crianças jovens em todo o mundo.

Todas as vacinas para rotavírus desenvolvidas até a
10 data foram baseadas em cepas de rotavírus vivos que foram isoladas de seres humanos ou animais e reestruturadas *in vitro*, adaptadas às culturas de células e, em seguida, formuladas para distribuição oral. Tanto cepas baseadas em animal multivalentes como monovalentes demonstraram eficácia
15 como vacinas candidatas.

A cepa de rotavírus humano 116E, um recombinante humano-bovino natural e naturalmente atenuado, é uma cepa G9 humana em que um único gene VP4 bovino (VP = proteína viral), homólogo ao segmento gênico P[11], foi introduzido
20 naturalmente. A cepa I321, também chamada G10P [11], é principalmente composta de genes bovinos e tem apenas dois segmentos gênicos de origem humana, VP5 e VP7. Estas duas cepas de vacina contra rotavírus foram preparadas individualmente como lotes pilotos de formulações líquidas de
25 vacina oral monovalente contra rotavírus para ensaios clínicos a serem realizados na Índia.

Bharat Biotech International Ltd. (BBIL) obteve as cepas de rotavírus humano, 116E e I321 do *National Institute of Health* (NIH) sob o acordo de transferência de material com
30 o *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID), NIH, Bethesda, EUA. As originais 116E (G9[P11]) e I321 (G10P[11]) foram adaptadas para crescer em cultura de células por passagens em células de rim de macaco verde

africano (AGMK) primárias, em seguida, em substrato de células de MA104 e posteriormente em AGMK de passagens em série (SPAGMK). Os substratos celulares de MA104 e SPAGMK não são aprovados pelas Autoridades Regulatórias Nacionais (ARN) para produção de vacinas comerciais. Portanto, é preferível adaptar 116E e I321 e outras cepas de vacina contra rotavírus ao substrato de células aprovado, certificado, licenciado e plenamente caracterizado como o substrato de células Vero e/ou células diploides humanas como MRC-5.

10 A técnica anterior conhecida do depositante inclui o WO 02/11540 A1 que descreve, formulações vacinais contra rotavírus, que incluem agentes tamponantes apropriados para administração oral de vacinas contra rotavírus. As formulações divulgadas em WO 02/11540 A1 também incluem
15 compostos para estabilizar as composições vacinais contra a perda de potência. Mais especificamente, as composições divulgadas em WO 02/11540 requerem um açúcar, fosfato e pelo menos um carboxilato pelo menos uma albumina sérica humana ou aminoácido selecionado de glutamato, glutamina e arginina.
20 Entretanto, as estabilidades alcançadas variaram muito, especialmente em temperaturas acima de 20°C parecem mostrar consideráveis perdas na potência para as formulações de WO 02/11540 A1.

WO 99/62500 ('500), WO 2005/058356 ('356) A2 e WO
25 2001/012797 ('197) divulgam o uso de estabilizantes de vacinas para a preparação de formulações de vacinas e vacinas liofilizadas, composições de vírus estáveis em armazenamento, método para a separação de variantes de rotavírus e Vacina Líquida de rotavírus atenuado. O '500 divulga a vacina
30 liofilizada contra sarampo-caxumba-rubéola preparada empregando estabilizante que consiste em gelatina hidrolisada, sorbitol, fosfato, cloreto de sódio, sacarose, bicarbonato, glicose albumina sérica humana e citrato. A

invenção conta com a dupla presença de aumento da quantidade de um dissacarídeo e álcool poli-hídrico em pH entre 6,0 e 7,0 para estabilidade térmica. Apesar de requerer um número de ingredientes que torna a invenção cara, não consegue
5 alcançar estabilidade em temperaturas ambientes. Isso, por sua vez adiciona o requisito de infraestrutura especial para armazenar a vacina, tornando a invenção adicionalmente mais cara. Entretanto, a maioria dessas formulações oferece estabilidade de armazenamento limitada e, assim, não é
10 comercialmente viável.

O PCT/IN07/00190, intitulado *A Composition Useful as a Vaccine* divulga uma vacina estável. A essência da invenção gira em torno do efeito combinado da primeira proteína que é a albumina sérica humana, da segunda proteína,
15 que é pelo menos parcialmente hidrolisada e uma combinação de três diferentes açúcares. Adicionalmente, as invenções também se baseiam na inclusão de tripsina no meio de cultura durante a adaptação de vírus. A vacina reivindicada é estável por 3 semanas a 37°C, seis meses a 25°C e um ano a 2°C-8°C.

20 É evidente a partir da descrição anterior que apesar desses avanços na área da formulação de vacinas, permanece uma necessidade distinta de vacina viral viva comercialmente viável com estabilidade térmica e vida de prateleira aperfeiçoadas.

25 A presente invenção atende a essa necessidade, fornecendo vírus vivo ou atenuado que apresenta características de estabilidade melhores e aperfeiçoadas sob a forma de uma massa combinado dessas três coletas individuais do vírus a partir do mesmo lote, ou em uma
30 formulação líquida ou liofilizada. A estabilidade com referência ao vírus (por exemplo, rotavírus ou vacina contra rotavírus) neste documento significará o título viral em um determinado momento a partir do momento da coleta de células

em cultura através de estágio de massa até a vacina formulada. Os inventores, após prolongada investigação, puderam desenvolver uma composição da presente invenção útil como uma vacina que apresenta maior estabilidade da massa e
5 formulado particularmente à temperatura ambiente.

Uma estabilidade aperfeiçoada, em termos estatisticamente significativos, pode ser alcançada pelo uso do vírus que entra em contato com ou foi exposto à albumina sérica humana durante a fase de crescimento e multiplicação
10 de vírus em culturas de células. Para as finalidades desta invenção, considera-se que o vírus entra em contacto com ou é exposto à albumina sérica humana quando as células hospedeiras infectadas com vírus são propagadas em um meio de cultura de células/meio de crescimento complementado com
15 albumina sérica humana. O vírus ou a população de vírus que foi assim exposta à albumina sérica humana é referida como um vírus "pré-condicionado". O vírus que não foi assim exposto à albumina sérica humana é referido como um "vírus típico" neste documento. O vírus pré-condicionado na fase de massa ou
20 sob a forma de uma formulação, isto é, uma vacina/vacina formulada, apresenta melhor estabilidade (em termos estatisticamente significativas) do que o vírus típico.

A presente invenção divulga adicionalmente que a estabilidade do vírus, do vírus pré-condicionado ou do vírus
25 típico, em uma formulação também pode ser adicionalmente aperfeiçoada ou pelo menos prolongada, isto é, a estabilidade pode mantida ou, no mínimo, atrasada alcançando-se gradualmente a estabilidade nula ou zero durante o armazenamento pela prática dos sistemas (i) e (ii): De acordo
30 com o sistema (i), para realizar a estabilidade aperfeiçoada ou prolongada, o vírus é formulado com uma proteína não viral ou seu hidrolisado proteico ou uma proteína vegetal ou uma proteína análoga como albumina sérica humana. O hidrolisado

pode ser exemplificado, mas não se limita ao hidrolisado de lactoalbumina, hidrolisado de levedura, peptona, hidrolisado de gelatina e hidrolisado de proteína do ovo. A proteína vegetal inclui, mas não se restringe à proteína de milho, proteína de trigo, proteína de grão-de-bico, proteína de feijão-roxo, proteína de lentilha, proteína de feijão-de-
5 lima, proteína de feijão branco, proteína de soja, proteína de ervilha seca. A albumina sérica humana é de origem natural ou recombinante. O vírus é formulado com a proteína não viral ou seu hidrolisado proteico simplesmente complementando a
10 formulação usada para fazer a vacina com a proteína não viral ou seu hidrolisado proteico. Este sistema (i) é entendido como um sistema de componente único. De acordo com o sistema (ii), o vírus entra em contato com uma proteína não viral ou
15 seu hidrolisado proteico como no sistema de componente único e 1-2 dissacarídeos, complementando a formulação usada para fazer a vacina com proteína ou hidrolisado proteico e 1-2 dissacarídeos. Entende-se que este sistema (ii) significa um sistema de dois ou três componentes dependendo da formulação
20 que contém o vírus ser suplementado com um único dissacarídeo (sistema de dois componentes) ou com uma combinação de dois dissacarídeos diferentes (sistema de três componentes). Praticando o sistema (ii), os níveis de estabilidade observados no sistema de componente único são adicionalmente
25 aperfeiçoados.

Assim, em um aspecto geral, a presente invenção divulga composições que contém o vírus pré-condicionado ou o vírus típico que exibem estabilidade aperfeiçoadas e/ou prolongada.

30 A novidade da invenção reside em que complementar o meio de cultura com albumina sérica humana durante a propagação do vírus para alcançar a formulação de vacinas e antígeno viral e com maior valor de título, vida de

prateleira e estabilidade térmica mesmo sem a complementação de estabilizantes. A vida de prateleira pode ser adicionalmente aumentada com a adição de estabilizantes como divulgado neste documento antes. Isto leva a uma vacina
5 terapeuticamente melhor pela adoção de processo comercialmente viável rentável simples. Além do avanço técnico, a invenção também qualifica o teste ácido de importância econômica.

OBJETO DA INVENÇÃO:

10 O objetivo principal da presente invenção para fornecer uma composição útil como vacina contra rotavírus com aumento da vida de prateleira prevenindo os inconvenientes da técnica anterior relevante.

O outro objetivo é fornecer formulações de vacinas
15 que contenham rotavírus atenuados capazes de exibir um valor de título mais elevado, características de estabilidade aperfeiçoadas em temperaturas ambientes.

A formulação pode estar na forma líquida ou liofilizada e apresentar vida de prateleira aumentada, ao
20 mesmo tempo em que mantém sua eficácia/potência terapêutica.

A invenção refere-se também aos métodos para a produção desses vírus e métodos para preparar essas formulações.

A invenção refere-se adicionalmente aos métodos
25 profiláticos e terapêuticos para frear as infecções por rotavírus administrando as formulações de vacina aos indivíduos que sofrem de tais infecções.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

O título viral mencionado nas figuras corresponde a
30 Unidades Formadoras de Foco (FFU) por 0,5 mL de coleta de rotavírus 116 E ou massa final e vacina formulada. Em várias figuras neste documento, a referência ao Bioprocasso 1 representa que o material de partida utilizado é o vírus

típico e a referência ao Bioprocesso 2 representa que o material de partida utilizado é o vírus pré-condicionado. A menos que indicado em contrário, os dados nas figuras representam a estabilidade para o vírus pré-condicionado. As

5 Figuras 1-12H mostram dados para formulações líquidas (Liq = líquido) e as Figuras 13A-17C mostram dados para formulações liofilizadas (Lio = liofilizado). Os números expressos em porcentagens representam valores em peso da formulação (composição). Por exemplo, 80% de sacarose devem ser

10 entendidos como 80% de sacarose em peso da formulação (p/v). O erro padrão para todos os pontos de tempo variou de $\pm 0,40$ a $\pm 0,45$.

A Fig. 1 mostra o título médio obtido a partir das coletas de Bioprocesso 1 (vírus típico) e de Bioprocesso 2

15 (vírus pré-condicionado) em cinco experimentos.

A Fig. 2 mostra os dados de estabilidade para as coletas virais, de vírus típico (Bioprocesso 1) e vírus pré-condicionado (Bioprocesso 2), cada um na ausência (Fig. 2A) ou presença (Fig. 2B) de estabilizantes, a saber, 5% de LAH,

20 80% de sacarose e 0,5% de trealose, na formulação líquida a 37°C.

A Fig. 3 (Liq) mostra dados de estabilidade para o vírus pré-condicionado em quatro diferentes formulações em 2-8°C (3A), 25°C (3B) e 37°C (3C). Em cada caso: a série 1

25 refere-se a uma formulação com 2,5% de hidrolisado de lactoalbumina; a série 2 refere-se a uma formulação com 10% de hidrolisado de lactoalbumina e 0,5% de trealose; a série 3 refere-se a uma formulação com 20% de hidrolisado de lactoalbumina; e a série 4 refere-se a uma formulação com a

30 combinação de 2,5% de hidrolisado de lactoalbumina, 0,5% de amido e 0,5% de trealose.

A Fig. 4 (Liq) mostra os dados de estabilidade para o rotavírus em uma formulação com e sem 5% de hidrolisado de

lactoalbumina + 80% de sacarose + 0,5% de trealose mantidos a 2-8°C (4A), 25°C (4B) e 37°C (4C).

A Fig. 5 (Liq) mostra dados de estabilidade para o rotavírus em quatro diferentes formulações em 2-8°C (5A), 25°C (5B) e 37°C (5C). Em cada caso: a série 1 refere-se a uma formulação contendo a combinação de 20% de hidrolisado de lactoalbumina e 0,5% de trealose; a série 2 refere-se a uma formulação contendo a combinação de 10% de hidrolisado de lactoalbumina, 1,0% de lactose; a série 3 refere-se a uma formulação contendo a combinação de 5% de hidrolisado de lactoalbumina, 80% de sacarose; e a série 4 refere-se a uma formulação contendo a combinação de 10% de hidrolisado de lactoalbumina e 50% de maltose.

A Fig. 6 (Liq) mostra dados de estabilidade para o rotavírus em quatro diferentes formulações em 2-8°C (6A), 25°C (6B) e 37°C (6C). Em cada caso: a série 1 refere-se a uma formulação contendo a combinação de 0,5% de hidrolisado de lactoalbumina, 10% de proteína de soja e 1,0% de trealose; a série 2 refere-se a uma formulação com a combinação de 0,5% de hidrolisado de lactoalbumina, 10% de proteína de soja e 1,0% de lactose; a série 3 refere-se a uma formulação com a combinação de 5% de hidrolisado de lactoalbumina, 2,5% de proteína de soja e 80% de sacarose; e a série 4 refere-se a uma formulação com a combinação de 5% de hidrolisado de lactoalbumina, 2,5% de proteína de soja e 50% de maltose.

A Fig. 7 (Liq) mostra dados de alta estabilidade para o rotavírus em quatro diferentes formulações em 2-8°C (7A), 25°C (7B) e 37°C (7C). Em cada caso: a série 1 refere-se a uma formulação contendo a combinação de 10% de hidrolisado de lactoalbumina, 10% de sacarose e 1,0% de trealose; a série 2 refere-se a uma formulação contendo a combinação de 10% de hidrolisado de lactoalbumina, 5% de maltose e 1,0% de trealose; a série 3 refere-se a uma

formulação contendo a combinação de 2,5% de hidrolisado de lactoalbumina, 80% de sacarose e 1% de trealose; e a série 4 refere-se a uma formulação contendo a combinação de 2,5% de hidrolisado de lactoalbumina, 50% de maltose e 1% de trealose.

A Fig. 8 (Liq) mostra dados de estabilidade para o rotavírus em quatro diferentes formulações em 2-8°C (8A), 25°C (8B) e 37°C (8C). Em cada caso: a série 1 refere-se a uma formulação com a combinação do vírus típico, 5% de hidrolisado de lactoalbumina, 80% de sacarose e 0,5% de trealose; a série 2 refere-se a uma formulação contendo a combinação do vírus pré-condicionado, 5% de hidrolisado de lactoalbumina, 80% de sacarose e 0,5% de trealose; a série 3 refere-se a uma formulação com a combinação do vírus típico, 0,1% de albumina sérica humana recombinante (rHSA) e 80% de sacarose, e 0,5% de trealose; a série 4 refere-se a uma formulação com a combinação do vírus pré-condicionado, 0,1% de rHSA, 80% de sacarose e 0,5% de trealose; a série 5 refere-se a uma formulação contendo a combinação do vírus típico, 80% de sacarose e 0,5% de trealose; e a série 6 refere-se a uma formulação contendo a combinação do vírus pré-condicionado, 80% de sacarose e 0,5% de trealose.

A Fig. 9 (Liq) mostra os dados de estabilidade para o rotavírus em cinco diferentes formulações em 37°C.

A Fig. 10 (Liq) mostra os dados de estabilidade para o rotavírus de título baixo em cinco diferentes formulações em 2-8°C (10A) e 37°C (10B).

A Fig. 11A (Liq) mostra os dados de estabilidade para formulações de rotavírus pré-condicionado contendo 20% de peptona hidrolisada em 2-8°C, 25°C e 37°C.

A Fig. 11B (Liq) mostra dados de estabilidade para formulações de rotavírus pré-condicionado contendo uma combinação de 20% de peptona hidrolisada, 1% de trealose e

0,02% de fucose em 2-8°C, 25°C e 37°C.

A Fig. 11C (Liq) mostra dados de estabilidade para as formulações de rotavírus pré-condicionado contendo 20% de hidrolisado de proteína de ovo em 2-8°C, 25°C e 37°C.

5 A Fig. 11D (Liq) mostra dados de estabilidade para formulações de rotavírus pré-condicionado contendo uma combinação de 20% de hidrolisado de proteína de ovo, 0,5% de trealose, 1% de D-sorbitol e 0,5% de manose em 2-8°C, 25°C e 37°C.

10 A Fig. 11E (Liq) mostra dados de estabilidade para formulações de rotavírus pré-condicionado contendo 20% de hidrolisado de lactoalbumina em 2-8°C, 25°C e 37°C.

A Fig. 11F (Liq) mostra dados de estabilidade para formulações de rotavírus pré-condicionados contendo uma
15 combinação de 20% de hidrolisado de lactoalbumina, 0,5% de trealose, em 2-8°C, 25°C e 37°C.

A Fig. 11G (Liq) mostra dados de estabilidade para formulações de rotavírus pré-condicionado contendo 20% de hidrolisado de levedura em 2-8°C, 25°C e 37°C.

20 A Fig. 11H (Liq) mostra dados de estabilidade para formulações de rotavírus pré-condicionado contendo uma combinação de 20% de hidrolisado de levedura, 5% de maltose, e 0,5% de lactose em 2-8°C, 25°C e 37°C.

A Fig. 12A (Liq) mostra dados de estabilidade para
25 formulações de rotavírus típico contendo 20% de peptona hidrolisada em 2-8°C, 25°C e 37°C.

A Fig. 12B (Liq) mostra dados de estabilidade para formulações de rotavírus típico contendo uma combinação de 20% de peptona hidrolisada, 1% de trealose e 0,02% de fucose
30 em 2-8°C, 25°C e 37°C.

A Fig. 12C (Liq) mostra dados de estabilidade para as formulações de rotavírus típico contendo 20% de hidrolisado de proteína de ovo em 2-8°C, 25°C e 37°C.

A Fig. 12D (Liq) mostra dados de estabilidade para formulações de rotavírus típico contendo uma combinação de 20% de hidrolisado de proteína de ovo, 0,5% de trealose, 1% de D-sorbitol e 0,5% de manose em 2-8°C, 25°C e 37°C.

5 A Fig. 12E (Liq) mostra dados de estabilidade para formulações de rotavírus típico contendo 20% de hidrolisado de lactoalbumina em 2-8°C, 25°C e 37°C.

A Fig. 12F (Liq) mostra dados de estabilidade para formulações de rotavírus típico contendo uma combinação de
10 20% de hidrolisado de lactoalbumina, 0,5% de trealose, em 2-8°C, 25°C e 37°C.

A Fig. 12G (Liq) mostra dados de estabilidade para formulações de rotavírus típico contendo 20% de hidrolisado de levedura em 2-8°C, 25°C e 37°C.

15 A Fig. 12H (Liq) mostra dados de estabilidade para formulações de rotavírus típico contendo uma combinação de 20% de hidrolisado de levedura, 5% de maltose, e 0,5% de lactose em 2-8°C, 25°C e 37°C.

A Fig. 13 (Lio) mostra os dados de estabilidade
20 para o rotavírus em quatro diferentes formulações liofilizadas em 2-8°C (13A), 25°C (13B) e 37°C (13C). Em cada caso: a série 1 refere-se à formulação com 0,5% de albumina sérica humana e 12% de sacarose; a série 2 refere-se à formulação com 0,5% de hidrolisado de lactoalbumina, 0,5% de
25 trealose; a série 3 refere-se à formulação com 0,5% de proteína de soja e 0,5% de trealose; e a série 4 refere-se a 0,25% de polivinil pirrolidina, 0,5% de trealose.

A Fig. 14 (Lio) mostra os dados de estabilidade para o rotavírus em quatro diferentes formulações
30 liofilizadas em 2-8°C (14A), 25°C (14B) e 37°C (14C). Em cada caso: a série 1 refere-se à formulação com 0,5% de albumina sérica humana, 12% de sacarose e 0,1% de amido; a série 2 refere-se à formulação com 0,5% de hidrolisado de

lactoalbumina, 0,5% de trealose e 0,1% de amido; a série 3 refere-se à formulação com 0,5% de proteína de soja, 0,5% de trealose e 0,1% de amido; e a série 4 refere-se a 0,25% de polivinil pirrolidina, 0,5% de trealose e 0,1% de amido.

5 A Fig. 15 (Lio) mostra os dados de estabilidade para o rotavírus em quatro diferentes formulações liofilizadas em 2-8°C (15A), 25°C (15B) e 37°C (15C). Em cada caso: a série 1 refere-se à formulação com 0,5% de albumina sérica humana, 12% de sacarose, 0,1% de amido e 304 mM de
10 bicarbonato; a série 2 refere-se à formulação com 0,5% de hidrolisado de lactoalbumina, 0,5% de trealose, 0,1% de amido e 304 mM de bicarbonato; a série 3 refere-se à formulação com 0,5% de proteína de soja, 0,5% de trealose, 0,1% de amido e 304 mM de bicarbonato; e a série 4 refere-se a 0,25% de
15 polivinil pirrolidina, 0,5% de trealose, 0,1% de amido e 304 mM de bicarbonato.

