

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 637**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/15** (2006.01)

**A61P 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2006 E 10159949 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2233153**

54 Título: **Vacuna de rotavirus que induce protección cruzada heterotípica**

30 Prioridad:

**17.08.2005 GB 0516944**

**18.10.2005 GB 0521164**

**05.05.2006 GB 0608962**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**27.04.2015**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)  
RUE DE L'INSTITUT, 89  
1330 RIXENSART, BE**

72 Inventor/es:

**COLAU, BRIGITTE DESIREE ALBERTE y  
DE VOS, BEATRICE ARSENE VIRGINIE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 534 637 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Vacuna de rotavirus que induce protección cruzada heterotípica

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a formulaciones de vacunas de Rotavirus. La invención se refiere al uso de una población de Rotavirus atenuado de un tipo de Rotavirus en la prevención de una enfermedad asociada a infección por Rotavirus a partir de otro tipo de Rotavirus.

**Antecedentes de la técnica**

10 La diarrea aguda, infecciosa es una causa principal de la enfermedad y muerte en muchas áreas del mundo. En los países en vías de desarrollo, el impacto de la enfermedad diarreica es asombroso. Para Asia, África y Latinoamérica, se ha estimado que existen entre 3 - 4 mil millones de casos de diarrea cada año y de aquellos casos aproximadamente 5 - 10 millones dan como resultado la muerte (Walsh, J.A. y col.,: N. Engl. J. Med., 301:967-974 (1979)).

15 Los rotavirus se han reconocido como una de las causas más importantes de diarrea grave en niños pequeños y niños jóvenes (Estes, M.K. Rotaviruses and Their Replication in Fields Virology, tercera edición, editado por Fields y col., Raven Publishers, Philadelphia, 1996). Se estima que la enfermedad por Rotavirus es responsable de por encima de un millón de muertes anualmente. La enfermedad inducida por Rotavirus lo más comúnmente afecta a los niños entre 6 y 24 meses de edad, y la máxima prevalencia de la enfermedad se produce generalmente durante los meses más fríos en climas templados, y a lo largo del año en áreas tropicales. Los Rotavirus se transmiten típicamente de persona a persona mediante la vía fecal - oral con un período de incubación de aproximadamente 1 a 20 aproximadamente 3 días. A diferencia de la infección en el grupo de edad de 6 meses a 24 meses, los neonatos son generalmente asintomáticos o tienen solamente la enfermedad leve. En contraste a la grave enfermedad encontrada normalmente en niños jóvenes, la mayoría de los adultos están protegidos como resultado de la infección por Rotavirus previa, de manera que la mayoría de las infecciones de adultos son leves o asintomáticas (Offit, P.A. y col., Comp. Ther., 8 (8):21 - 26, 1982).

25 Los Rotavirus son generalmente esféricos, y su nombre se deriva de su estructura distintiva de la cápside externa e interna o de doble caparazón. Típicamente, la estructura de la cápside de doble caparazón de un Rotavirus encierra un caparazón de proteína interno o núcleo que contiene el genoma. El genoma de un Rotavirus se compone de 11 segmentos de ARN de doble cadena que codifican al menos 11 proteínas virales distintas. Dos de estas proteínas virales designadas como VP4 y VP7 están dispuestas sobre el exterior de la estructura de la cápside de doble 30 caparazón. La cápside interna del Rotavirus presenta una proteína, que es la proteína de Rotavirus designada VP6. La importancia relativa de estas tres proteínas particulares rotavirales en inducir la respuesta inmune que sigue a la infección por Rotavirus no está todavía clara. Sin embargo, la proteína VP6 determina el antígeno del grupo y subgrupo, y las proteínas VP4 y VP7 son las determinantes de la especificidad del serotipo (tipos determinados por el ensayo de neutralización) y genotipo (tipos determinados por un ensayo no serológico). Las designaciones de los 35 serotipos G y genotipos G son idénticas. Por el contrario, los números asignados para los serotipos y genotipos P son diferentes (Santos N. y Hoshino Y., 2005, Reviews in Medical Virology, 15, 29 - 56). Por lo tanto el serotipo P se designa como P seguido de un número asignado, y el genotipo P se designa por una P seguida de un número asignado entre paréntesis.