 A Fig. 16 (Lio) mostra os dados de estabilidade para o rotavírus em quatro diferentes formulações liofilizadas em 2-8°C (16A), 25°C (16B) e 37°C (16C). Em cada
20 caso: a série 1 refere-se à formulação com 0,5% de albumina sérica humana, 12% de sacarose e 0,1% de goma acácia; a série 2 refere-se à formulação com 0,5% de hidrolisado de lactoalbumina, 0,5% de trealose e 0,1% de goma acácia; a
série 3 refere-se à formulação com 0,5% de proteína de soja, 0,5% de trealose e 0,1% de goma acácia; e a série 4 refere-se
25 a 0,25% de polivinil pirrolidina, 0,5% de trealose e 0,1% de goma acácia.

 A Fig. 17 (Lio) mostra os dados de estabilidade para o rotavírus em quatro diferentes formulações liofilizadas em 2-8°C (17A), 25°C (17B) e 37°C (17C). Em cada
30 caso: a série 1 refere-se à formulação com 0,5% de hidrolisado de lactoalbumina, 0,25% de polivinil pirrolidina; a série 2 refere-se à formulação com 0,5% de hidrolisado de

lactoalbumina e 0,1% de goma acácia; a série 3 refere-se à formulação com 0,5% de hidrolisado de lactoalbumina e 0,1% de piridoxina HCL; e a série 4 refere-se a 0,5% de hidrolisado de lactoalbumina e 0,1% de amido.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO:

Consequentemente, a presente invenção provê uma composição que compreendendo:

(a) um antígeno viral que seja um rotavírus atenuado e

(b) um tampão de pH fisiológico farmacologicamente aceitável,

em que, a estabilidade da composição com relação ao título viral é aumentada em que o efeito da propagação viral na presença de albumina sérica humana sobre a estabilidade é maior do que a de um propagado na ausência de albumina sérica humana.

De acordo com uma das realizações, a composição pode compreender adicionalmente pelo menos um dos estabilizantes que compreende uma proteína não viral ou seu hidrolisado proteico pelo menos parcialmente hidrolisado, ou dissacarídeos únicos ou combinação de 2 dissacarídeos.

A proteína não viral ou hidrolisado proteico pode ser tal como hidrolisado de lactoalbumina, hidrolisado de levedura, hidrolisado de gelatina, hidrolisado de proteína de ovo, peptona hidrolisada ou proteína vegetal selecionada de proteína de milho, proteína de trigo, proteína de grão-de-bico, proteínas de feijão-roxo, proteína de lentilha, proteína de feijão-de-lima, proteína de feijão branco, proteína de soja, proteína de ervilha seca ou uma proteína análoga exemplificada pela albumina sérica humana, de preferência hidrolisado de lactoalbumina ou proteína de soja hidrolisada, de maior preferência hidrolisado de lactoalbumina.

De acordo com outras realizações, o dissacarídeo empregado pode ser como a trealose ou uma combinação de 2 dissacarídeos compreendendo sacarose e trealose.

5 Uma composição da presente invenção assim pode compreender (a) um antígeno viral que seja um rotavírus atenuado, (b) um tampão de pH fisiológico farmacêuticamente aceitável e (c) proteína não viral ou hidrolisado proteico.

A composição como divulgado acima pode compreender

10 (i) um antígeno viral que seja um rotavírus atenuado como anteriormente divulgado neste documento em um título que varia de 10^3 a 10^{85} UFF/0,5 mL,

(ii) um tampão farmacêuticamente aceitável sendo o tampão de fosfato-citrato (310/100 mM) de pH 6,8 a 8,0 como um diluente/veículo,

15 (iii) o hidrolisado proteico sendo hidrolisado de lactoalbumina na faixa de 20-30% p/v e

(iv) o dissacarídeo sendo a trealose em torno de 0,5% p/v ou sacarose a cerca de 80% p/v e o outro dissacarídeo sendo a trealose em torno de 0,5% p/v.

20 A composição compreende um rotavírus atenuado capaz de exibir um mínimo de 0,8 logs a um máximo de 1,1 logs por mL de título aumentado em média no armazenamento em condições ambientes, em comparação com um rotavírus atenuado propagado na ausência de albumina sérica humana.

25 Além disso, o referido rotavírus atenuado é propagado na presença de 0,1% de albumina sérica humana recombinante.

De acordo com outro aspecto da invenção também é provido um método para produzir um rotavírus atenuado da
30 reivindicação 1 compreendendo:

(i) infectar células hospedeiras com um rotavírus atenuado;

(ii) cultivar as células infectadas em um meio de

cultura de células capaz de dar suporte ao crescimento das referidas células, em que o referido meio é complementado com uma albumina sérica humana e coletar o referido rotavírus capaz de apresentar melhor estabilidade.

5 Em um aspecto específico, a presente invenção divulga uma composição que contém um vírus (ou população viral) vivo e pré-condicionado com uma determinada estabilidade, em que a estabilidade do vírus é caracterizada pela comparação a um vírus (ou população viral) típico vivo
10 que não é propagado na presença de albumina sérica humana (designado como pré-condicionado) e mostra uma perda de título de log 4 maior do que a diferença entre 4,5 e 7,5 UFF/0,5 mL, quando ambas as composições com vírus vivo pré-condicionado ou o vírus vivo típico são armazenadas a 37°C
15 por quatro semanas após a coleta. A composição contém um tampão farmacêuticamente aceitável com ou sem um estabilizante complementar, como um hidrolisado proteico, uma peptona, uma proteína vegetal ou um dissacarídeo na formulação. Em outro aspecto específico, a presente invenção
20 divulga uma composição que contém um vírus (ou população viral) vivo e pré-condicionado capaz de apresentar um mínimo de 0,8 log a um máximo de 1,1 logs por mL de título aumentado em média no armazenamento em condições ambientes, em comparação com um vírus típico vivo, e um tampão
25 farmacêuticamente aceitável, e o vírus pré-condicionado é capaz de apresentar o título sem qualquer estabilizante complementar tais como um hidrolisado proteico não viral, uma peptona, uma proteína vegetal e um dissacarídeo, na composição.

30 Em cada um dos aspectos acima, na medida em que um estabilizante complementar é contemplado, o hidrolisado de lactoalbumina é o estabilizante complementar mais preferido. Um dissacarídeo (por exemplo, trealose) ou uma combinação de

diferentes dissacarídeos (por exemplo, sacarose e trealose) é o próximo estabilizante preferido em uma composição contendo hidrolisado de lactoalbumina. Em uma realização, o hidrolisado de lactoalbumina na composição está a cerca de 5% p/v, a sacarose está a cerca de 80% p/v e a trealose está em torno de 0,5% p/v. A composição pode conter albumina sérica humana recombinante (por exemplo, 0,1% p/v) como um estabilizante complementar.

Em uma realização, o vírus é um rotavírus vivo, como um rotavírus atenuado. De preferência, o vírus vivo é um vírus vivo humano, como o rotavírus humano. Em uma realização particularmente preferida, o rotavírus humano é da cepa de rotavírus 116E ou I321. A composição de acordo com a presente invenção é uma vacina. Em uma realização, a composição de acordo com a presente invenção pode ter um rotavírus atenuado, vivo em um título na faixa de 10^3 a $10^{8,5}$ UFF/0,5 mL. O rotavírus vivo é o rotavírus pré-condicionado.

Em outro aspecto geral, é provido um método para produzir um rotavírus pré-condicionado atenuado. Ele envolve etapas de infecção de células hospedeiras com um rotavírus atenuado, cultivo das células infectadas em um meio de cultura de células complementado com uma albumina sérica humana e capaz de dar suporte ao crescimento das células e coleta do rotavírus pré-condicionado. O rotavírus pré-condicionado coletado apresenta melhor estabilidade, em comparação com um vírus não pré-condicionado ou típico.

Adicionalmente em outro aspecto geral, a presente invenção também divulga um método para a adaptação do vírus a um substrato de células adequado, tais como células Vero, pela passagem seriada através do meio adequado, cada passagem ocorrendo em um meio na ausência ou presença de albumina sérica humana originada de albumina sérica humana ou humana recombinante.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Esta invenção diz respeito às composições e métodos relacionados a rotavírus atenuados. Os rotavírus atenuados apresentam características de estabilidade aperfeiçoadas e
5 são úteis para a prevenção de uma infecção por rotavírus e/ou gastroenterite por rotavírus em crianças.

Em particular, esta invenção divulga várias abordagens e sistemas para prover composições de rotavírus que apresentem estabilidade aperfeiçoada em um determinado
10 momento e estabilidade prolongada por um período de tempo durante o armazenamento. Uma abordagem é o uso de vírus pré-condicionados como material de partida nas composições da invenção. Outra abordagem é o uso de vários estabilizantes para obter a estabilidade aperfeiçoada quando o vírus
15 utilizado é um vírus pré-condicionado.

Como definido acima, o vírus ou população viral coletada a partir de culturas de células propagadas em um meio contendo albumina sérica humana é referida como um vírus ou população viral "pré-condicionada". Contrariamente, o
20 vírus ou população viral coletada a partir de culturas de células em um meio que não contém albumina sérica humana é referida como um vírus ou população viral "típica". O rotavírus atenuado é por vezes referido neste documento como antígeno viral ou antígeno da vacina.

25 Como divulgado neste documento, o vírus pré-condicionado apresenta características de estabilidade aperfeiçoada, em comparação com o vírus típico. Cada um dentre o vírus pré-condicionado e o vírus típico apresenta estabilidade prolongada durante o armazenamento em uma
30 formulação, complementada com um ou mais estabilizantes, em comparação com uma formulação sem os complementos. Entende-se que os estabilizantes, usados para prolongar a estabilidade se o vírus utilizado como o material de partida para a

formulação após a coleta for pré-condicionado ou não, são abrangidos amplamente por três diferentes sistemas de componentes.

O sistema de componente único contém uma proteína não viral ou seu hidrolisado proteico como parte da sua formulação. A proteína não viral ou hidrolisado proteico serve como um estabilizante. O sistema de dois componentes contém um dissacarídeo além de uma proteína não viral ou seu hidrolisado proteico. No sistema de dois componentes, tanto o dissacarídeo como a proteína ou seu hidrolisado servem como estabilizantes. O sistema de três componentes é similar ao sistema de dois componentes, mas tem um dissacarídeo adicional diferente daquele do sistema de dois componentes

Em nosso pedido co-pendente No. 842/CHE/2006, divulgamos uma composição que compreende um antígeno viral; uma primeira proteína que está sendo selecionada dentre albumina sérica humana ou albumina humana recombinante e, uma segunda proteína, que é pelo menos parcialmente hidrolisada e está sendo selecionada dentre hidrolisado de lactoalbumina, hidrolisado de levedura, peptona, e hidrolisado de proteína de ovo e de preferência e uma combinação de três dissacarídeos diferentes, em que o vírus usado não está sendo propagado na presença de HSA. A composição líquida mostra estabilidade por 3-4 semanas a 37°C, seis meses a 25°C e um ano a 2°C-8°C, enquanto a composição liofilizada mostra estabilidade por mais de 50 semanas a

2°C-8°C, 25°C, 37°C.

A composição líquida da presente invenção é estável por 6 semanas a 37°C, por 6 meses a 25°C e 24 meses a 2-8°C.

A composição liofilizada da presente invenção é estável por 16 semanas a 37°C, por 6 meses a 25°C e 24 meses a 2-8°C.

As composições podem ser composições líquidas ou

lioofilizadas (forma seca). A presente invenção divulga rotavírus atenuados e suas composições que mostram estabilidade melhor e aperfeiçoada quando armazenadas de 2 a 8°C ou condições ambientes por um período de tempo prolongado. Condições ambientes podem ser aqueles prevalecentes e típicas condições atmosféricas (por exemplo, 25°C) em um lugar, mas não superior a cerca de 37°C. As composições da presente invenção são capazes de manter sua capacidade imunizante durante a preparação e durante o período necessário para a vida de prateleira de uma vacina comercial (ou seja, as composições são estáveis).

Assim, a composição da presente invenção apresenta estabilidade por um período maior, devido à propagação de vírus na presença de albumina sérica humana em comparação ao que é adicionado externamente.

Em um exemplo, a composição da presente invenção inclui um antígeno viral (vírus pré-condicionado ou o típico), uma proteína não viral ou uma proteína que é diferente do antígeno viral. O termo "proteína não viral" significará qualquer de hidrolisado de proteína de levedura e lactoalbumina, gelatina, proteína de ovo ou uma proteína vegetal que é proteína de milho, proteína de trigo, proteína de grão-de-bico, proteína de feijão-roxo, proteína de lentilha, proteína de feijão-de-lima, proteína de feijão branco, proteína de soja, proteína de ervilha seca e albumina sérica humana, todos de origem natural ou recombinante. De preferência, a proteína é pelo menos parcialmente hidrolisada. Em outras palavras, hidrolisados destas proteínas ou uma peptona pode ser usada nas composições da presente invenção.

A frase "a proteína é pelo menos parcialmente hidrolisada", como utilizado neste documento, deve referir-se a um cenário, no qual a proteína hidrolisada foi pelo menos

parcialmente quebrada em seus respectivos blocos de construção de aminoácidos. Esta frase é, portanto, também deve incluir cenários, onde a proteína não existe mais como uma molécula completa, mas apenas como uma coleção de seus
5 fragmentos. Esta frase deve adicionalmente incluir um cenário onde a proteína é completamente hidrolisada. Todos estes cenários também devem estar incluídos na frase "hidrolisado proteico," que pode incluir uma proteína completamente hidrolisada, ou seja, uma proteína quebrada em seus
10 respectivos aminoácidos, ou uma proteína parcialmente quebrada, tal que exista uma coleção de peptídeos e aminoácidos.

Assim, a proteína ou pelo menos a versão parcialmente hidrolisada pode ser hidrolisado de
15 lactoalbumina, hidrolisado de levedura, peptona, hidrolisado de gelatina e hidrolisado de proteína do ovo ou uma proteína de origem vegetal, como milho, trigo, grão-de-bico, feijão-roxo, lentilhas, feijão-de-lima, feijão branco, soja, ervilhas secas ou uma proteína homóloga humana como albumina
20 sérica humana que é de origem humana ou recombinante. Essas proteínas e hidrolisados proteicos podem ser facilmente feitos por um técnico no assunto, por exemplo, por hidrólise ácida, ou podem ser obtidos comercialmente. Foi demonstrado neste documento que em baixa concentração de rotavírus,
25 especialmente quando a concentração de rotavírus (título) é de 10^3 UFF por 0,5 mL na formulação, a proteína não viral como hidrolisado de lactoalbumina ou proteína de soja contribui para melhor e aperfeiçoada estabilidade quando comparada à proteína não viral - albumina sérica humana ou
30 albumina sérica bovina. O hidrolisado de lactoalbumina é conhecido por um técnico no assunto e está comercialmente disponível. Acredita-se que o hidrolisado de lactoalbumina proveja excelente homogeneização com a rotaproteína tanto na

forma líquida como na forma liofilizada e mantém a unidade da proteína viral, mesmo quando a proteína viral está presente em uma baixa concentração. Em lugar do, ou além do hidrolisado de lactoalbumina, outros, como hidrolisado de levedura, peptona, hidrolisado de gelatina e hidrolisado de proteína do ovo também podem ser usados. A composição inclui adicionalmente um dissacarídeo ou uma combinação dos dois dissacarídeos e um tampão farmacêuticamente aceitável. O dissacarídeo pode ser qualquer um dentre sacarose, lactose, maltose, trealose, celobiose, gentobiose, melibiose, turanose e fucose. O sistema de três componentes contém uma combinação de dois tipos diferentes de dissacarídeos além de uma proteína não viral ou seu hidrolisado proteico. As proteínas ou hidrolisados proteicos e dissacarídeos neste parágrafo são referidos como "estabilizantes."

Os estabilizantes podem ser adicionados a um excipiente, diluente ou veículo (por exemplo, um tampão farmacêuticamente aceitável) que é rotineiramente utilizado em formulações farmacêuticas do vírus. Tais excipientes ou veículos são bem conhecidas na técnica. Especificamente, um diluente adequado ou um tampão farmacêuticamente aceitável é complementado com um ou mais dos estabilizantes acima referenciados. Em uma realização preferida, a amostra contendo rotavírus adiciona-se primeiramente LAH, seguido de sacarose. Se um segundo dissacarídeo for adicionado, então a trealose é preferida em seguida na sequência. A composição sem os estabilizantes é essencialmente uma solução de veículo ou tampão farmacêuticamente aceitável. Além dos estabilizantes nomeados, a composição pode conter cores, aromas, adoçantes, adsorventes e/ou lubrificantes. De preferência, essas composições são tamponadas em um pH apropriado, geralmente entre 6 e 8, de preferência entre 6,8 e 8,0. Por exemplo, em uma realização, a composição de acordo

com a presente invenção pode ser formulada no meio de Eagle modificado por Dulbecco.

Em um aspecto, a presente invenção divulga uma formulação contendo uma população de rotavírus atenuada e pré-condicionada. O rotavírus pré-condicionado apresenta certa estabilidade de nível em um excipiente farmacologicamente aceitável sem quaisquer estabilizantes complementares na composição. A estabilidade da população de rotavírus pré-condicionado é melhor quando comparada a uma população de rotavírus típico atenuado que não é assim pré-condicionado. A população de rotavírus típico, em termos de suas características de estabilidade, mostra uma perda do título de log 4, enquanto o vírus pré-condicionado mostra uma perda significativamente menor do que a perda de título de log 4, quando ambos são armazenados a 37°C por quatro semanas após a coleta.

Em outro aspecto, a presente invenção divulga uma composição contendo um rotavírus pré-condicionado atenuado que é capaz de apresentar um título aumentado em mínimo de 0,8 log a um máximo de 1,1 logs por mL como em comparação ao rotavírus típico atenuado quando armazenado em condições ambientes sem quaisquer estabilizantes complementares na composição.

Em um ou outro caso, a estabilidade do vírus pré-condicionado pode ser aperfeiçoada se pelo menos um estabilizante como hidrolisado de lactoalbumina, hidrolisado de levedura, hidrolisado de gelatina e hidrolisado de proteína do ovo, peptona, uma proteína vegetal e uma albumina sérica humana for adicionado à composição. A estabilidade aperfeiçoada pode ser adicionalmente aperfeiçoada pela adição de um dissacarídeo ou uma combinação de dissacarídeos diferentes à composição. Assim, em uma realização mais preferida, uma composição contém um antígeno viral que é um

rotavírus pré-condicionado, uma proteína diferente do referido antígeno viral, pelo menos parcialmente hidrolisada (como, por exemplo, lactoalbumina, proteína de levedura, peptona, gelatina e proteína do ovo, proteína de milho, 5 proteína de trigo, grão-de-bico, feijão-roxo, lentilha, feijão-de-lima, feijão branco, soja, ervilhas secas ou albumina sérica humana isolada a partir da albumina sérica humana recombinante ou humana e um dissacarídeo ou uma combinação de dois dissacarídeos. Uma composição com um vírus 10 típico também é preferida quando estabilizantes estão presentes na composição, visto que a melhor estabilidade do vírus típico pode ser obtida nessa composição em comparação com o vírus típico em uma composição sem estes estabilizantes.

15 As proteínas, isoladamente ou na combinação de duas proteínas, podem estar presentes no intervalo de 0,01% (p/v) a 80% (p/v), de preferência no intervalo de 0,05% a 50%. De preferência, a proteína usada como estabilizante é qualquer uma dentre hidrolisado de lactoalbumina, albumina sérica 20 humana e proteína de soja. O hidrolisado de lactoalbumina pode estar presente na composição em torno de 0,01% a 70%, de preferência 0,1% a 30%. A proteína de soja pode estar presente na composição em torno de 0,01% a 70%, de preferência 0,05% a 20%. A albumina sérica humana é de 25 preferência de origem recombinante e pode estar presente na composição em torno de 0,01% a 20%, de preferência 0,1% a 0,5%.

De preferência, o dissacarídeo usado como estabilizante pode ser qualquer um dentre trealose, lactose e 30 sacarose. A concentração de trealose preferida é de torno de 0,01% a 70%, da maior preferência 0,5% a 20%. A combinação de dois dissacarídeos diferentes pode ser quaisquer dois dentre sacarose, lactose, maltose, trealose, celobiose, gentobiose,

melibiose e turanose. Por exemplo, a combinação de dois dissacarídeos pode ser qualquer uma dentre sacarose e maltose, sacarose e lactose, sacarose e trealose, maltose e trealose ou trealose e lactose. A combinação preferida de
5 dissacarídeos é sacarose e trealose. De preferência, sacarose está presente em cerca de 1-10% e 70% (p/v) a 85% (p/v), de maior preferência em 5% a 10% e 80% a 85% (p/v) e a trealose está presente em torno de 0,01% (p/v) a 50,0% (p/v), de preferência 0,5% a 20% (p/v). O combinado ou concentração uma
10 dissacarídeo único pode ser cerca de 1-10% ou cerca de 20%-85% (p/v). Em uma realização, a concentração dos dissacarídeos pode ser como a seguir: sacarose em torno de 1-10% e 70% a 85% (p/v), de preferência 5 a 10% ou 80% a 85% (p/v), lactose em torno de 0,1% a 20,0% (p/v), de preferência
15 0,5% a 10% (p/v), maltose em torno de 0,1% (p/v) a 50% (p/v), de preferência 5% a 50% (p/v), trealose em torno de 0,01% (p/v) a 70,0% (p/v), de preferência 0,5% a 20,0% (p/v).