40 Hasta la fecha, se han identificado al menos 14 serotipos G de Rotavirus y 14 serotipos P de Rotavirus (Santos N. y Hoshino Y., 2005, Reviews in Medical Virology, 15, 29 - 56). Entre éstos, se han identificado 10 serotipos G (G1-6, G8-10 y G12) y 9 serotipos P (P1, P2A, P3, P4, P5A, P7, P8, P11 y P12) entre los Rotavirus humanos. Se han descrito veintitrés genotipos P diez de los cuales se han recuperado de humanos (P[3]-[6], P[8]-[11], P[14] y P[19]).

45 La proteína VP7 es una glicoproteína de 38.000 de peso molecular (34.000 de peso molecular cuando no está glicosilada) que es el producto traduccional del segmento genómico 7, 8 ó 9, dependiendo de la cepa. Esta proteína estimula la formación de anticuerpo neutralizante después de la infección por Rotavirus. La proteína VP4 es una proteína no glicosilada de aproximadamente 88.000 de peso molecular que es el producto traduccional del segmento genómico 4. Esta proteína también estimula el anticuerpo neutralizante después de la infección por Rotavirus.

50 Dado que las proteínas VP4 y VP7 son las proteínas virales contra las que se dirigen los anticuerpos neutralizantes, se cree que son los candidatos principales para el desarrollo de vacunas de Rotavirus, produciendo protección contra enfermedad por Rotavirus.

La infección natural por Rotavirus durante la infancia temprana se sabe que induce una inmunidad protectora.

Una vacuna de Rotavirus atenuado vivo es de este modo altamente deseable. De forma adecuada ésta debe ser una vacuna oral, ya que ésta es la vía natural de la infección del virus.

55 El desarrollo temprano de vacunas para prevenir infecciones por Rotavirus comenzó en los años 70 después del descubrimiento del virus. Inicialmente, cepas atenuadas de animales y seres humanos se estudiaron y había

resultados mixtos o decepcionantes. Los esfuerzos más recientes se han centrado en virus reagrupados de seres humanos - animales que han sido más exitosos.

Una cepa de Rotavirus conocida como 89-12 ha sido descrita por Ward; véase la patente de Estados Unidos N° 5.474.773 y Bernstein, D.L. y col., Vaccine, 16 (4), 381 - 387, 1998. La cepa 89-12 se aisló de una muestra de deposición recogida de un niño de 14 meses de edad con enfermedad por Rotavirus natural en 1988. De acuerdo con la patente de Estados Unidos n° 5.474.773 el Rotavirus HRV 89-12 humano se adaptó después en cultivo mediante 2 subcultivos en células primarias de riñón de mono verde africano (AGMK) y 4 subcultivos en células MA-104 como describe Ward en J. Clin. Microbiol., 19, 748 - 753, 1984. Después se purificó en placa 3 veces en células MA-104 (hasta el subcultivo 9) y se desarrollaron después de 2 subcultivos adicionales en estas células. Se realizó un subcultivo adicional (pase 12) para deposición con la ATCC con el número de acceso ATCC VR 2272. La cepa depositada se conoce como 89-12C2.

El artículo de 1998 en Vaccine, de Bernstein y col, se menciona más adelante como el artículo de Vaccine (1998). El artículo describe la seguridad e inmunogenicidad de un candidato de vacuna de Rotavirus humano vivo administrado por vía oral. Esta vacuna se obtuvo a partir de la cepa 89-12, atenuada mediante subcultivo sin purificación en placa 26 veces en células de AGMK primarias y después otras 7 veces en una línea celular de AGMK establecida (33 subcultivos en total).

De aquí en adelante en la presente memoria descriptiva, el material anteriormente mencionado que ha sido subcultivado en serie 26 veces se denominará P26 y el material que ha sido subcultivado en serie 33 veces se denominará P33. En general, el Rotavirus derivado mediante subcultivo de 89-12 n veces se denominará Pn.

En los ejemplos que siguen, el material P33 se subcultivó 5 veces más sobre células Vero. Esto se denomina P38.

Los aislamientos P26 y P33 descritos en el artículo Vaccine (1998) no se depositaron en una colección de cultivos, ni se analizaron para establecer su caracterización genética.