De preferência, a composição é tamponada, usando um tampão fosfato-citrato. De preferência, o tampão fosfato-
20 citrato tem aproximadamente 310 mM de fosfato e aproximadamente 100 mM de citrato. O tampão farmacêuticamente aceitável pode ter um valor de pH no intervalo de 6,8 a 8,0. O tampão pode ser quaisquer dentre tampões fosfatos, carbonatos, citratos, de Tris, de HEPES, assim como suas
25 combinações. O fosfato pode ter uma concentração no intervalo de 10 mM a 1000 mM, de preferência de 50 mM a 310 mM. O carbonato pode ter uma concentração no intervalo de 10 mM a 1000 mM, de preferência de 50 mM a 300 mM. O citrato pode ter uma concentração no intervalo de 10 mM a 400 mM, de
30 preferência de 50 mM a 100 mM. O Tris pode ter uma concentração no intervalo de 0,1 mM a 1000 mM, de preferência de 50 mM a 20 mM. O HEPES pode ter uma concentração no intervalo de 0,1 mM a 1000 mM, de preferência de 10 mM a 20

mM.

Em algumas realizações, amido também pode ser usado como estabilizante. São exemplos de amido o milho, trigo e arroz. O amido pode ser quaisquer dentre amidos solúveis, insolúveis, parcial ou completamente hidrolisados. O amido
5 pode estar presente em torno de 0,01% a 10%, de preferência 0,1 a 3,0%.

A composição pode conter pelo menos um diluente como meio de cultura de tecidos, saline normal, salina
10 tamponada com fosfato ou água. O diluente preferido é o Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM). A composição pode conter adicionalmente pelo menos uma substância química, como ácido ascórbico, goma arábica, goma acácia, polivinil pirrolidina, piridoxina HCl (vitamina B6) e a concentração
15 pode ser estar em torno de 0,1% a 20%, de preferência 0,25% a 5% em peso da composição. A composição é de preferência uma formulação líquida com rotavírus atenuado. A formulação líquida preferida contém um rotavírus pré-condicionado ou um típico e estabilizantes, hidrolisado de lactoalbumina (LAH)
20 que varia de 20-30% p/v e trealose em torno de 0,5% p/v. Outra formulação líquida preferida contém um rotavírus pré-condicionado ou um típico e estabilizantes, hidrolisado de lactoalbumina na composição em torno de 5% p/v, sacarose em torno de 80% p/v e trealose em torno de 0,5% p/v. As
25 composições de acordo com a presente invenção podem ser usadas como uma vacina para vacinação contra a infecção viral e doenças associado ao vírus. As cepas de rotavírus 116E (G9P[11]) e I321(G10P[11]) são recombinantes humano-bovinos naturais, naturalmente atenuados e conferem um nível
30 considerável de imunidade em infantes e crianças jovens. Quando o rotavírus humano for preferido, outros rotavírus que podem ser formulados de acordo com a presente invenção são rotavírus bovinos, rotavírus de porco e rotavírus de

recombinante humano-bovino, rotavírus de cordeiro, rotavírus de ovelha. Composições e formulações adequadas como divulgado neste documento são necessárias para manter a estabilidade de rotavírus de título baixo, ou seja, 10^3 prolongados dado que é conhecido ser uma tarefa desafiadora manter a estabilidade dos valores de título parentais baixos prolongados durante o armazenamento. Uma vacina contra rotavírus que exhibe uma estabilidade aperfeiçoada e/ou prolongada pode ser usada para a prevenção de uma infecção viral, de preferência uma infecção por rotavírus e/ou gastroenterite por rotavírus em crianças ao redor do mundo. De preferência, o tratamento ou prevenção envolve a administração de três doses orais de uma quantidade eficaz da composição a um infante com 8-20 semanas de idade no momento da dose 1.

A tabela a seguir (Tabela 1) dá a comparação entre formulações de rotavírus típico, ou seja, propagado na ausência de albumina sérica humana (1 a 8) e na presença de albumina sérica humana (1A a 8A) e mostra claramente que as formulações compreendendo vírus propagado na presença de albumina sérica humana apresentam mais estabilidade.

Tabela 1

S. No	Perda de Log a 37 graus C	Ponto de Tempo	Perda de Log a 25 graus C	Ponto de Tempo
1	5	4 semanas	1,19	24 semanas
1A	3,73	12 semanas	0,91	24 semanas
2	4	4 semanas	1,09	24 semanas
2A	3,63	20 semanas	0,76	24 semanas
3	4,45	3 semanas	3,48	16 semanas
3A	3,3	12 semanas	2,21	24 semanas
4	4,43	4 semanas	1,9	20 semanas
4A	3,72	12 semanas	1,61	24 semanas
5	4,96	4 semanas	1,66	24 semanas
5A	3,39	8 semanas	1,08	24 semanas
6	4,77	8 semanas	0,86	24 semanas
6A	3,32	12 semanas	0,39	24 semanas
7	5,39	4 semanas	1,98	24 semanas
7A	2,44	12 semanas	0,28	24 semanas
8	4,46	4 semanas	1,96	24 semanas

8A 3,1 20 semanas 0,34 24 semanas

O presente estudo provê também um método para adaptar o rotavírus, por exemplo, recombinantes humano-bovinos naturais, cepas de rotavírus naturalmente atenuadas 116E (G9P [11]) e I321 (G10P [11]) às células adequadas, por exemplo, células Vero. Em uma realização, a adaptação envolve passagens seriadas, 2-20 passagens, de preferência 2-5 passagens. De preferência, cada passagem ocorre durante um período de tempo no intervalo de 24 horas a em geral 6 dias e máximo de 10 dias. De preferência, o vírus é o rotavírus humano. O método inclui dose otimizada de tripsina (0,1 µg/mL a 30 µg/mL) e/ou cloreto de cálcio (100 µg/mL a 1000 µg/mL) para a ativação do vírus e meio de manutenção de vírus onde o título alto (10^4 a 10^8 UFF/mL) de coleta de vírus está dentro de 48 horas a seis dias. Além disso, o uso das cepas adaptadas para fazer composição de vacina contra rotavírus estável, viva, monovalente, líquida é considerado. A presente invenção divulga adicionalmente como produzir rotavírus típicos e pré-condicionados. Ademais, a presente invenção provê a utilização de um antígeno viral, proteína, uma combinação de um ou dois dissacarídeos diferentes para a fabricação de uma composição de acordo com a presente invenção para o tratamento ou prevenção de doenças associadas ao vírus, de preferência doenças associadas ao rotavírus.

EXEMPLOS DE TRABALHO

Os seguintes exemplos de trabalho são providos para demonstrar realizações preferidas da invenção, mas evidentemente, não devem ser interpretados como limitantes de qualquer forma do escopo da presente invenção. Os exemplos a seguir foram realizados utilizando técnicas convencionais que são bem conhecidas e rotina para técnicos no assunto, exceto onde descrito de outra forma em detalhes. Ademais, deve ser apreciado pelos técnicos no assunto que as técnicas

divulgadas nos exemplos representam técnicas encontradas pelo inventor para funcionar bem na prática da invenção e, portanto, pode ser consideradas para constituir modos preferidos para a sua prática. Entretanto, os técnicos no assunto devem, à luz da presente divulgação, apreciar que muitas alterações podem ser feitas em realizações específicas que são divulgadas e adicionalmente obter um resultado semelhantes ou similar sem se afastar do espírito e escopo da invenção.

Exemplo 1. Produção de populações de rotavírus típico e pré-condicionado em massa e suas características de estabilidade:

Bharat Biotech International Ltd. (BBIL) obteve as cepas de rotavírus humano, 116E e I321 do National Institute of Health (NIH) sob o acordo de transferência de material com o National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH, Bethesda, EUA. As originais 116E (G9[P11]) e I321 (G10P[11]) foram adaptadas para crescer em cultura de células por passagens em células de rim de macaco verde africano (AGMK) primárias, em seguida, em substrato de células MA 104 e posteriormente em AGMK de passagens seriadas (SPAGMK). Os substratos celulares MA104 e SPAGMK não são aprovados pelas Autoridades Regulatórias Nacionais (ARN) para uso na produção de vacinas comerciais. Portanto, as duas cepas vacinais de rotavírus humano (116E e I321) foram adaptadas às células Vero, cultivadas separadamente nestas células para produzir populações em massa viral e individualmente preparadas como lotes pilotos de formulações líquidas de vacina oral contra rotavírus, monovalente, viva, atenuada para ensaios clínicos humanos. A cepa de rotavírus humano 116E, um recombinante humano-bovino natural e naturalmente atenuado, é uma cepa G9 humana em que um único gene VP4 bovino (VP = proteína viral), homólogo ao segmento

gênico P[11], foi introduzido naturalmente. A cepa I321, chamada G10P [11], é principalmente composta de genes bovinos e tem apenas dois segmentos gênicos de origem humana, VP5 e VP7. Os exemplos específicos neste documento foram descritos com referência à cepa 116E atenuada.

Em geral, o processo de produção foi o seguinte: Bancos de Células de Trabalho de células Vero foram usados para cultivar rotavírus. As células Vero foram propagadas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma®, MO, EUA) com 5-10% de soro fetal bovino. Rotavírus exigem uma clivagem triptica de uma das duas principais proteínas capsidial externa VP4 na presença de cloreto de cálcio capaz de infectar células Vero *in vitro*. Cepas de rotavírus foram feitas no sistema de lote de semeadura de Banco de Vírus Mestre e Banco de Vírus de Trabalho. Células Vero em meio sem soro foram infectadas com a cepa escolhida e coletas únicas foram feitas a cada 48 horas por 144 horas. Três coletas únicas foram combinadas como uma massa e um estabilizante de glutamato e fosfato de sacarose foi adicionado. Tais massas combinadas foram armazenadas a -70°C ou 2-8°C. Dois métodos de bioprocessamento de fabricação foram seguidos para produzir a massa de população viral atenuada.

Produção viral típica: O Banco de Células de Trabalho de células Vero armazenadas em nitrogênio líquido foi usado para a revitalização e cultivo de monocamadas de células Vero para o processo de produção. Dois criotubos do Banco de Células de Trabalho foram descongelados cuidadosamente a partir do contêiner de armazenamento de nitrogênio líquido e as células transferidas para dois frascos de cultura estéreis de poliestireno T - 150 para revitalização e complementados com DMEM contendo 5% de soro fetal bovino. Os frascos de cultura foram incubados a 37°C por vinte e quatro horas. Após o período de incubação, o meio

foi decantado das culturas que foram reabastecidas com DMEM contendo 5% de soro fetal bovino, meio para promover a formação de monocamadas confluentes.

Os frascos de cultura foram observados ao microscópio por sua morfologia e capacidade de expansão no meio utilizado. As células foram adicionalmente propagadas por duas passagens mais para obter diversos recipientes de células para infecção por rotavírus 116E ou I321.

Rotavírus 116E ou I321 foi selecionado a partir do Banco de Vírus de Trabalho do sistema de lote de semeadura e foi ativado por tripsina e inoculado para infectar as células. O cálculo da multiplicidade de infecção foi feito de acordo com a população de células. As células foram infectadas e foram mantidas a 37°C por uma hora para adsorção. Após o tempo de adsorção, as culturas celulares foram cheias com DMEM sem soro. As culturas de células infectadas foram mantidas a 35°C, e coletas únicas foram feitas a cada 48 horas por 144 horas. Após cada coleta única as culturas celulares foram reabastecidas com DMEM sem soro. As culturas celulares foram encerradas após a terceira coleta única. As coletas únicas filtradas foram feitas em recipientes estéreis e armazenadas a 2-8°C. As coletas únicas foram combinadas para formar uma massa combinada e mantidas a 2-8°C. Foi feita amostragem para testar o conteúdo viral, a esterilidade para cada coleta única e a massa combinada. A massa combinada foi armazenada a -70°C ou 2-8°C em estabilizante SPG (sacarose a 7,46%, di-hidrogenofosfato de potássio a 0,0515%, hidrogenofosfato de dipotássio a 0,128% e glutamato a 0,101%). Alíquotas de amostras também foram retiradas das coletas única sem estabilizantes para a obtenção de dados de estabilidade em temperaturas diferentes.

Produção de vírus pré-condicionado: O Banco de Células de Trabalho de células Vero armazenadas em nitrogênio

líquido foi usado para a revitalização e cultivo de monocamadas de células Vero para o processo de produção. Dois criotubos do Banco de Células de Trabalho foram descongelados cuidadosamente a partir do contêiner de armazenamento de nitrogênio líquido e as células transferidas para dois frascos de cultura estéreis de poliestireno T - 150 para revitalização e complementados com DMEM contendo 5% de soro fetal bovino e 0,1% de albumina sérica humana. Os frascos de cultura foram incubados a 37°C por vinte e quatro horas. Após o período de incubação, o meio foi decantado dos frascos de culturas que foram reabastecidos com DMEM contendo 5% de soro fetal bovino e 0,1% de albumina sérica humana para promover a formação de monocamadas confluentes.

Um segundo conjunto de culturas celulares foi estabelecido, cada uma com 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5% ou 1% de albumina sérica humana (de origem humana) com 5% de soro fetal bovino em DMEM. Um terceiro conjunto de culturas celulares também foi estabelecido, cada uma com 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5% ou 1% de albumina sérica humana (de origem recombinante) com 5% de soro fetal bovino em DMEM.

O criotubo de rotavírus 116E ou I321 foi selecionado a partir do Banco de Vírus de Trabalho do sistema de lote de semeadura e inóculos foram preparados para infectar as culturas de células Vero. A determinação da multiplicidade de infecção foi feita de acordo com a população das células. As culturas celulares foram lavadas duas vezes com salina tamponada com fosfato de pH 7,4 a 7,6. As culturas de células foram infectadas e foram mantidas a 37°C por uma hora para adsorção do vírus. Após o tempo de adsorção, as culturas celulares foram cheias com DMEM com 0,1% de albumina sérica humana. Albumina sérica humana de origem humana ou recombinante foi adicionada às culturas celulares. As culturas de células infectadas foram mantidas a

37°C e múltiplas coletas foram feitas a cada 48 horas e as culturas são reabastecidas com seu respectivo meio contendo de albumina sérica humana (albumina sérica humana recombinante ou de origem humana). As coletas foram coletadas em recipientes estéreis. As coletas foram armazenadas a 2-8°C. As culturas infectadas foram mantidas a 37°C para a multiplicação viral e manutenção das células até a terceira coleta e as culturas foram encerradas após sua terceira coleta. As três coletas de cada conjunto foram combinadas para formar a massa combinada e mantidas a 2-8°C. Foi feita amostragem para testar o conteúdo viral e a esterilidade para cada massa combinada de coleta única. A massa combinada foi armazenada a -70°C ou 2-8°C em estabilizante SPG (sacarose a 7,46%, di-hidrogenofosfato de potássio a 0,0515%, hidrogenofosfato de dipotássio a 0,128% e glutamato a 0,101%). Alíquotas foram coletadas das coletas únicas sem estabilizantes para a obtenção de dados de estabilidade em temperaturas diferentes.

É mostrada na Fig. 1 os dados de título médio obtidos do vírus típico e do vírus pré-condicionado em cinco experimentos. Todos os cinco experimentos foram realizados com os mesmos parâmetros, para demonstrar que a presença de HSA no meio de cultura durante a multiplicação do rotavírus no substrato de células Vero resulta em um título maior do que sem HSA. Três coletas únicas no 2º, 4º e 6º dia após a infecção foram feitas e combinadas; o título foi a média para as 3 coletas a 2-8°C. O vírus pré-condicionado apresentou maior rendimento de título. O título médio mostrou a diferença mínima de título de 0,8 logs e a máxima de 1,1 logs por mL.

Exemplo 2. Formulação dos rotavírus típicos e pré-condicionados nas formas líquidas e liofilizadas e o efeito de cada formulação sobre características de estabilidade:

As massas combinadas, armazenadas a 2-8°C ou -70°C,

foram formuladas em Massas Finais com base no título-alvo de 10^3 a $10^{8,5}$ UFF/0,5 mL e preenchidos como vacina. Com base no título da massa combinada, um volume calculado da massa combinada foi tomado e adicionado a um volume predeterminado da Massa Final que continha estabilizantes, antibióticos e tampões. A Massa Final formulada foi usada para preencher frascos como vacina. Os vários estabilizantes usados em diferentes combinações e concentrações nas formulações foram hidrolisado de lactoalbumina (LAH), trealose, sacarose, amido, lactose, maltose, proteína de soja, rHSA (não incluindo qualquer rHSA residual que possa ter sido transportado com o vírus pré-condicionado coletado do processo de produção de vírus pré-condicionado). Aliquotas de 0,5 mL da formulação contendo o vírus foram transferidas assepticamente para frasco de 2,0 mL e armazenadas a 2-8°C, em 25°C e 37°C. Parâmetros de estabilidade foram testados em intervalos periódicos para demonstrar a estabilidade do vírus típico e do vírus pré-condicionado após a formulação com vários estabilizantes (ver a Tabela 2).

Preparação das formulações líquidas 1-25: Várias formulações foram preparadas pelo cálculo do volume de estabilizantes, tampão e do volume dos antígenos virais e do título-alvo em condições assépticas. A amostragem de cada formulação foi feita assepticamente e rotulada individualmente para indicar o número da amostra, a data de preparação e amostra destinada ao armazenamento em determinada temperatura. Os frascos de amostra foram armazenados a 2-8°C, 25°C e 37°C. Números de amostra são codificados e testados pelos seus títulos periodicamente de acordo com o plano de estudos de estabilidade. Os resultados foram representados nas Figuras da Figura 1 à Figura 12.

Preparação de formulações liofilizadas 26-45:
Várias formulações preparadas pelo cálculo do volume de

estabilizantes, tampão e do volume dos antígenos virais e do título-alvo em condições assépticas. Massas Finais formuladas são usadas para preencher frascos de liofilização assepticamente e são submetidas ao processo de liofilização por 42 h a 48 h. O processo de liofilização normalmente tinha três segmentos: pré-resfriamento, secagem primária e secagem secundária. O ciclo de liofilização foi definido para favorecer os pontos eutéticos de vários estabilizantes usados em formulações diferentes. Uma vez que a liofilização foi concluída, os frascos foram devidamente selados sob vácuo. A amostragem de cada formulação foi feita assepticamente e rotulada individualmente para indicar o número da amostra, a data de preparação e amostra destinada ao armazenamento em determinada temperatura. Os frascos de amostra foram armazenados a 2°-8°C, 25°C e 37°C. Amostras foram testadas pelos seus títulos periodicamente de acordo com o plano de estudos de estabilidade. Os frascos liofilizados foram reconstituídos usando WFI.

Tabela 2

Nº da F. (Fig)	Estabilizante											
	LAH	Sac	Trea	Amid	Lact	Malt	soja	HSA	PVP	bi carb mM	Goma	Pir HCL
1 (2B)	5,0	80,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2 (3)	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3 (3)	10,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4 (3)	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5 (3)	2,5	0,0	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6 (4)	5,0	80	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
7 (5)	20,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8 (5)	10,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9 (5)	5,0	80	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10 (5)	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
11	0,5	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	10,	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

(6)							0					
12 (6)	0,5	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	10, 0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
13 (6)	5,0	80, 0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
14 (6)	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
15 (7)	10,0	10	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16 (7)	10,0	0,0	1,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17 (7)	2,5	80	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18 (7)	2,5	0,0	1,0	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
19 (8)	5,0	80, 0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20 (8)	5,0	80, 0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
21 (8)	0,0	80	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
22 (8)	0,0	80	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
23 (8)	0,0	80	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24 (8)	0,0	80	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
25 (2A 9&10)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
26 (13)	0,0	12, 0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
27 (13)	0,5	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
28 (13)	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
29 (13)	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,25	0,0	0,0	0,0
30 (14)	0,0	12, 0		0,1	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
31 (14)	0,5	0,0	0,5	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
32 (14)	0,0	0,0	0,5	0,1	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
33 (14)	0,0	0,0	0,5	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,25	0,0	0,0	0,0
34 (15)	0,0	12, 0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	304	0,0	0,0
35 (15)	0,5	0,0	0,5	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	304	0,0	0,0
36 (15)	0,0	0,0	0,5	0,1	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	304	0,0	0,0
37 (15)	0,0	0,0	0,5	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,25	304	0,0	0,0
38 (16)	0,0	12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,1	0,0

39 (16)	0,5	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
40 (16)	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
41 (16)	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,25	0,0	0,1	0,0
42 (17)	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,25	0,0	0,0	0,0
43 (17)	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
44 (17)	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
45 (17)	0,5	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

* Abreviações e Explicações:

Nº da F. - Número da formulação

PVP - Polivinil Pirrolidona

Bicarb - 304 mM de bicarbonato

5 Goma - Goma Acácia

Pir HCL - Piridoxina HCL

As formulações 1-24 são formulações líquidas com estabilizantes

As formulações 19, 20, 23 e 24 usam o vírus típico

10 As formulações 21 e 22 usam o vírus pré-condicionado

Formulação 25 - formulação líquida com apenas tampão sem estabilizantes As formulações 26-45 são formulações liofilizadas

15 São mostrados na Fig.2 dados de estabilidade para o vírus típico e o vírus pré-condicionado na ausência (2A) ou presença (2B) de estabilizantes 5% de LAH + 80% de sacarose + 0,5% de trealose na formulação líquida (No. da F. 1) armazenados a 37°C. Nesta temperatura, observa-se que a

20 estabilidade viral cai gradualmente, começando no dia 0 até à 16ª semana com ou sem estabilizantes. Na ausência dos estabilizantes, a queda no título viral pré-condicionado é de 3,2 logs após 4 semanas a 37°C, enquanto a queda no título viral típico é de 4,0 logs. Como pode ser observado na Fig.

25 2B, a presença de estabilizantes atrasou a queda no título

aos níveis observados na ausência de estabilizantes. Além disso, com ou sem estabilizantes, a redução no título é pouco mais lenta no caso do vírus pré-condicionados do que no do vírus típico, demonstrando que a HSA usada no processo de
5 produção contribuiu materialmente para a estabilidade.

São mostrados na Fig. 3 os dados de estabilidade para o rotavírus em quatro diferentes formulações a 2-8°C (3A), 25°C (3B) e 37°C (3C). Em cada caso, a série 1 refere-se a uma formulação com 2,5% de hidrolisado de lactoalbumina, a série 2 refere-se a uma formulação com 10% de hidrolisado
10 de lactoalbumina e 0,5% de trealose, a série 3 refere-se a uma formulação com 20% de hidrolisado de lactoalbumina e a série 4 refere-se a uma formulação com a combinação de 2,5% de hidrolisado de lactoalbumina, 0,5% de amido e 0,5% de trealose. A 2-8°C, não houve queda no título na série 3
15 depois de até vinte e quatro meses, e queda de título de 0,09 log a 0,49 logs foi observada nas séries 1, 2 & 4 após 14 a 24 meses a 2-8°C. A 25°C, as séries 1-4 mostraram uma queda no título no intervalo de 0,94 logs a 2,69 logs após 3 meses
20 e no intervalo de 1,19 a 4,19 logs após 6 meses e no intervalo de 1,89-5,39 após 12 meses. A 37°C, as séries 1 a 4 mostraram queda no título no intervalo de 1,39 a 2,49 logs após seis semanas e as séries 2 e 3 mostraram queda no título de 2,99 a 3,09 logs depois de 10 semanas. Nas séries 1 e 4, o
25 título tornou-se nulo após dez semanas.

São mostrados na Fig.4 os dados de estabilidade para o rotavírus 116E em uma formulação com e sem estabilizantes - 5% de hidrolisado de lactoalbumina + 80% de sacarose + 0,5% de trealose - mantidos a 2-8°C (4A), 25°C
30 (4B) e 37°C (4C). A 2 - 8°C, a formulação de rotavírus sem hidrolisado de lactoalbumina e os dois dissacarídeos mostrou perda gradual de título de 1,84 logs até ao período de 24 meses. O rotavírus com 5% de hidrolisado de lactoalbumina e a

combinação de 80% de sacarose e 0,5% de trealose não mostrou queda no título até o período de 24 meses. A 25°C, a formulação de rotavírus sem o hidrolisado de lactoalbumina e uma combinação de dois dissacarídeos mostrou perda de título de 6,0 logs até o período de 12 meses. O rotavírus com 5% de hidrolisado de lactoalbumina e uma combinação de 80% de sacarose e 0,5% de trealose mostrou queda gradual de 2,81 logs no título até o período de 12 meses. A 37°C, a formulação de rotavírus sem o hidrolisado de lactoalbumina e uma combinação de dois dissacarídeos mostrou perda de título total e tornou-se nula após 6 meses. O rotavírus com 5% de hidrolisado de lactoalbumina e uma combinação de 80% de sacarose e 0,5% de trealose mostrou queda gradual de 3,85 logs no título até o período de 16 semanas.

São mostrados na Fig. 5 os dados de estabilidade para o rotavírus em quatro diferentes formulações a 2-8°C (5A), 25°C (5B) e 37°C (5C). Em cada caso, a série 1 refere-se a uma formulação com a combinação de 20% de hidrolisado de lactoalbumina e 0,5% de trealose, a série 2 refere-se a uma formulação com a combinação de 10% de hidrolisado de lactoalbumina, 1,0% de lactose, a série 3 refere-se a uma formulação com a combinação de 5% de hidrolisado de lactoalbumina, 80% de sacarose e a série 4 refere-se a uma formulação com a combinação de 10% de hidrolisado de lactoalbumina e 50% de maltose. A 2-8°C, o título não caiu nas séries 1 e 3 até 24 meses e as séries 2 e 4 não mostraram queda no título até nove meses e queda de 0,37 a 0,57 logs foi observada após 24 meses. A 25 ° C, não houve queda no título queda em todas as quatro séries até três meses a 25°C e perda de 1,47 logs após 7 meses nas séries 1 e 3. Nas séries 2 e 4, o título caiu para 3,47 a 4,07 logs depois de sete meses. A 37°C, as séries 1 a 4 mostraram queda no título no intervalo de 1,37 a 2,77 logs após quatro semanas e no

intervalo de 1,77 a 4,07 logs após 6 semanas.

São mostrados na Fig. 6 os dados de estabilidade para as formulações líquidas do rotavírus 116E a 2-8°C (6A), 25°C (6B) e 37°C (6C). Em cada caso, a série 1 refere-se a uma formulação com a combinação de 0,5% de hidrolisado de lactoalbumina, 10% de proteína de soja e 1,0% de trealose, a série 2 refere-se a uma formulação com a combinação de 0,5% de hidrolisado de lactoalbumina, 10% de proteína de soja e 1,0% de lactose, a série 3 refere-se a uma formulação com a combinação de 5% de hidrolisado de lactoalbumina, 2,5% de proteína de soja e 80% de sacarose, e a série 4 refere-se a uma formulação com a combinação de 5% de hidrolisado de lactoalbumina, 2,5% de proteína de soja e 50% de maltose. A 2-8 ° C, não houve queda no título nas séries 3 e 4 até vinte e quatro meses e as séries 1 e 2 mostraram uma queda no título insignificante de 0,17 e 0,27 logs. A 25°C, as séries 1-4 mostraram uma queda no título no intervalo de 1,07 logs a 2,17 logs após 3 meses e uma queda no título no intervalo de 2,7 a 4,47 logs após oito meses. A 37°C, as séries 1 a 4 mostraram queda no título no intervalo de 1,16 a 5,07 logs após quatro semanas e uma queda no título no intervalo de 2,1 a 6,17 logs nas séries 2, 3 e 4 e nula na série 1 após oito semanas.

São mostrados na Fig. 7 os dados de alta estabilidade para as formulações líquidas do rotavírus 116E a 2-8°C (7A), 25°C (7B) e 37°C (7C). Em cada caso, a série 1 refere-se a uma formulação com a combinação de 10% de hidrolisado de lactoalbumina, 10% de sacarose e 1,0% de trealose, a série 2 refere-se a uma formulação com a combinação de 10% de hidrolisado de lactoalbumina, 5% de maltose e 1,0% de trealose, a série 3 refere-se a uma formulação com a combinação de 2,5% de hidrolisado de lactoalbumina, 80% de sacarose e 1% de trealose, e a série 4

refere-se a uma formulação com a combinação de 2,5% de hidrolisado de lactoalbumina, 50% de maltose e 1% de trealose. A 2-8 ° C, não houve queda no título nas séries 3 e 4 até vinte e quatro meses e as séries 1 e 2 mostraram queda de 0,19 e 0,4 logs após 15 meses. A 25°C, as séries 1 a 4 mostraram uma queda no título no intervalo de 0,89 a 1,59 logs após três meses e uma queda no título no intervalo de 2,89 a 4,49 logs após sete meses. A 37°C, as séries 1 a 4 mostraram queda no título no intervalo de 0,69 a 3,19 logs após quatro semanas e uma queda no título no intervalo de 1,39 a 4,89 logs após seis semanas.

São mostrados na Fig. 8 os dados de alta estabilidade para as formulações líquidas do rotavírus 116E a 2-8°C (8A), 25°C (8B) e 37°C (8C). Em cada caso, a série 1 refere-se a uma formulação com a combinação de rotavírus típico, 5% de hidrolisado de lactoalbumina, 80% de sacarose e 0,5% de trealose, a série 2 refere-se a uma formulação com a combinação de rotavírus pré-condicionado, 5% de hidrolisado de lactoalbumina, 80% de sacarose e 0,5% de trealose, a série 3 refere-se a uma formulação com a combinação de antígeno do Bioprocesso 1, 0,1% de HSA e 80% de sacarose e 0,5% de trealose e a série 4 refere-se a uma formulação com a combinação de antígeno do Bioprocesso 2, 0,1% de α HSA, 80% de sacarose e 0,5% de trealose, a série 5 refere-se a uma formulação com a combinação de antígenos do Bioprocesso 2, 0,1% de α HSA, 80% de sacarose e 0,5% de trealose, a série 6 refere-se a uma formulação com a combinação de antígeno do Bioprocesso 1, 80% de sacarose e 0,5% de trealose, a série 6 refere-se a uma formulação com a combinação de antígeno do Bioprocesso 2, 80% de sacarose e 0,5% de trealose. A 2-8°C, não houve queda no título nas séries 1, 2 e 4 após 24 meses e as séries 3, 5 e 6 não mostraram perda até 18 meses e queda de aproximadamente 0,2 logs foi observada após 24 meses. A

25°C, as séries 1, 2, 3 e 4 mostraram uma queda no título no intervalo de 0,64 a 1,44 logs após seis meses e uma queda no título no intervalo de 2,64 a 3,05 logs após onze meses. As séries 5 e 6 mostraram uma queda no título no intervalo de 2,44 a 2,82 após seis meses e queda de 5,09 a 5,02 logs após 11 meses. A 37°C, as séries 1, 2, 3 e 4 mostraram queda no título no intervalo de 1,51 a 4,83 logs após seis semanas e uma queda no título no intervalo de 4,0 a 5,04 logs após dezesseis semanas. As séries 5 & 6 mostraram uma queda no título no intervalo de 2,92 a 3,54 após seis semanas e tornaram-se nulas após dezesseis semanas.

São mostrados na Fig. 9 os dados de estabilidade para o rotavírus em cinco diferentes formulações a 37°C. A formulação que não tinha estabilizante mostrou uma profunda queda no valor do título e tornou-se nula após seis semanas. A Massa Final que era vírus pré-condicionado com 80% de sacarose e 0,5% de trealose caiu 2,2 logs após 4 semanas, 2,92 logs após seis semanas, 6,02 logs após 8 semanas e tornou-se nulo após dez semanas. A Massa Final com 20% de hidrolisado de lactoalbumina mostrou queda de 1,39 logs após quatro semanas, queda de 2,09 logs após seis semanas, 2,29 logs após oito semanas e queda de 5,39 logs após 16 semanas. A Massa Final com 20% de hidrolisado de lactoalbumina e 0,5% de trealose mostrou uma queda de título de 4,97 após 16 semanas. A Massa Final com uma combinação de 5% de hidrolisado de lactoalbumina, 80% de sacarose e 0,5% de trealose mostrou queda gradual a partir da primeira semana até a 16a semana; queda de 1,1 logs após 6 semanas, queda de 2,42 logs após 12 semanas e queda de 3,85 logs após 16 semanas. Quando o volume foi formulada com 80% de sacarose, 0,5% de trealose, a estabilidade da vacina a 37°C foi observada até uma semana e degradação lenta até quatro semanas e uma queda acentuada após seis semanas. A massa

formulada com 20% de hidrolisado de lactoalbumina mostrou melhor estabilidade e é capaz de manter até quatro semanas com queda menor que 1,5 log do título e é observada queda gradual do título até 16 semanas. Uma queda não tão dramática do título foi observada com 20% de hidrolisado de lactoalbumina e 0,5% de trealose após 16 semanas a 37 quando comparada com a vacina com 20% de lactoalbumina sozinha. Quando a massa foi formulada com 5% de hidrolisado de lactoalbumina, 80% de sacarose e 0,5% de trealose, foi observada queda menor que 1,5 logs após seis semanas e queda de 3,85 logs após 16 semanas.

São mostrados na Fig. 10 os dados de estabilidade para o rotavírus de título baixo (menos de 10^4) em cinco diferentes formulações a 2-8°C (10A) e 37°C (10B). A 2-8° C, a formulação que não tinha estabilizante mostrou uma queda no valor do título e tornou-se 0,6 após 24 meses. A formulação com 80% de sacarose e 0,5% de trealose mostrou queda de 1,8 log após 24 meses, a formulação com 20% de hidrolisado de lactoalbumina e a formulação com 20% de hidrolisado de lactoalbumina e 0,5% de trealose mostrou queda de 0,8 logs e 0,89 logs, e a formulação com 5% de hidrolisado de lactoalbumina, 80% de sacarose e 0,5% de trealose mostrou queda de 0,7 log no título após 24 meses. A 37°C, a formulação que não tinha estabilizante mostrou uma profunda queda no valor do título e tornou-se 0,8 após quatro semanas. A Massa Final que foi formulada com 80% de sacarose e 0,5% de trealose caiu 2,06 logs após 4 semanas, enquanto que a massa com 20% de hidrolisado de lactoalbumina mostrou queda de 2,48 logs após seis semanas, a massa formulada com 20% de hidrolisado de lactoalbumina e 0,5% de trealose mostrou uma queda de título de 2,79 após 8 semanas. A Massa Final que foi formulada com uma combinação de 5% de hidrolisado de lactoalbumina, 80% de sacarose e 0,5% de trealose mostrou

queda gradual a partir da primeira semana até a 10^a semana; uma queda de 1,2 logs foi observada após 4 semanas, queda de 1,7 logs após 8 semanas e queda de 2,5 logs após 10 semanas. A Fig.10 demonstra o fato de que o hidrolisado de lactoalbumina em concentrações particulares aperfeiçoa definitivamente a estabilidade das vacinas de rotavírus de título baixo a 37°C.

São mostrados nas figuras 11A a 11H os dados de estabilidade para formulações líquidas de vírus pré-condicionados com estabilizantes diferentes. O mesmo é reproduzido abaixo na Tabela 3.

São mostrados nas figuras 12A a 12H os dados de estabilidade para formulações líquidas de vírus típicos com estabilizantes diferentes. O mesmo é reproduzido abaixo na Tabela 4.

Tabela-3

Formulações líquidas de rotavírus 116E

Detalhes da formulação

Peptona hidrolisada-20%

dia 0 semana(s)														
Título	1	2	3	4	6	8	12	16	20	24	36	48	72	97
37 graus C	5,99	5,75	5,48	4,85	4,05	3,72	2,98	2,26						
25 graus C	5,99	6,18	6,01	6	6,08	5,99	5,94	5,98	5,69	5,08				
2 graus C-	5,99				6,02			5,82		5,97	6,01	5,95	6,13	6,02
8 graus C							6,05							

Detalhes da formulação

Peptona hidrolisada-20%

Trealose-1 %

Fucose-0,02%

		dia 0 semana(s)													
		título													
		1													
		2													
		3													
		4													
		6													
		8													
		12													
		16													
		20													
		24													
		36													
		48													
		72													
		97													
37 graus C	6,28	6,11	5,65	5,45	5,28	4,97	4,57	4,05	3,32	2,65					
25 graus C	6,28	6,12	6,13	6,03	6,05	5,98	6,21	6,2	5,94	5,82	5,52				
2 graus C-	6,28				6,15			6,02		6,17	6,15	6,12	6,25	6,16	
8 graus C															

Detalhes da formulação

Hidrolisado de proteína do ovo-20%

dia 0 semana(s)

	título													
	1	2	3	4	6	8	12	16	20	24	36	48	72	97
37 graus C	6,11	5,56	4,56	4,11	3,98	3,25	2,81	6,11	5,56					
25 graus C	6,11	6,1	6	5,98	5,97	6,14	6,02	4,99	4,25	3,95	3,9			
2 graus C-	6,11			6,18			6,1			6,03	6,04	6,08	6,12	6,18
8 graus C														

Detalhes da formulação

Hidrolisado de proteína do ovo-20%

Trealose 0,5%

D-Sorbitol-1%

Manose-0,5%

dia 0 semana(s)

título	1	2	3	4	6	8	12	16	20	24	36	48	72	97
37 graus C	6,17	5,02	4,89	4,15	3,75	3,05	2,45							
25 graus C	6,17	6,12	6,03	6,05	5,97	6,04	5,84	5,34	4,97	4,56				
2 graus C-	6,17			6,23			6,04			6	6,15	6,19	6,23	6,17
8 graus C														

Detalhes da formulação

Hidrolisado de lactoalbumina-20 %

dia 0	semana(s)	1	2	3	4	6	8	12	16	20	24	36	48	72	97
título		1	2	3	4	6	8	12	16	20	24	36	48	72	97
37 graus C	6,08	4,96	2,81	1,78	1,12										
25 graus C	6,08	6,12	6,21	5,96	6,22	5,89	6,01	5,92	5,43	4,98	4,42				
2 graus C-	6,08				6,18			6,36			6,11	6,06	5,99	6,12	6,23
8 graus C															

Detalhes da formulação

Hidrolisado de lactoalbumina-20 %

Trealose 0,5%

dia 0	semana(s)	1	2	3	4	6	8	12	16	20	24	36	48	72	97
título		1	2	3	4	6	8	12	16	20	24	36	48	72	97
37 graus C	6,12	4,56	3,46	2,66	2,06	1,89	1,35								
25 graus C	6,12	6,21	6,15	6,06	6,13	6,18	6,25	6,31	5,85	5,67	5,26				
2 graus C-	6,12				6,32			6,21			6,26	6,11	6,15	6,01	6,07
8 graus C															

Detalhes da formulação

Hidrolisado de levedura-20%

dia 0	semana(s)	1	2	3	4	6	8	12	16	20	24	36	48	72	97
título		1	2	3	4	6	8	12	16	20	24	36	48	72	97
37 graus C	6,22	6,01	3,35	1,76	0,83										
25 graus C	6,22	6,1	6,23	6,03	6,13	5,76	5,28	5,18	5,02	4,89	4,24				
2 graus C-	6,22				6,28			6,45			6,16	6,04	6,15	6,27	6,35
8 graus C															

Detalhes da formulação

Hidrolisado de levedura-20%

Maltose-5%

Lactose-0,5%

Detalhes da formulação
Hidrolisado de proteína do ovo-20%
Trealose 0,5%
D-Sorbitol-1%
Manose-0,5%

	dia 0 semana(s)													
	título													
	1	2	3	4	6	8	12	16	20	24	36	48	72	97
37 graus C	5,58	3,28	2,76	1,59										
25 graus C	6,05	6,11	6,14	5,94	5,97	6,13	5,29	4,51	4,12					
2 graus C-				6,23			6,12			6,28	6,33	6,15	6,01	6,17
8 graus C														

Detalhes da formulação
Hidrolisado de lactoalbumina-20 %

	dia 0 semana(s)													
	título													
	1	2	3	4	6	8	12	16	20	24	36	48	72	97
37 graus C	4,96	2,81	1,78	1,12										
25 graus C	6,12	6,21	5,96	6,22	5,89	6,01	5,92	5,43	4,98	4,42				
2 graus C-				6,18			6,36			6,11	6,06	5,99	6,12	6,23
8 graus C														

Detalhes da formulação
Hidrolisado de lactoalbumina-20 %
Trealose 0,5%

	dia 0 semana(s)													
	título													
	1	2	3	4	6	8	12	16	20	24	36	48	72	97
37 graus C	4,56	3,46	2,66	2,06	1,89	1,35								
25 graus C	6,21	6,15	6,06	6,13	6,18	6,25	6,31	5,85	5,67	5,26				
2 graus C-				6,32			6,21			6,26	6,11	6,15	6,01	6,07
8 graus C														

Detalhes da formulação
Hidrolisado de levedura-20%

dia 0 semana(s)														
título														
	1	2	3	4	6	8	12	16	20	24	36	48	72	97
37 graus C	6,22	3,35	1,76	0,83										
25 graus C	6,22	6,23	6,03	6,13	5,76	5,28	5,18	5,02	4,89	4,24				
2 graus C-	6,22			6,28			6,45			6,16	6,04	6,15	6,27	6,35

São mostrados nas Figs. 13-17 os dados de estabilidade para as formulações liofilizadas de rotavírus 116E, Nos. da F. 26-45, em cada caso a 2°-8°C (A), 25°C (B) e 37°C (C).

5 Este exemplo demonstra que algumas formulações são adequadas para a manutenção da estabilidade a 2°-8°C por períodos prolongados. Também demonstra que algumas formulações são particularmente adequadas para o armazenamento a 25°C ou mesmo a 37°C.

10 Todas as publicações, patentes e publicações de pedido de patente, mencionadas no relatório descritivo são indicativas do nível dos técnicos no assunto a que pertence essa invenção. Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes mencionados são incorporados neste documento pela
15 referência na mesma medida como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse específica e individualmente indicado para ser incorporado pela referência. Embora a invenção antecedente tenha sido descrita em detalhes por meio de ilustração e exemplo, para fins de clareza de
20 entendimento, será óbvio que determinadas alterações e modificações podem ser praticadas dentro do escopo das reivindicações anexadas.

REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSIÇÃO, caracterizada por compreender:

(a) um antígeno viral que seja um rotavírus atenuado e

5 (b) um tampão de pH fisiológico farmacêuticamente aceitável,

em que, a estabilidade da composição com relação ao título viral é aumentada em que o efeito da propagação viral na presença de albumina sérica humana sobre a estabilidade é maior do que a de um propagado na ausência de albumina sérica humana.

2. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender adicionalmente pelo menos um dos estabilizantes que compreende uma proteína não viral ou seu hidrolisado proteico pelo menos parcialmente hidrolisado, ou dissacarídeos únicos ou combinação de 2 dissacarídeos.

3. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada em que a proteína não viral ou hidrolisado proteico compreende pelo menos um dos seguintes: hidrolisado de lactoalbumina, hidrolisado de levedura, hidrolisado de gelatina, hidrolisado de proteína de ovo, peptona ou proteína vegetal selecionada de proteína de milho, proteína de trigo, proteína de grão-de-bico, proteínas de feijão-roxo, proteína de lentilha, proteína de feijão-de-lima, proteína de feijão branco, proteína de soja, proteína de ervilha seca ou uma proteína análoga exemplificada pela albumina sérica humana.

4. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada em que o dito hidrolisado proteico é hidrolisado de lactoalbumina.

30 5. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada em que um-dissacarídeo é trealose.

6. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada em que a combinação de 2 dissacarídeos

compreende sacarose e trealose.

7. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender:

5 (a) um antígeno viral que seja um rotavírus atenuado,

(b) um tampão de pH fisiológico farmacêuticamente aceitável, e

(c) proteína não viral ou hidrolisado proteico

10 8. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender:

(a) um antígeno viral que seja um rotavírus atenuado e

(b) um tampão de pH fisiológico farmacêuticamente aceitável,

15 (c) proteína não viral ou hidrolisado proteico e

(d) um dissacarídeo

9. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender:

20 (a) um antígeno viral que seja um rotavírus atenuado e

(b) um tampão de pH fisiológico farmacêuticamente aceitável,

(c) proteína não viral ou hidrolisado proteico e

(d) uma combinação de 2 dissacarídeos.

25 10. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada por compreender:

a. um antígeno viral que seja um rotavírus atenuado, tal como definido na reivindicação 1, em um título que varia de 10^3 a $10^{8,5}$ UFF/0,5 mL,

30 b. um tampão farmacêuticamente aceitável sendo o tampão de fosfato-citrato (310 mM de fosfato e 100 mM de citrato) de pH 6,8 a 8,0 como um diluente/veículo,

c. o hidrolisado proteico sendo hidrolisado de

lactoalbumina no intervalo de 20-30% p/v e

d. o dissacarídeo sendo trealose em torno de 0,5% p/v.

11. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada por compreender:

a. um antígeno viral que seja um rotavírus atenuado, tal como definido na reivindicação 1, em um título que varia de 10^3 a $10^{8,5}$ UFF/0,5 mL,

b. um tampão farmacêuticamente aceitável sendo o tampão de fosfato-citrato (310 mM de fosfato e 100 mM de citrato) de pH 6,8 a 8,0 como um diluente/veículo,

c. o hidrolisado proteico sendo hidrolisado de lactoalbumina em torno de 5% p/v,

d. um dissacarídeo sendo a sacarose em torno de 80% p/v e o outro dissacarídeo sendo a trealose em torno de 0,5% p/v.

12. COMPOSIÇÃO, de acordo com reivindicação 1, caracterizada em que um rotavírus atenuado é capaz de apresentar um mínimo de 0,8 log a um máximo de 1,1 logs por mL de melhor título em média no armazenamento em condições ambientes, em comparação com um rotavírus atenuado propagado na ausência de albumina sérica humana.

13. COMPOSIÇÃO, de acordo com reivindicação 1, caracterizada em que o dito rotavírus atenuado que é propagado na presença de 0,1% de albumina sérica humana.

14. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 13, caracterizada por ser uma composição líquida ou liofilizada.

15. COMPOSIÇÃO LÍQUIDA, tal como definida na reivindicação 14, caracterizada por ser estável por 6 semanas a 37°C, por 6 meses a 25°C e 24 meses a 2°-8°C.

16. COMPOSIÇÃO LIOFILIZADA, tal como definida na reivindicação 14, caracterizada por ser estável por 16

semanas a 37°C, por 6 meses a 25°C e 24 meses a 2°-8°C.

17. COMPOSIÇÃO, de acordo com as reivindicações 1 a 16, caracterizada por ser útil como vacina para tratar indivíduo que sofra de infecção por rotavírus.

5 18. MÉTODO PARA PRODUZIR UM ROTAVÍRUS ATENUADO, tal como definido na reivindicação 1, caracterizado por compreender:

(i) infectar células hospedeiras com um rotavírus atenuado;

10 (ii) cultivar as células infectadas em um meio de cultura de células capaz de dar suporte ao crescimento das ditas células, em que o dito meio é complementado com uma albumina sérica humana; coletar o dito rotavírus capaz de apresentar melhor estabilidade.