Ahora, se ha encontrado que la población P26 descrita en la bibliografía comprende una mezcla de variantes. Esto se ha establecido mediante caracterización genética como se describe en la presente memoria descriptiva más adelante (véanse los ejemplos). P26 no es por lo tanto una población consistente fidedigna para subcultivos posteriores, en particular para la producción de lotes de vacuna. De manera similar, P33 comprende una mezcla de variantes y no es de manera fidedigna consistente para la producción de lotes de vacunas.

Se ha encontrado que el material P26 es una mezcla de al menos tres variantes de genes de VP4. P33 y P38 son de manera similar una mezcla de dos variantes. Estas variantes parece que son antigénicamente diferentes, en términos de epítomos neutralizantes, a la cepa 89-12C2 depositada en la ATCC cuando se evaluaban los títulos del anticuerpo neutralizante de sueros de niños vacunados con P33 contra estas variantes.

Además se ha encontrado que cuando el material P33 se administra a niños, dos variantes identificadas se replicaron y se excretaron. De 100 niños vacunados, solamente 2 mostraron signos de gastroenteritis debido a la infección por Rotavirus, mientras que el 20 % de un grupo placebo se infectó. Estos hallazgos sugieren que las variantes identificadas están asociadas a la protección de la enfermedad por Rotavirus.

El documento WO 01/12797 divulga un procedimiento de separación de variantes de Rotavirus y una vacuna de Rotavirus atenuado vivo mejorada derivada de una cepa de Rotavirus humano clonado (homogéneo). También se divulga una población de Rotavirus atenuado (aislado), caracterizada por que comprende una única variante o sustancialmente una única variante, dicha variante definida por la secuencia de nucleótidos que codifica al menos una de las proteínas virales principales designadas como VP4 y VP7. La eficacia protectora de tal vacuna de Rotavirus humano atenuado oral contra la cepa heteróloga G9 se ha reseñado en niños de Latinoamérica (Perez y col., 42ª Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC 2002) 27 - 30 de septiembre de 2002, San Diego). El documento WO 05/021033 divulga un serotipo de Rotavirus se pueden usar para proteger contra la enfermedad provocada por otro serotipo. En particular el documento WO 05/021033 divulga el uso de una población de Rotavirus G1, [por ejemplo como se ha depositado en la Colección Europea de Cultivos de Células animales (ECACC), Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Reino Unido el 13 de agosto de 1999 con el número de depósito 99081301, bajo los términos del tratado de Budapest, también llamado P43 o RIX4414], para prevenir la enfermedad provocada tanto por el serotipo de Rotavirus G1 como por al menos uno de los serotipos de Rotavirus no- G1, tales como pero sin limitación los serotipos G2, G3, G4 y G9.

El contenido completo de los documentos WO 01/12797 y WO 05/021033 se incorpora en la presente memoria descriptiva por referencia.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1A (SEC ID N° 1) es la secuencia de nucleótidos del gen VP4 de P43 (RIX4414) que incluye la secuencia que codifica la proteína VP4 de P43.

La Figura 1B (SEC ID N° 2) tiene nucleótidos adicionales de ambos extremos del gen y una sustitución de nucleótidos (en negrita - una G en lugar de una C en la posición 18 dando como resultado TCG en lugar de TCA sin embargo sin impacto sobre la proteína codificada resultante) debido a la técnica de secuenciación. La secuencia no codificadora aparece en letra pequeña. La Figura 1B muestra la secuencia correcta para el depósito P43.

- 5 La Figura 2A (SEC ID N° 3) es la secuencia de nucleótidos del gen P43 (RIX4414) VP7 que incluye la secuencia codificadora de la proteína VP7 de P43.

La Figura 2B (SEC ID N° 4) tiene nucleótidos adicionales de ambos extremos del gen y una sustitución de nucleótidos (en negrita - una A en lugar de una C en la posición 58, dando como resultado un ATT que codifica leucina en lugar de CTT que codifica isoleucina) debido a la técnica de secuenciación. La secuencia no codificadora aparece en letra pequeña. La Figura 2B muestra la correcta secuencia del depósito P43.

10 La Figura 3 (SEC ID N° 5) es la secuencia de polipéptidos de VP4 de RIX4414.

La Figura 4 (SEC ID N° 6) es la secuencia de polipéptidos de VP7 de RIX4414.

La Figura 5 (SEC ID N° 7) muestra la secuencia de polipéptidos de la proteína NSP4 de RIX4414.

La Figura 6 (SEC ID N° 8) muestra la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína NSP4 de RIX4414. La

15 secuencia no codificadora aparece en letra pequeña.

La Figura 7 (SEC ID N° 9) muestra la secuencia de polipéptidos de la proteína VP6 de RIX4414.

La Figura 8 (SEC ID N° 10) muestra la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína VP6 de RIX4414. La secuencia no codificadora aparece en letra pequeña.

#### **Descripción detallada de la invención**

20 En la presente divulgación, los inventores han determinado que una población de Rotavirus atenuado, por ejemplo una tal como la caracterizada en el documento WO 01/12797, se puede usar como una vacuna para proporcionar protección cruzada contra la enfermedad provocada por infección por Rotavirus de un tipo diferente (serotipo y/o genotipo) que el usado en la vacuna. La proteína VP7 especifica el tipo G (serotipo) y la proteína VP4 especifica el tipo P de cepa (serotipo o genotipo).

25 En particular, la presente divulgación se refiere al uso de una población de Rotavirus atenuado de un tipo P en la prevención de la enfermedad asociada a la infección por Rotavirus de un tipo P diferente, y específicamente al uso de una población de Rotavirus atenuado o cepa de un tipo GxPy en la inducción de una respuesta inmune y/o en la prevención de la enfermedad asociada a la infección por Rotavirus provocada por una cepa de Rotavirus que no es ni un tipo Gx ni Py.

30 La inmunidad se puede medir neutralizando las respuestas de anticuerpo a la vacuna o mediante la respuesta de anticuerpo IgA de Rotavirus en suero, tal como factor de seroconversión (es decir, incremento de  $\geq 3$  veces en los niveles de anticuerpo IgA en suero después de la vacunación, como se describe en Ward y col., 1990, J. Infect. Disease, 161, 440 - 445).

35 En el contexto de la presente divulgación, y consistente con el entendimiento común en la técnica (Santos N. y Hoshino Y., 2005, Reviews in Medical Virology, 15, 29 - 56), Gx se refiere a un tipo G específico, es decir, genotipo G o serotipo G (siendo ambas terminologías idénticas), mientras que la terminología Py se referirá genéricamente a un tipo P específico, o bien el serotipo P (por ejemplo, P8, P4) o el genotipo P (por ejemplo, P[4], P[8]). Cuando se refiere a un genotipo P específico, se usará la P seguida de un número asignado entre paréntesis; por lo demás el tipo P significará o bien serotipo o genotipo.

40 En un aspecto de la invención, se proporciona el uso de una cepa de rotavirus atenuado del tipo G1 P[8] en la fabricación de una composición para conferir protección contra la infección por rotavirus causada por una cepa de rotavirus del tipo G2 P[4].

45 A lo largo de la presente memoria descriptiva, la redacción tal como el uso de una composición de vacuna de acuerdo con la invención en la fabricación de una composición de vacuna para la prevención de enfermedades por Rotavirus, o tal como procedimientos de terapia que comprenden el uso de dicha composición de vacuna se usarán indistintamente.

50 Los inventores han determinado ahora que una población de Rotavirus GxP[8] [por ejemplo G1P[8] como se ha depositado en la Colección Europea de Cultivos de Células de Animales (ECACC), Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Reino Unido el 13 de agosto de 1999 bajo el número de deposición 99081301, bajo los términos del Tratado de Budapest], se puede usar para prevenir la enfermedad provocada tanto por G1P[8] como al menos por una cepa de Rotavirus que ni es un tipo G1 ni P8. Los inventores han determinado que una población de Rotavirus G1P[8] se puede usar para prevenir la enfermedad provocada tanto por un genotipo G1P[8]

como al menos por uno no- G1P[8], tal como genotipo de Rotavirus G2P[4].

De acuerdo con lo anterior, la presente divulgación se refiere al uso de una población de Rotavirus atenuado a partir de un tipo de Rotavirus en la prevención de enfermedad asociada a la infección por Rotavirus a partir de otro tipo de Rotavirus, en la que el tipo se define de manera adecuada por referencia a la secuencia de la proteína VP4 de Rotavirus (tipo P).