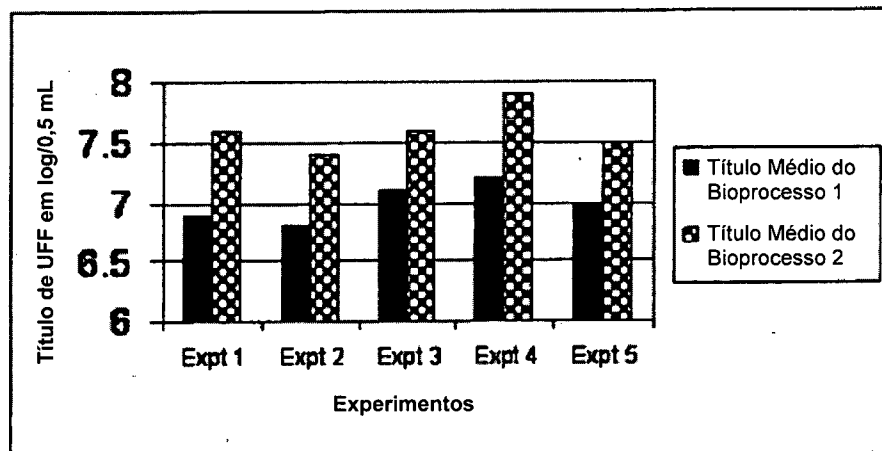


Fig. 1

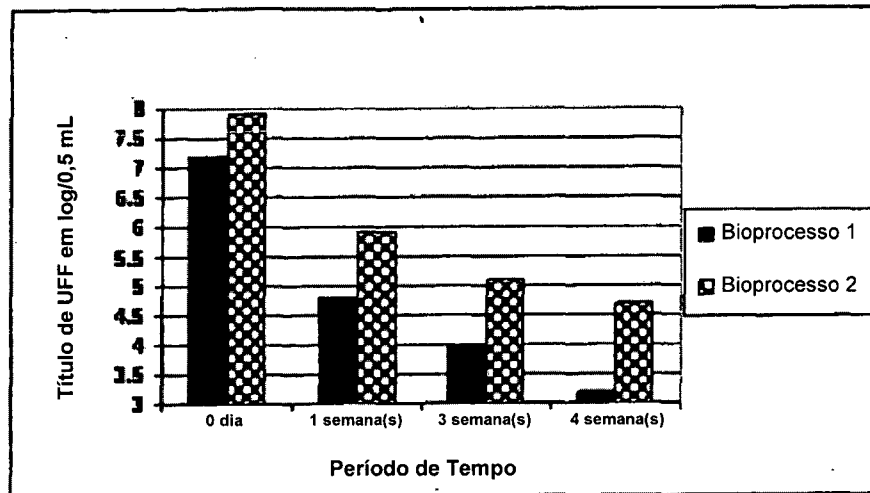


Fig. 2A

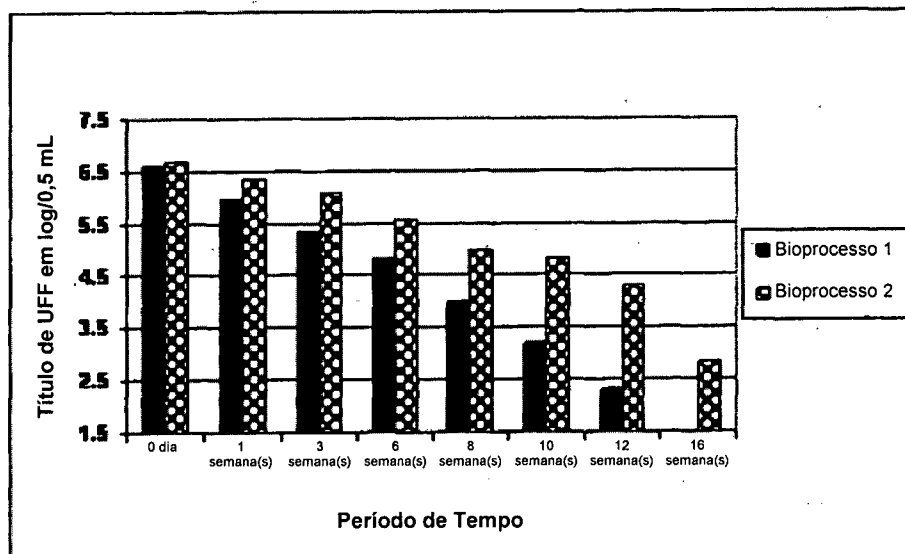


Fig. 2B

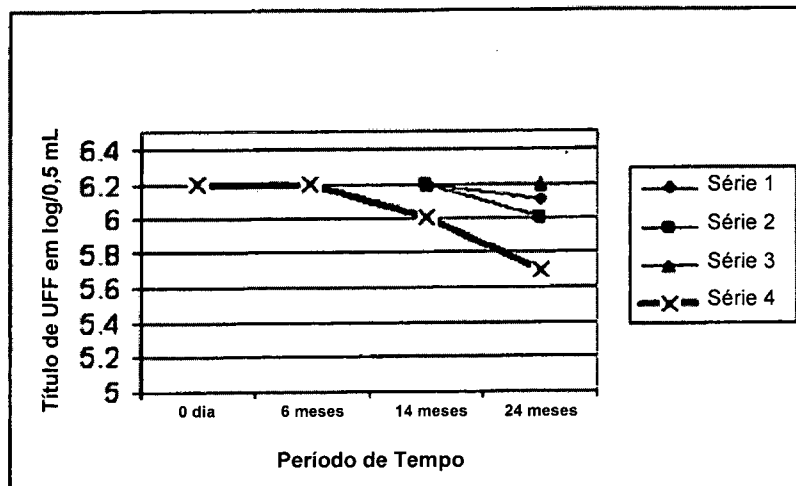


Fig. 3A

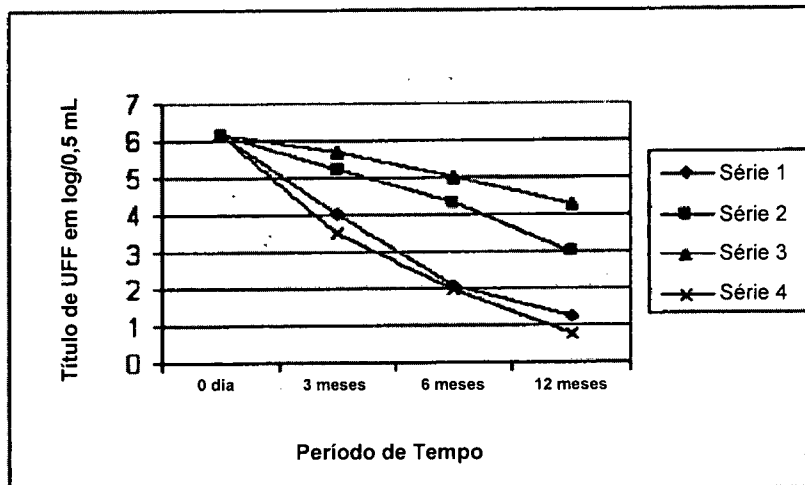


Fig. 3B

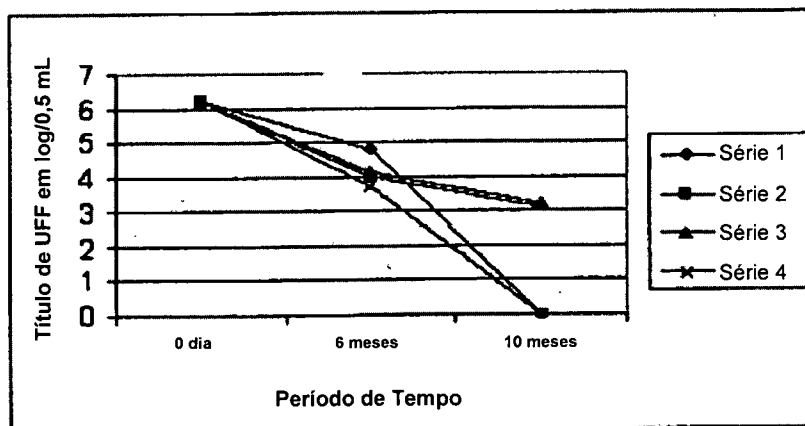


Fig. 3C

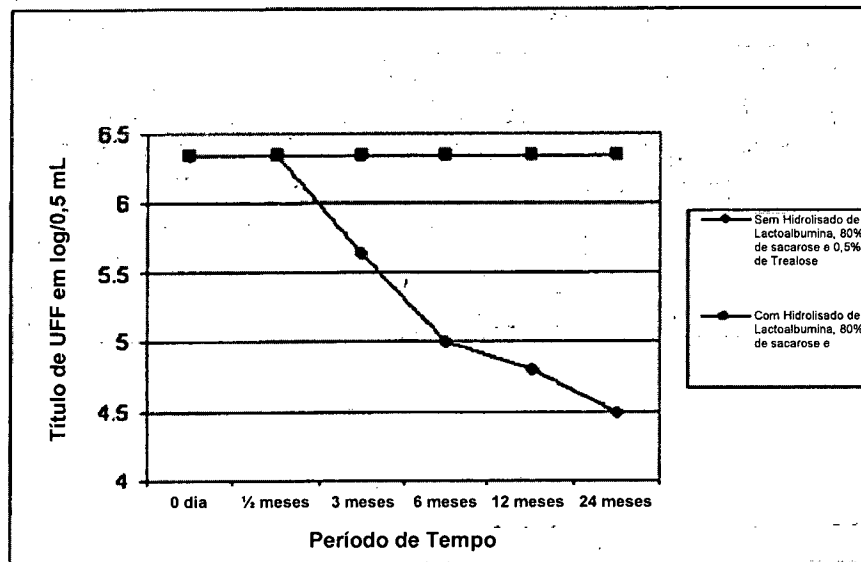


Fig. 4A

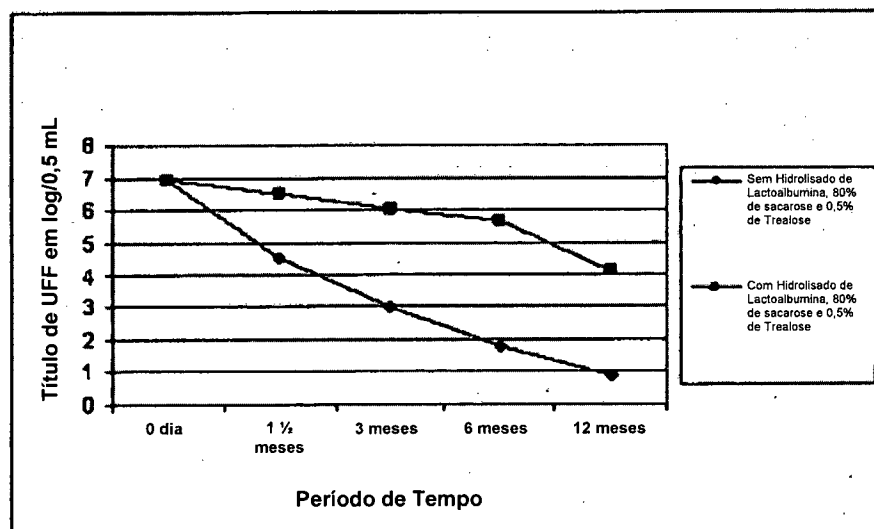


Fig. 4B

5/24

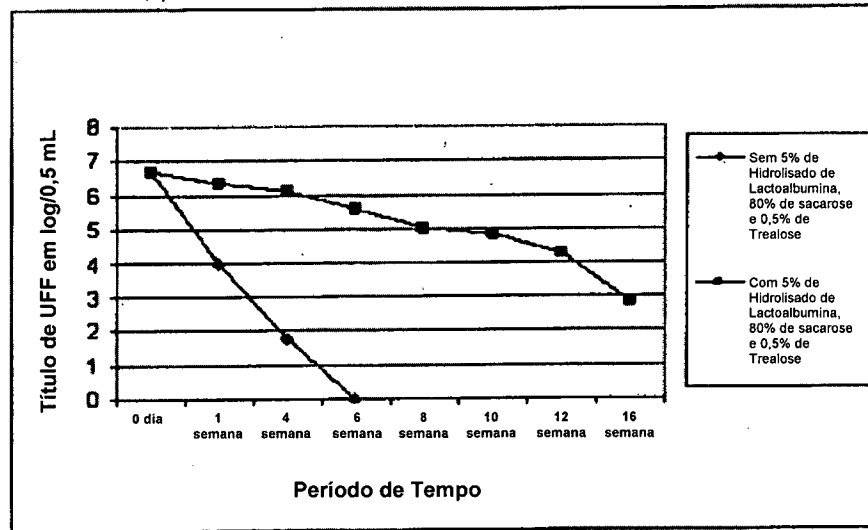


Fig. 4C

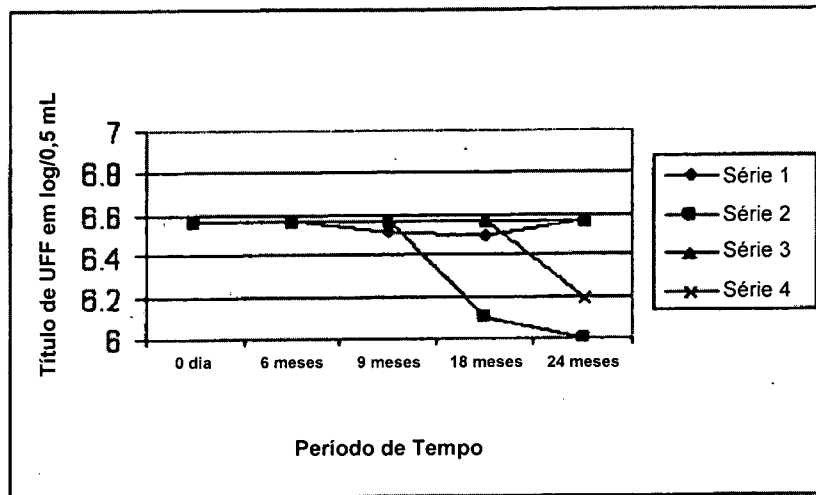


Fig. 5A

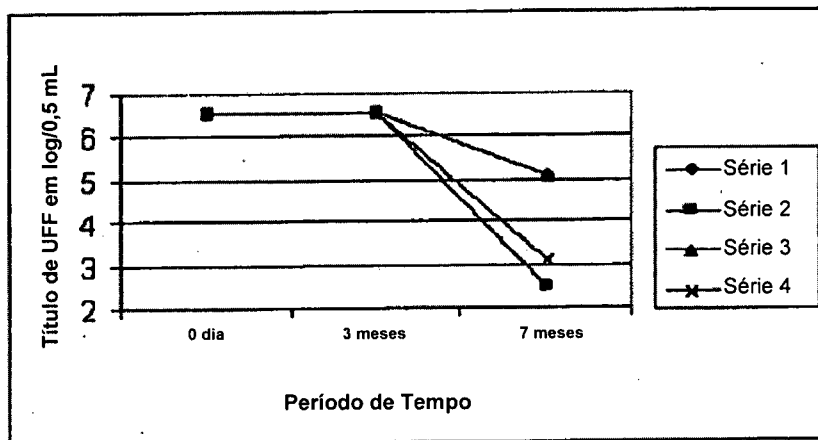


Fig. 5B

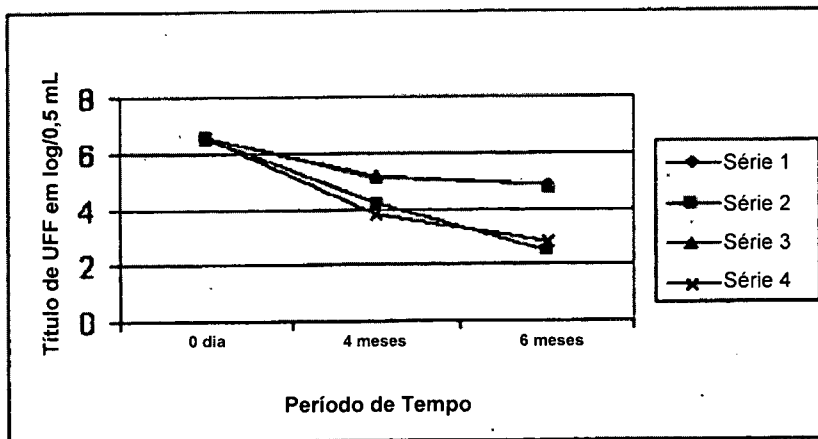


Fig. 5C

7/24

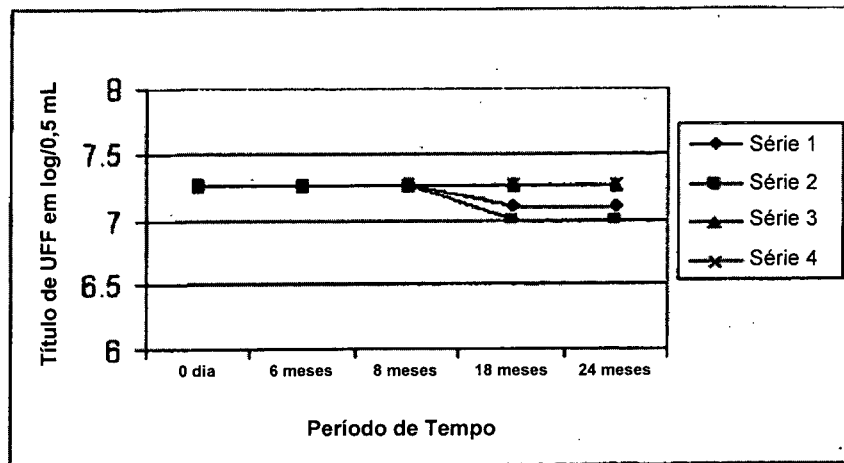


Fig. 6A

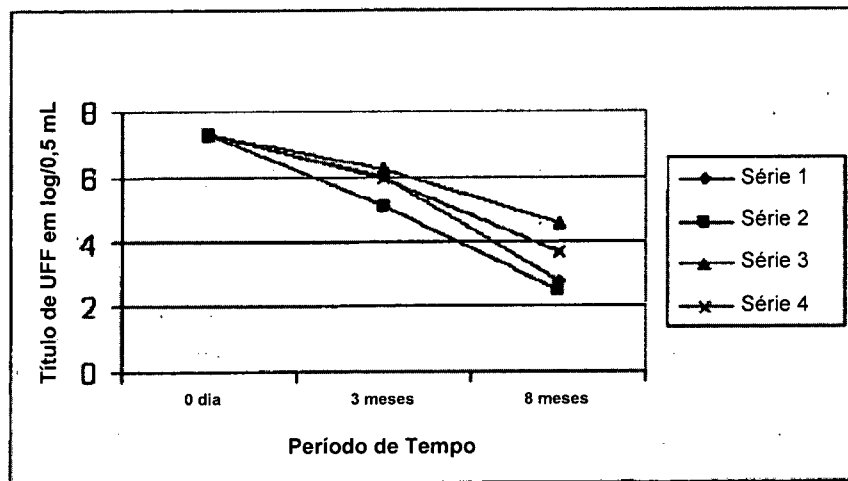


Fig. 6B

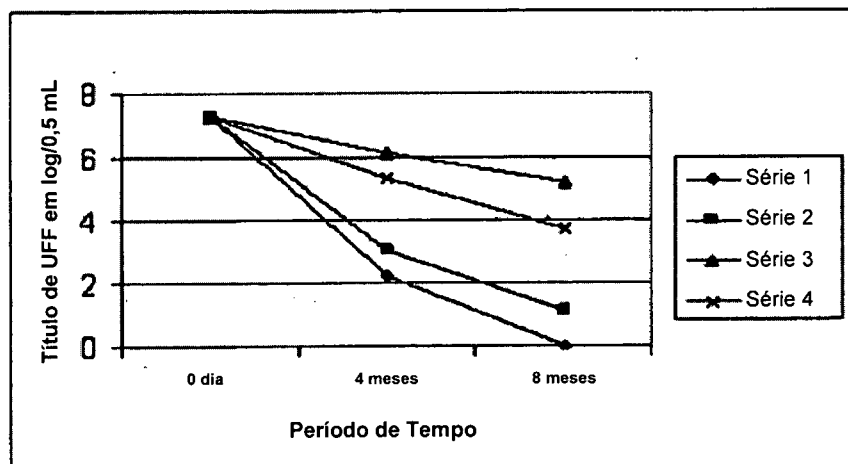


Fig. 6C

8/24

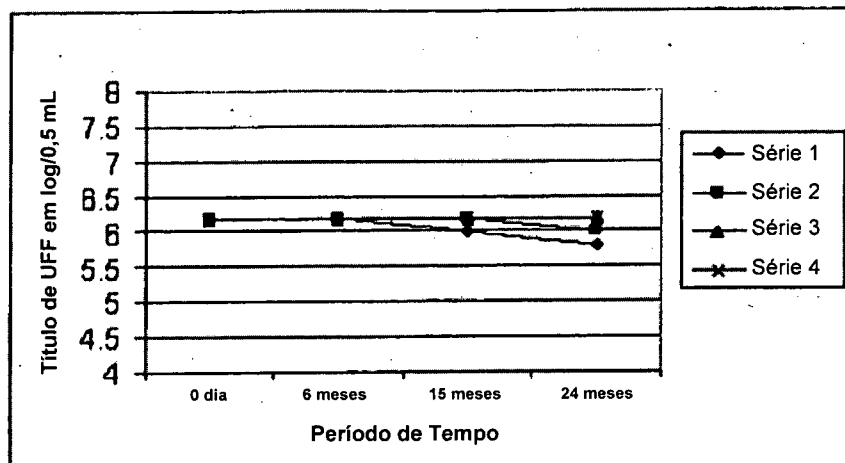


Fig. 7A

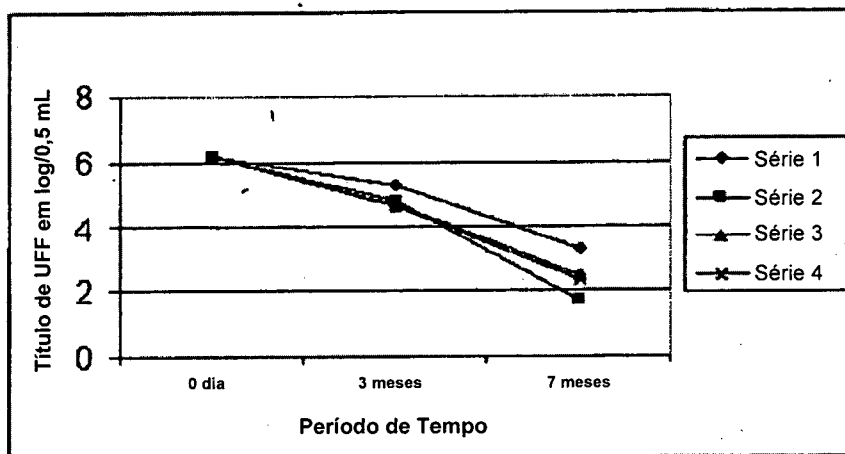


Fig. 7B

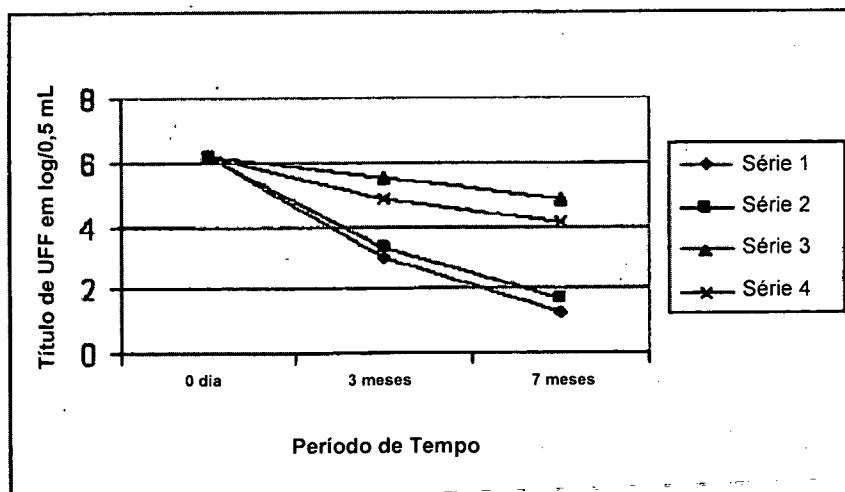


Fig. 7C

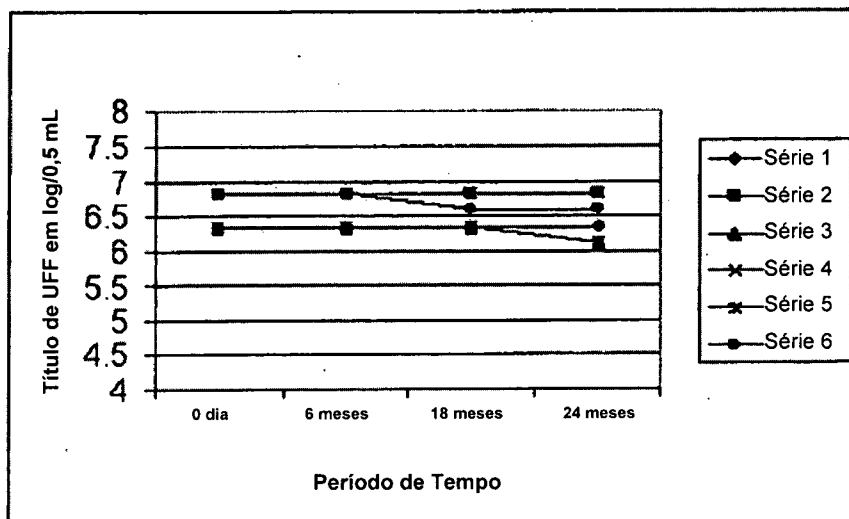


Fig. 8A

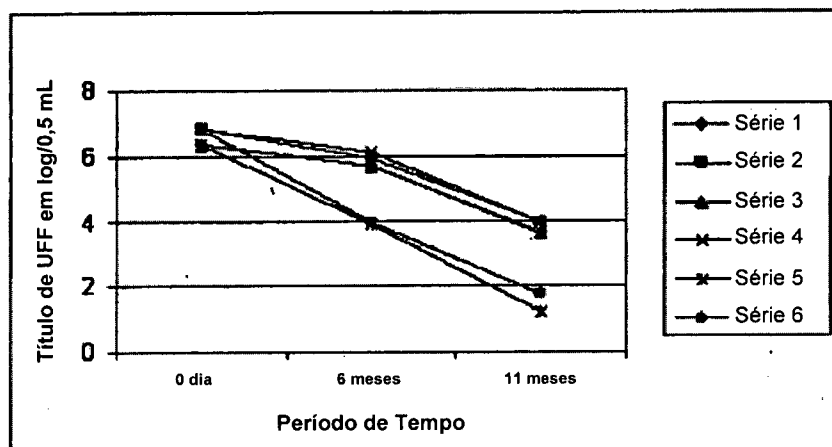


Fig. 8B

10/24

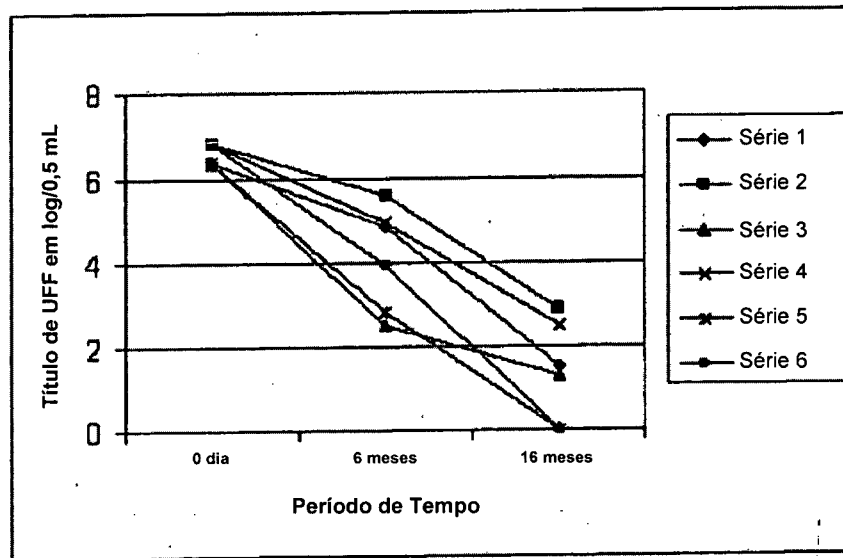


Fig. 8C