La divulgación también se refiere al uso de una población de Rotavirus atenuado de una cepa de Rotavirus (definida mediante un tipo tanto G como P específico) en la prevención de una enfermedad asociada a la infección por Rotavirus a partir de otra cepa de Rotavirus, en la que la cepa se define de manera adecuada por referencia a la secuencia de tanto la proteína VP4 de Rotavirus (tipo P) como la proteína VP7 (tipo G).

En todos los aspectos de la invención reivindicada, dicha respuesta inmune es una respuesta inmune protectora. De manera adecuada la población de Rotavirus comprende las proteínas virales VP4 y/o VP7 de ECACC depósito 99081301 adecuadas para proporcionar un efecto protector cruzado.

En el presente documento, se hará referencia a protección cruzada por ser la protección producida por un tipo de Rotavirus contra la infección provocada por un Rotavirus de un tipo diferente. La protección cruzada puede ser homotípica o heterotípica. La protección cruzada homotípica es una protección producida por una cepa de Rotavirus contra una cepa o bien de tipo G o P, tal como por ejemplo una cepa G1P[8] que produce protección cruzada contra una cepa no- G1, P[8] (por ejemplo, G2P[8]) mediante el tipo P[8]. Otro ejemplo de una protección cruzada homotípica es la producida por una cepa G1P[8] contra una cepa G1 no-P[8] (por ejemplo, G1P[4]) mediante el tipo G1. La protección cruzada heterotípica es una protección producida por una cepa de Rotavirus contra una cepa de Rotavirus de tipos P y G diferentes tales como por ejemplo la protección producida por un G1P[8] contra una cepa no G1- no P[8]- (por ejemplo, G2P[4]) (protección heterotípica producida mediante tanto el tipo G como P).

En particular una población de Rotavirus atenuado G1, del tipo G1 P[8] [por ejemplo, como la depositada en la Colección Europea de Cultivos de Células de Animales (ECACC), Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Reino Unido el 13 de agosto de 1999 bajo el número de deposición 99081301, bajo los términos del tratado de Budapest], se puede usar para prevenir la enfermedad provocada por G1 P[8] y al menos un serotipo rotavirus no G1 seleccionado del grupo que consiste en G3, G4 y G9.

La composición de vacuna para uso de acuerdo con la invención comprende una cepa de Rotavirus G1P[8] y es capaz de inducir una respuesta inmune a una cepa de Rotavirus G2P[4].

En un aspecto particular, la divulgación se refiere a un procedimiento de inducción de una respuesta inmune contra la cepa de Rotavirus, comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto de una composición que comprende una cepa de Rotavirus atenuado de un tipo GxPy, generando dicha composición una respuesta inmune contra una cepa de Rotavirus que ni es del tipo Gx ni Py.

La población de Rotavirus dentro de la composición de vacuna es de especificidad de cepa G1P1A (es decir, G1P[8] de acuerdo con la nomenclatura actual). De manera adecuada la población de Rotavirus comprende las proteínas virales VP4 y/o VP7 de ECACC depósito 99081301 adecuadas para inducir una respuesta inmune y, típicamente, proporcionan un efecto protector cruzado. La invención se refiere a cepas de Rotavirus G1P[8] en procedimientos o usos como se ha descrito anteriormente. En una realización, la vacuna de Rotavirus usada es la ECACC depósito 99081301 o deriva de ese depósito.

En un aspecto específico la vacuna induce una respuesta inmune protectora cruzada o protección cruzada contra gastroenteritis en un individuo vacunado comparado con el individuo no vacunado (del grupo placebo). De manera adecuada, la vacuna proporciona protección cruzada contra síntomas de infección por Rotavirus tales como diarrea o gastroenteritis. Por ejemplo la gastroenteritis se puede definir como diarrea caracterizada por tres o más, deposiciones acuosas o más sueltas de lo normal en un día o vómitos violentos junto con la detección de Rotavirus en la muestra de deposición examinada.

Como entenderán los expertos en la técnica, la gravedad de la enfermedad y eficacia de la vacunación para inducir una respuesta inmune protectora en un individuo vacunado o una población vacunada se puede determinar mediante varios medios. Por respuesta inmune protectora se quiere indicar una respuesta inmune que conduce a una reducción de la gravedad de los síntomas clínicos asociados a la infección con Rotavirus o que conduce a la susceptibilidad reducida a infección por Rotavirus. La gravedad de la enfermedad en un individuo no vacunado o vacunado se puede clasificar de acuerdo con sistemas de puntuación publicados tales como la escala Vesikari de 20 puntos o una versión ligeramente modificada de dicho procedimiento (Ruuska T y col., Scand. J. Infect. Dis. 1990, 22, 259 - 267), o de acuerdo con cualquier otro sistema adecuado que presenta y clasifica los síntomas específicos de la infección por Rotavirus (tal como el procedimiento reseñado en Clark HF, Borian EF, Bell LM. Protective effect of WC3 vaccine against Rotavirus diarrhea in infants during a predominantly serotype 1 Rotavirus season. J Infect Dis. 1988: 570 - 86). De acuerdo con el procedimiento de Vesikari, RVGE grave se define normalmente como una puntuación  $\geq 11$ .

La protección se puede evaluar al nivel de una población o un grupo mediante la eficacia de la vacuna (VE). La eficacia de la vacuna se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$VE (\%) = 1 - RR = 1 - (ARV/ARU),$$

con

5 RR = riesgo relativo = ARV/ARU

ARU = velocidad de ataque de enfermedad en población no vacunada (estimada a partir del grupo placebo) = número de sujetos que presentan al menos un episodio de RV GE / número total de sujetos en el grupo control.

ARV = velocidad de ataque de la enfermedad en el grupo vacunado = número de sujetos que presentan al menos un episodio de RV GE / número total de sujetos en el grupo de vacuna de HRV.

10 En un aspecto, la divulgación describe un uso como se ha detallado anteriormente en el que la composición que comprende una cepa de Rotavirus atenuado de un tipo GxPy induce una respuesta inmune protectora cruzada y/o protección contra gastroenteritis inducida por Rotavirus, de manera adecuada contra la gastroenteritis grave inducida por Rotavirus, provocada por infección de una cepa de Rotavirus que ni es un tipo Gx ni Py. En un aspecto específico, dicha respuesta inmune protectora es capaz de reducir la gravedad de la enfermedad o eliminar la enfermedad inducida por Rotavirus según se mide de acuerdo con cualquier sistema de puntuación adecuado.

15 En todavía otro aspecto, se describe un uso de la composición de acuerdo con la invención, para reducir la gravedad de la enfermedad, por ejemplo, gastroenteritis, o para eliminar la enfermedad inducida por Rotavirus, registrando dicha gravedad de enfermedad o enfermedad de acuerdo con cualquier sistema de puntuación adecuado como se ha enseñado anteriormente.

20 En un aspecto específico, dicha composición es hasta 60 % protectora, adecuadamente hasta 81 % protectora, en una población de individuos vacunados, contra diarrea provocada por infección de un Rotavirus de un tipo diferente al del Rotavirus atenuado presente en la composición. En una realización específica, dicha composición es al menos 40 % protectora, adecuadamente al menos 50 % protectora, , en una población de individuos vacunados, contra la diarrea provocada por una cepa de Rotavirus que es de tipo G2 P[4] En una realización adicional, dicha composición es entre 40 % y 80 % protectora, adecuadamente entre 50 % y 70 % protectora contra la diarrea provocada por una cepa de Rotavirus que es G2 P[4]. En un aspecto específico de la divulgación, dicha composición comprende una cepa de Rotavirus G1P[8] que produce el nivel de protección como se ha mencionado anteriormente contra la gastroenteritis provocada por la infección de cepas de Rotavirus de tipo G2P[4].

30 Adecuadamente, la tasa de protección contra la diarrea y/o gastroenteritis y/o gastroenteritis grave lograda en una población de individuos vacunados infectados por una cepa de Rotavirus que ni es un tipo Gx ni Py, es entre 10 y 90 %, de manera adecuada entre 20 y 80 %, de manera adecuada entre 40 % y 80 %, de manera adecuada entre 45 % y 75 % protectora. Típicamente el nivel de protección contra la gastroenteritis grave es al menos 40 %, adecuadamente al menos 50 %.