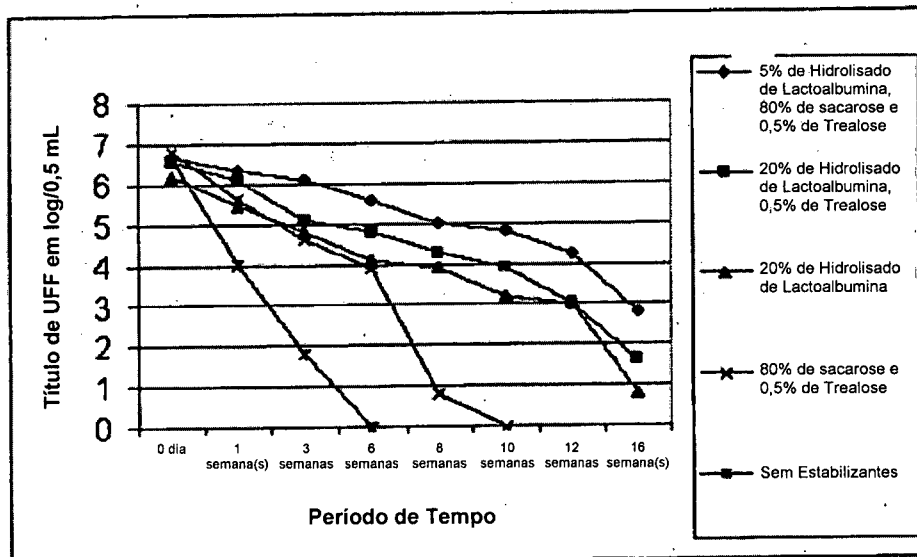


Fig. 9

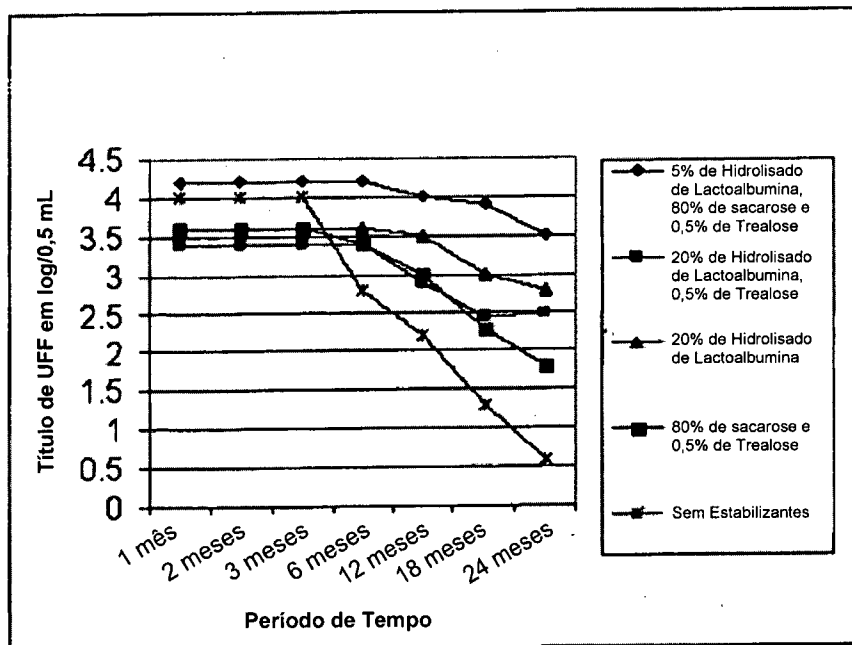


Fig. 10A

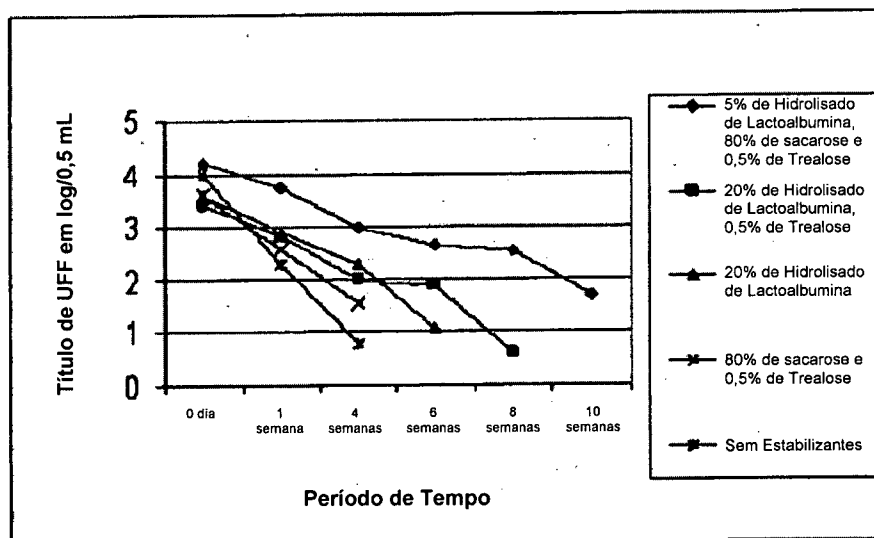


Fig. 10B

12/24

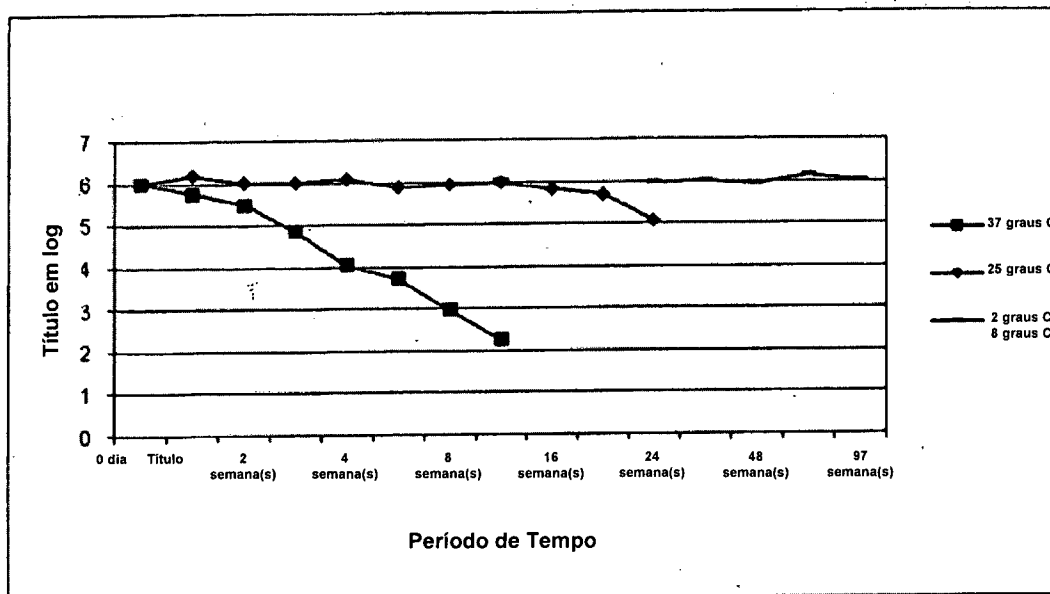


Fig. 11A

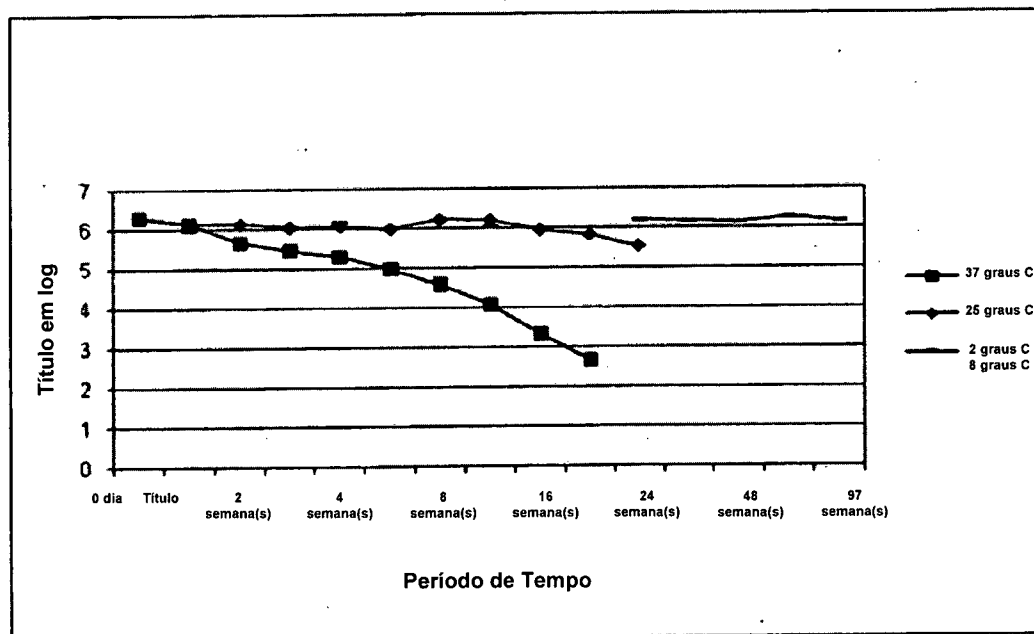


Fig. 11B

13/24

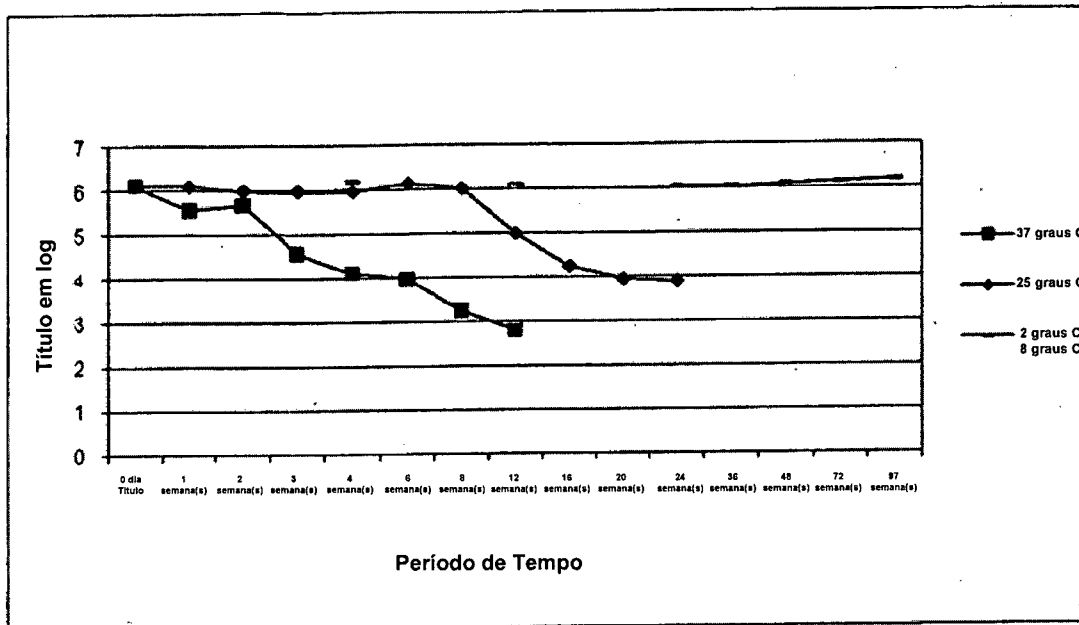


Fig. 11C

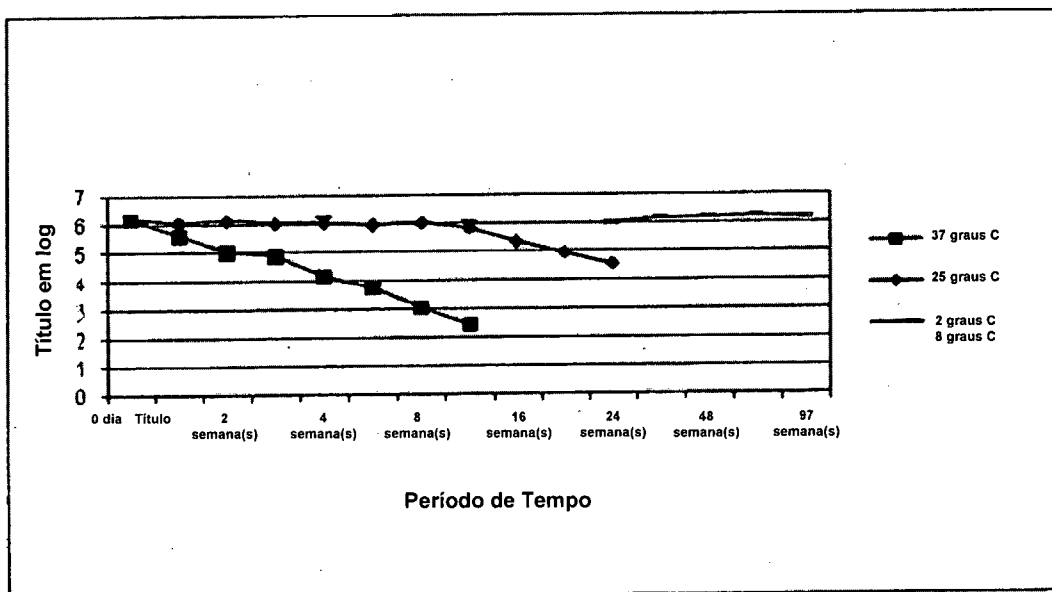


Fig. 11D

14/24

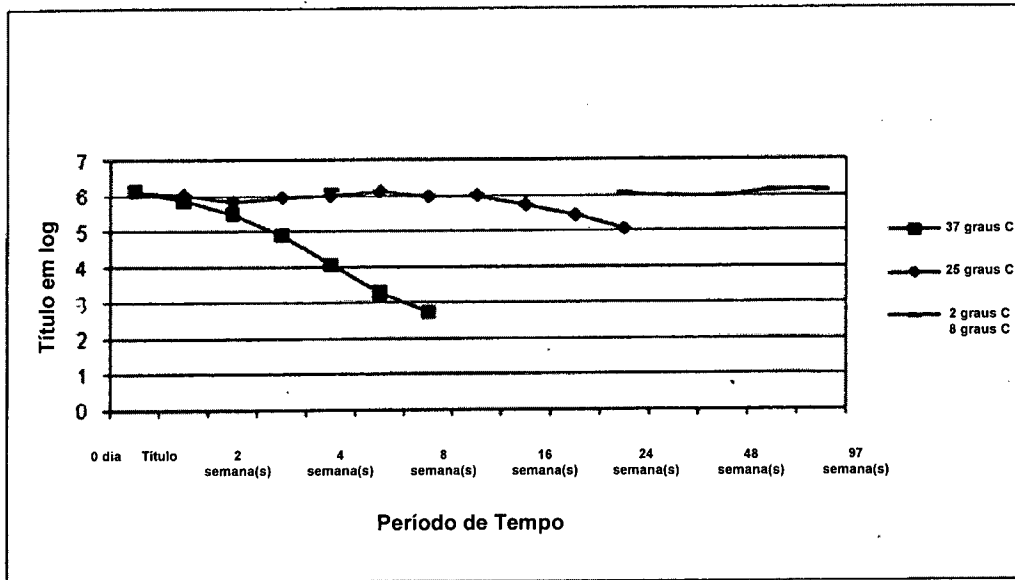


Fig. 11E

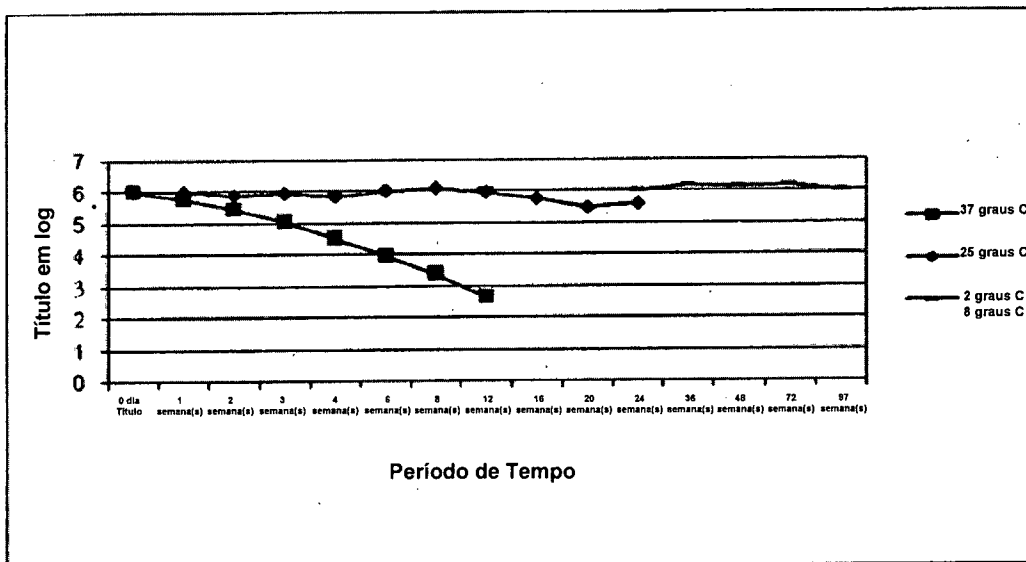


Fig. 11F

15/24

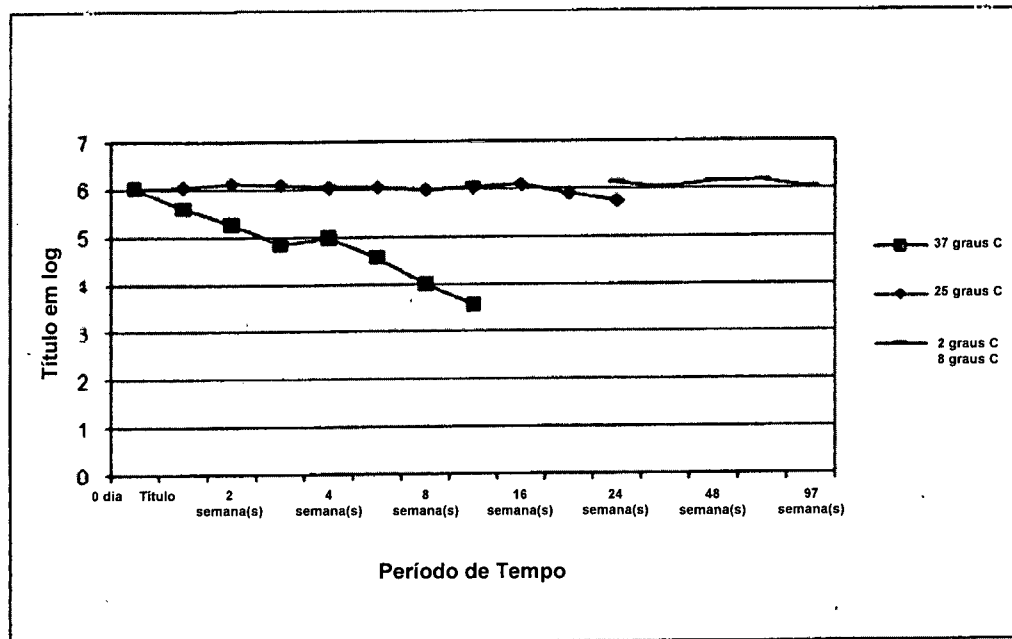


Fig. 11G

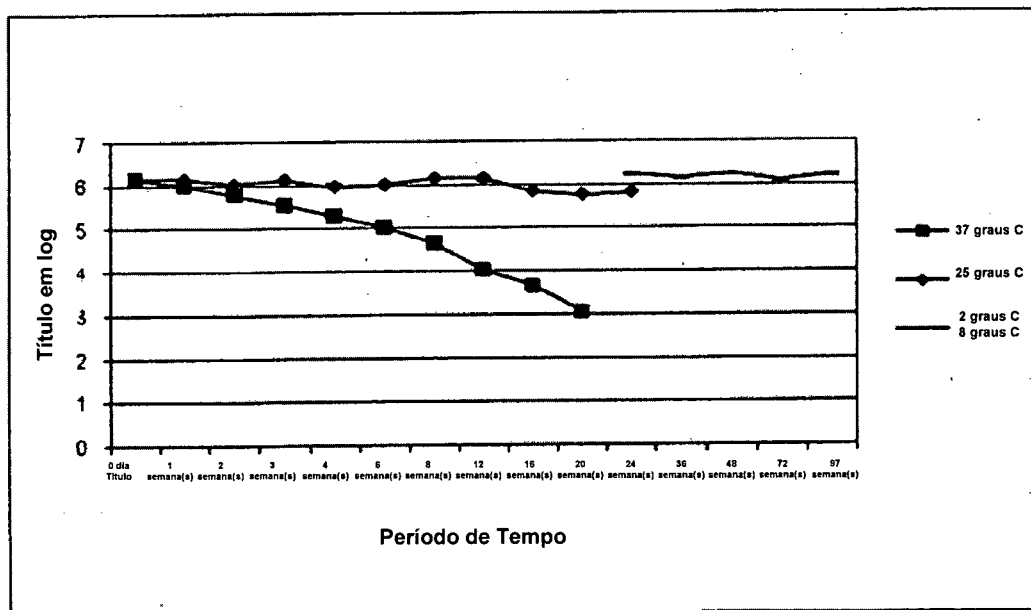


Fig. 11H

16/24

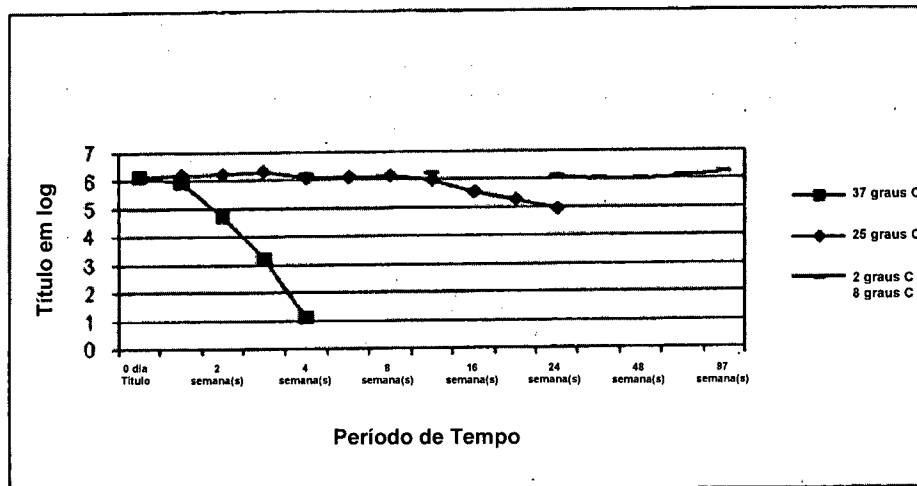


Fig. 12A

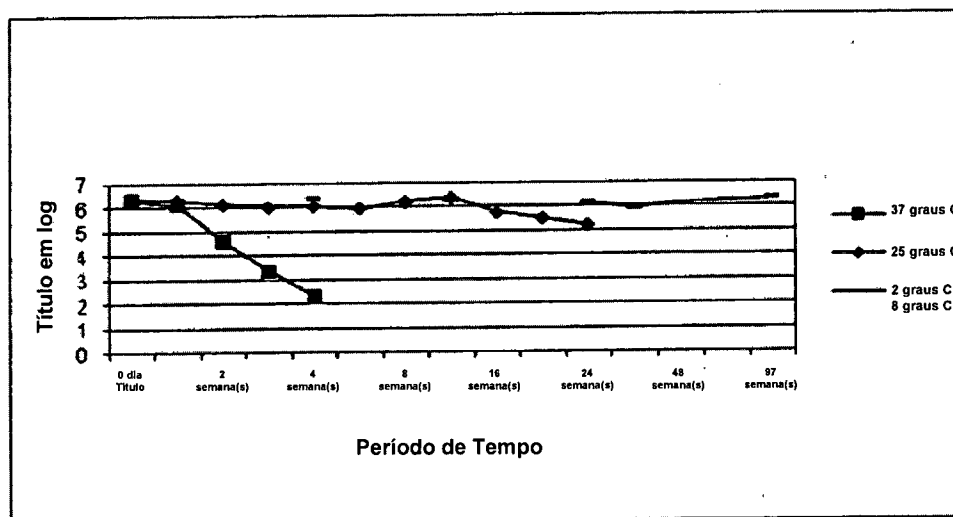


Fig. 12B

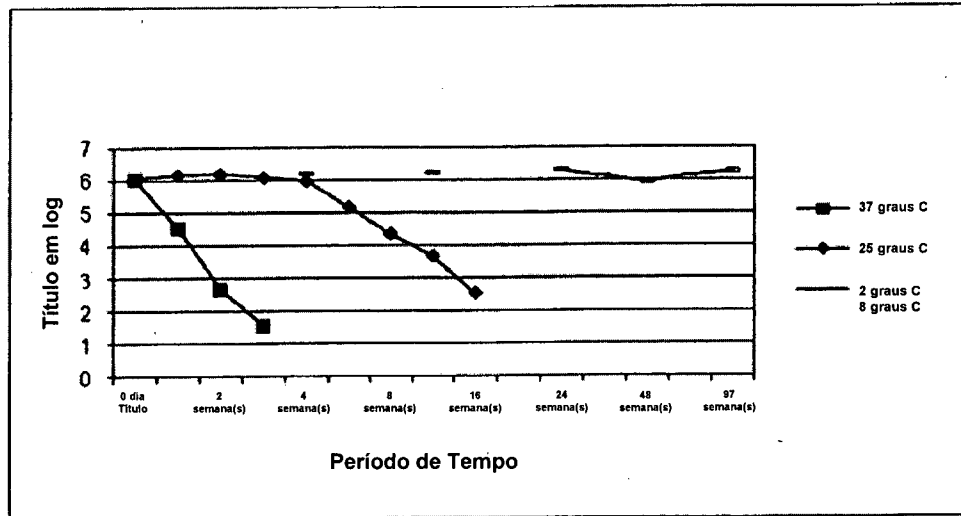


Fig. 12C

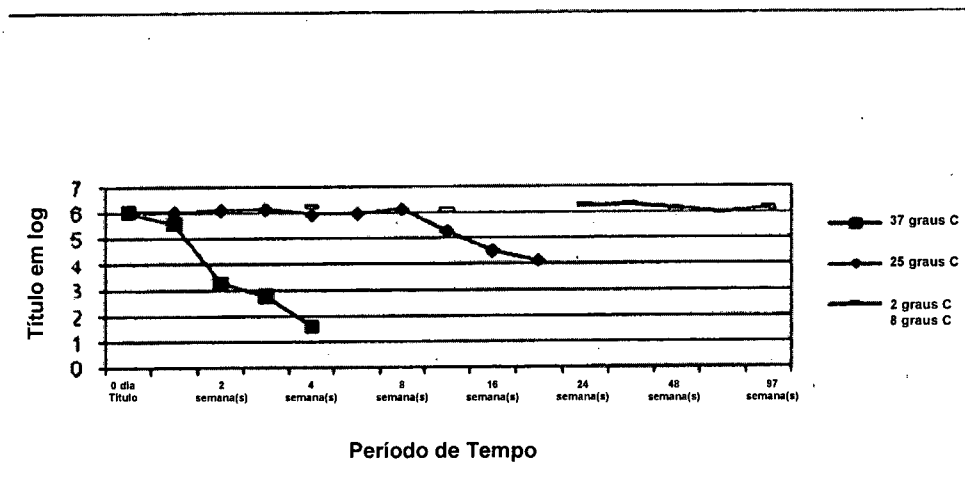


Fig. 12D

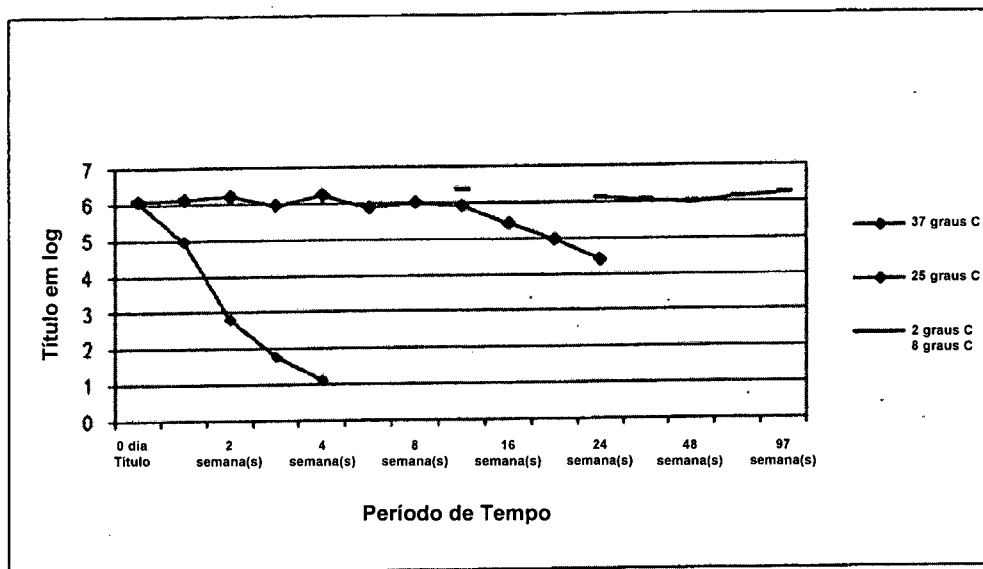


Fig. 12E

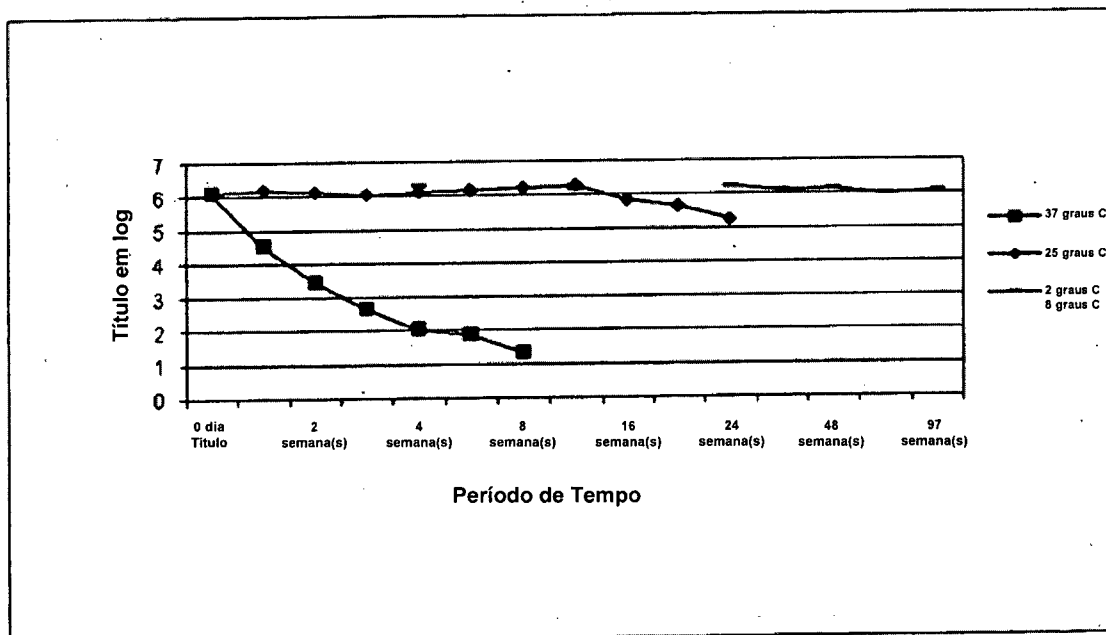


Fig. 12F

19/24

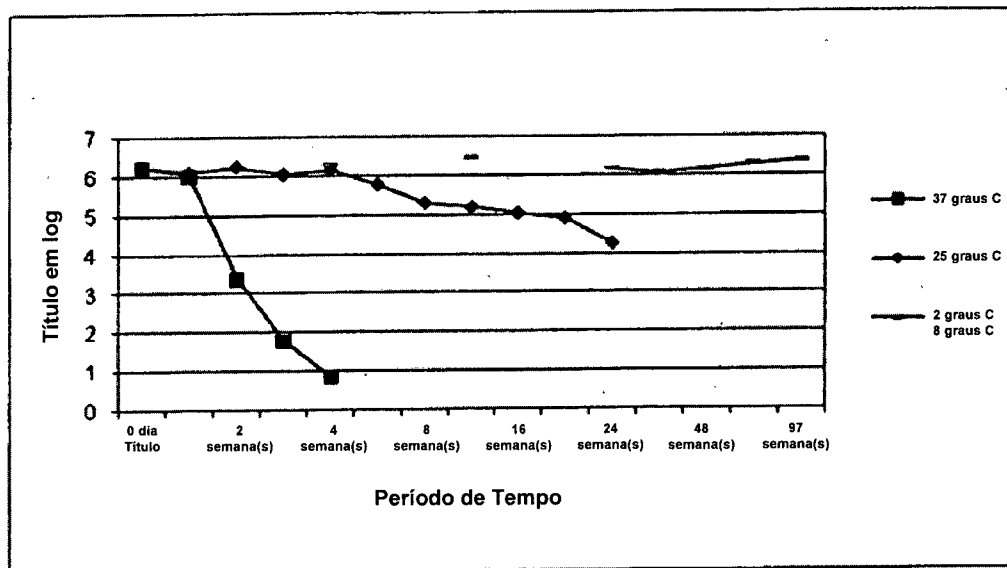


Fig. 12G

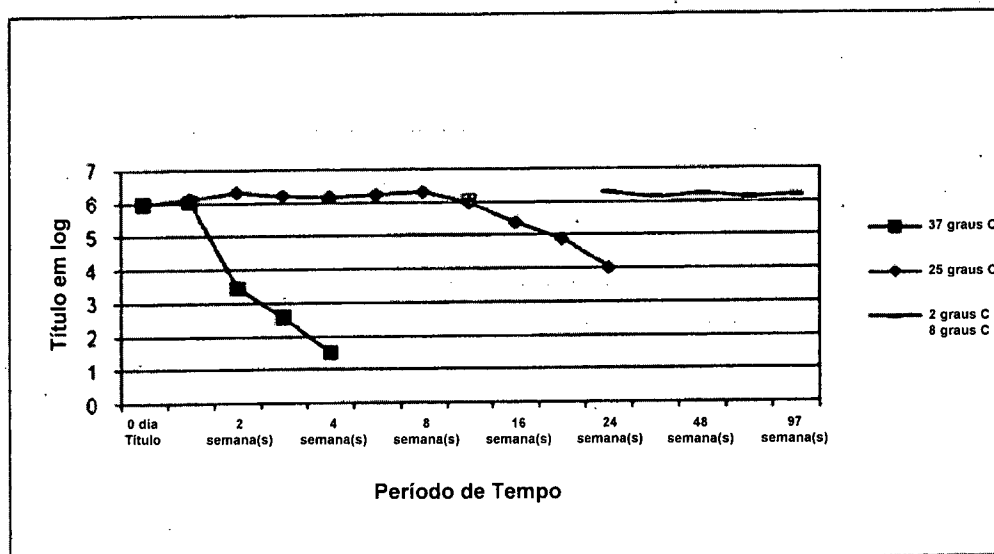


Fig. 12H

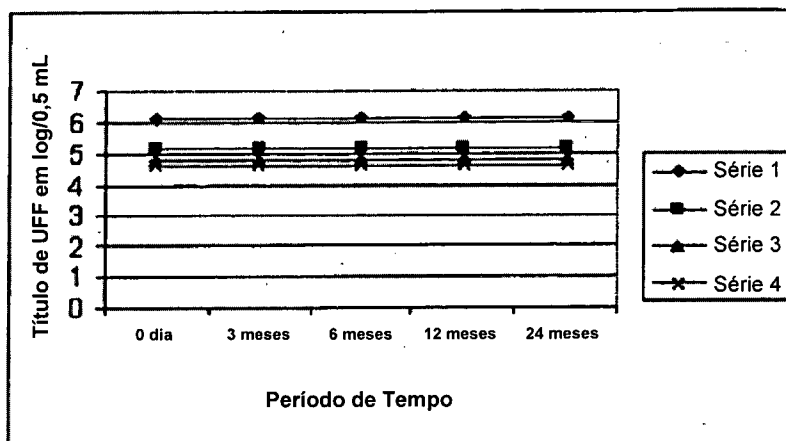


Fig. 13A

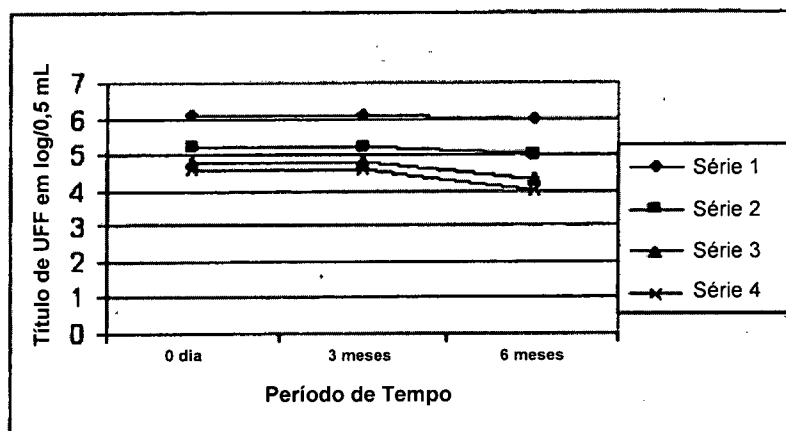


Fig. 13B

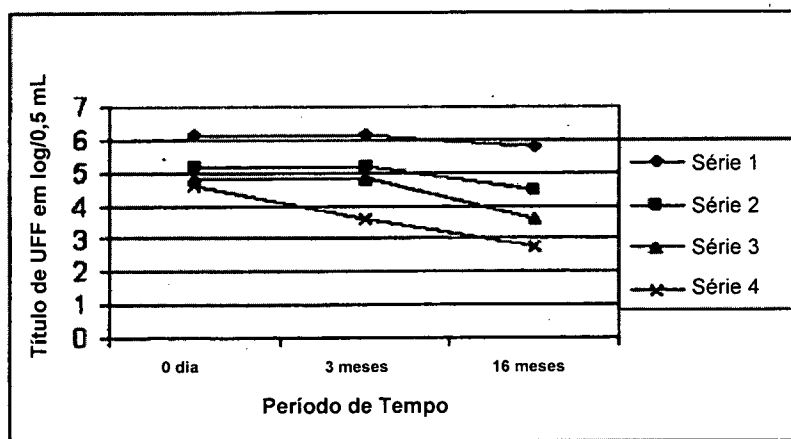


Fig. 13C

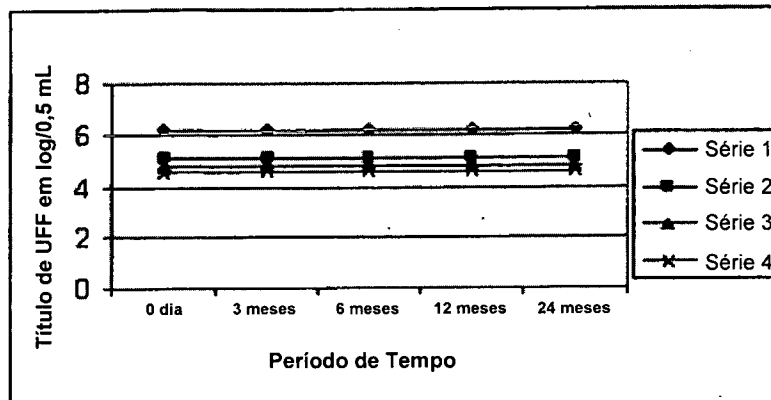


Fig. 14A

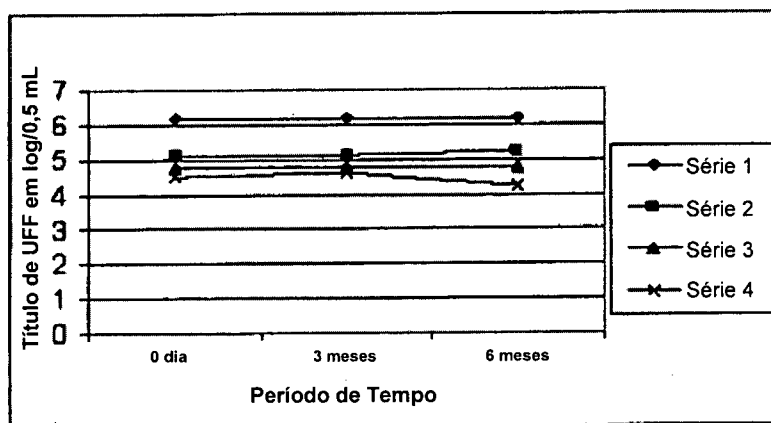


Fig. 14B

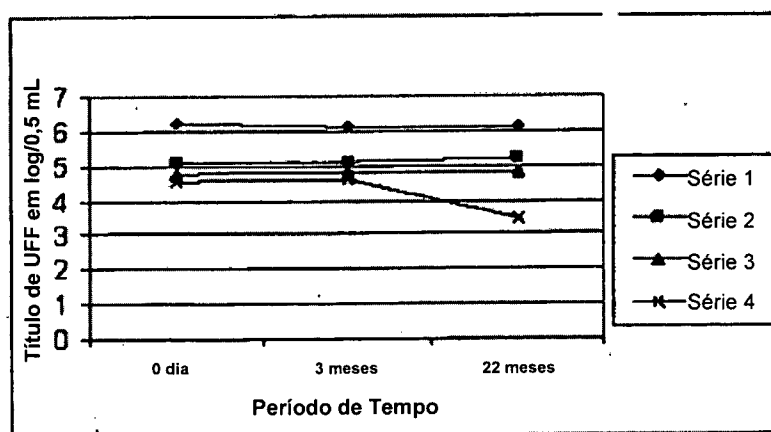


Fig. 14C

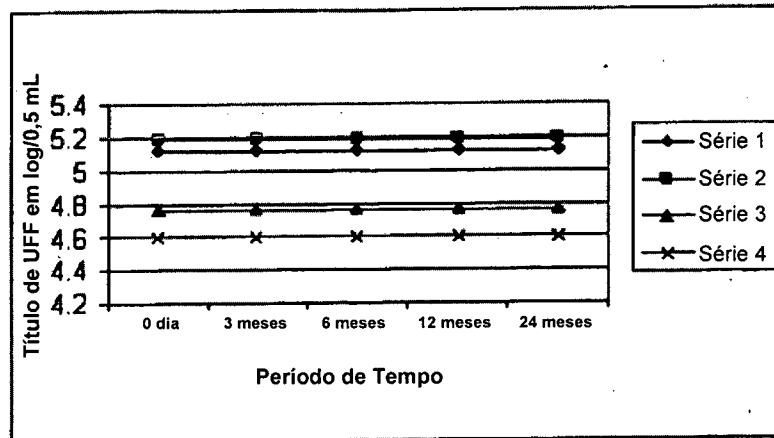


Fig. 15A

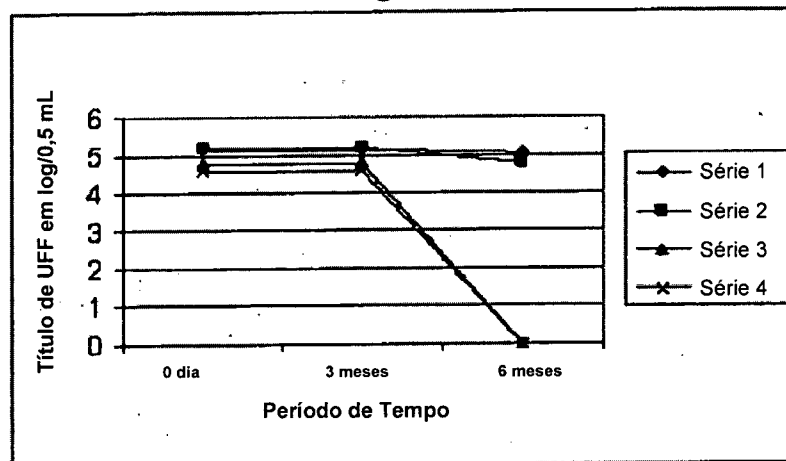


Fig. 15B

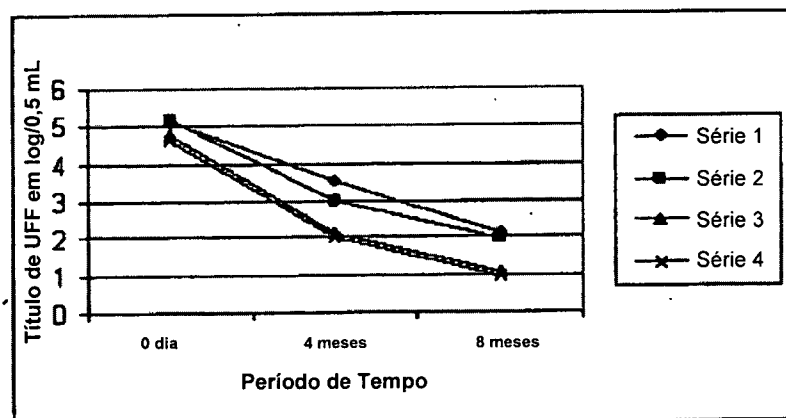


Fig. 15C

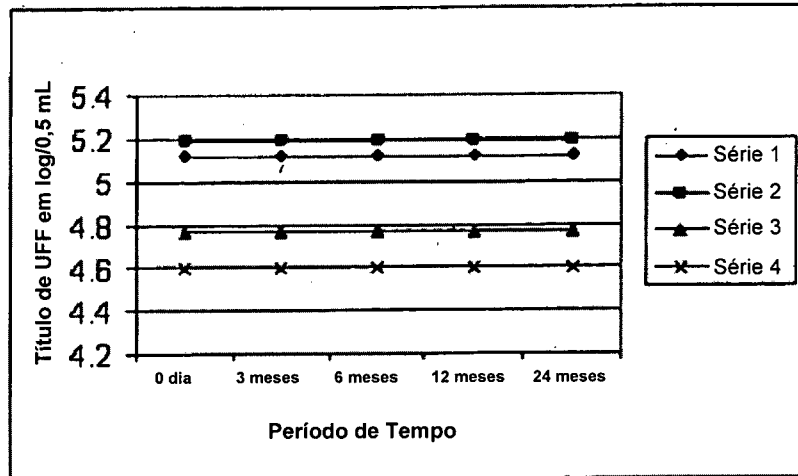


Fig. 16A

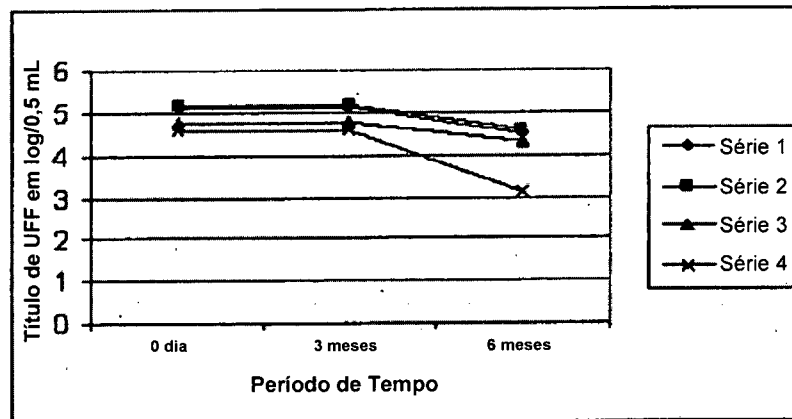


Fig. 16B

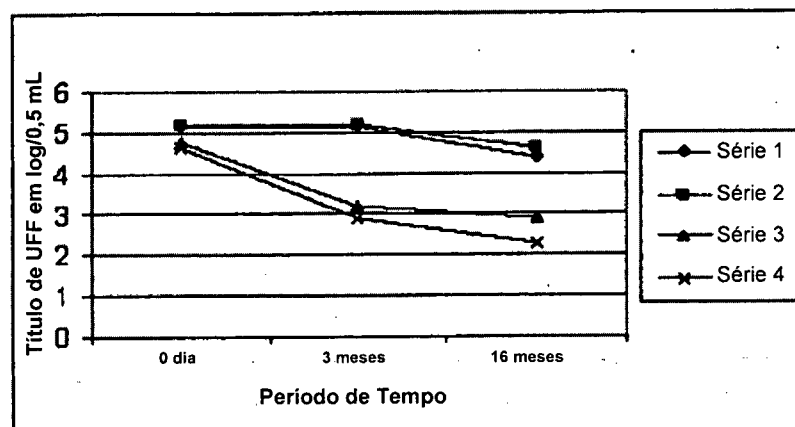


Fig. 16C

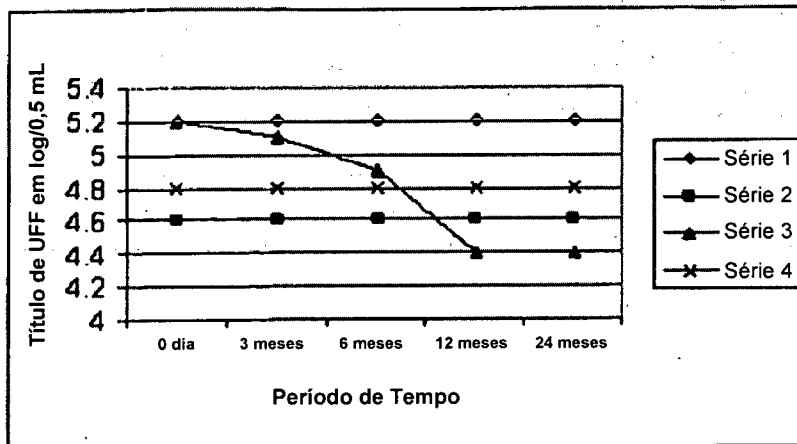


Fig. 17A

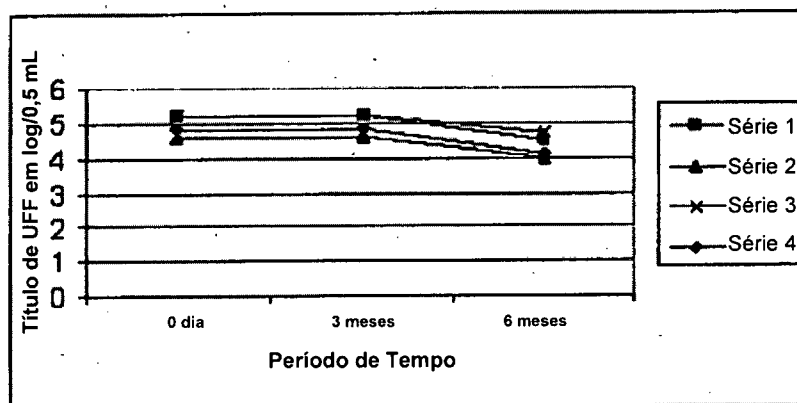


Fig. 17B

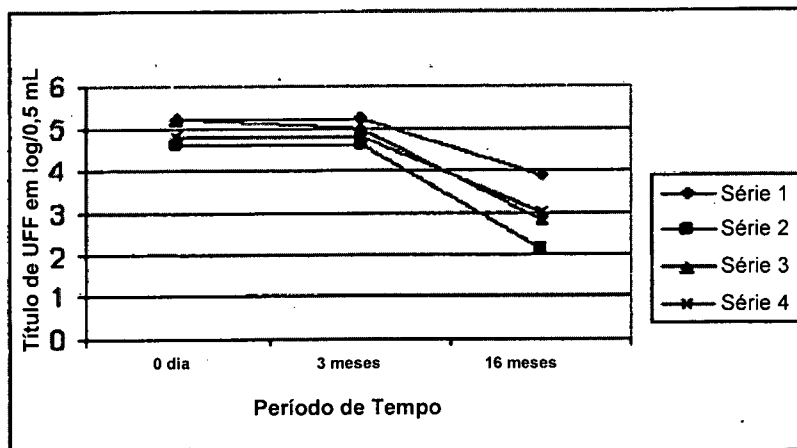


Fig. 17C

RESUMO

COMPOSIÇÃO, COMPOSIÇÃO LÍQUIDA, COMPOSIÇÃO
LIOFILIZADA E MÉTODO PARA PRODUZIR UM ROTAVÍRUS ATENUADO

São divulgados composições e métodos relacionados
5 aos vírus típicos e pré-condicionados atenuados ou vivos,
tais como rotavírus. Os rotavírus atenuados apresentam
características de melhor estabilidade e são úteis para a
prevenção de uma infecção por rotavírus e/ou gastroenterite
por rotavírus em crianças.