35 En una realización específica, dicha composición comprende una cepa de Rotavirus G1P[8] que es entre 40 % y 75 % protectora, en una población de individuos vacunados contra gastroenteritis grave, como se mide de acuerdo con la puntuación de Vesikari, provocada por la infección de Rotavirus de un serotipo G2P[4].

De manera adecuada la vacuna se usa en un régimen de 2 dosis o de 3 dosis. En una realización, la composición para su uso según la invención se administra en un régimen de de 2 dosis.

La vacuna de Rotavirus usada para proporcionar protección cruzada tiene las siguientes características adecuadas.

40 En una realización, el Rotavirus G1 P[8] de la composición para uso de acuerdo con la invención tiene un gen VP4 que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende al menos uno de los siguientes: una base adenina (A) en la posición 788, una base adenina (A) en la posición 802 y una base timina (T) en la posición 501 a partir del codón de iniciación.

45 En una realización adicional el Rotavirus G1 P[8] de la composición para uso de acuerdo con la invención tiene un gen VP7 que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende al menos uno de los siguientes: una timina (T) en la posición 605, una adenina (A) en la posición 897, o una guanina (G) en la posición 897 a partir del codón de iniciación. De manera adecuada en la posición 897 existe una adenina (A).

50 En una realización específica, el Rotavirus G1 P[8] de la composición para uso de acuerdo con la invención tiene una adenina (A) en las posiciones 788 y 802 y una timina (T) en la posición 501 a partir del codón de iniciación en la secuencia del gen VP4.

En una realización particular, el Rotavirus G1 P[8] de la composición para uso de acuerdo con la invención tiene una adenina (A) en las posiciones 788 y 802 y una timina (T) en la posición 501 a partir del codón de iniciación en la secuencia del gen VP4.

En una realización particular, el rotavirus G1 P[8] de la composición para uso de acuerdo con la invención tiene una adenina (A) en las posiciones 788 y 802 y una timina (T) en la posición 501 a partir del codón de iniciación en la secuencia del gen VP4 y una timina (T) en la posición 605 y una adenina/guanina (A/G) en la posición 897 a partir del codón de iniciación en la secuencia VP7.

- 5 En otro aspecto de la divulgación, el Rotavirus de la composición para uso de acuerdo con la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína VP4 en la que la secuencia de nucleótidos es como se muestra en la figura 1A (SEC ID N° 1) o la Figura 1B (SEC ID N° 2), y/o una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína VP7 en la que la secuencia de nucleótidos es como se muestra en la Figura 2A (SEC ID N° 3) o la Figura 2B (SEC ID N° 4). En un aspecto adicional, el Rotavirus de la composición para uso de acuerdo con la invención
- 10 comprende una proteína VP4 como se establece en la Figura 3 (SEC ID N° 5), y/o una proteína VP7 como se expone en la Figura 4 (SEC ID N° 6). En un aspecto adicional, dicha población de Rotavirus para uso de acuerdo con la invención adicionalmente comprende una proteína NSP4 como se expone en la Figura 5 (SEC ID N° 7), o codificada por la secuencia de nucleótidos como se expone en la Figura 6 (SEC ID N° 8), y/o una proteína VP6 como se expone en la Figura 7 (SEC ID N° 9), o codificada por la secuencia de nucleótidos como se expone en la Figura 8
- 15 (SEC ID N° 10).

Las poblaciones de Rotavirus adecuadas para uso en la presente invención se pueden obtener mediante un procedimiento que comprende:

pasar una preparación de Rotavirus en un tipo de célula adecuado;

opcionalmente seleccionar el cultivo homogéneo usando las etapas de o bien:

- 20 a) dilución límite; o
- b) aislamiento de placa individual; y

comprobar la presencia de una variante sustancialmente única llevando a cabo una determinación de secuencias de una región apropiada de la secuencia de genes VP4 y/o VP7.

- 25 De manera adecuada, la población de Rotavirus se deriva de las cepas P43 (RIX4414), P33 o P26 como se ha descrito anteriormente.

La determinación de la secuencia se puede llevar a cabo adecuadamente mediante una técnica de hibridación cuantitativa o semicuantitativa tal como una hibridación de transferencia en ranura o hibridación en placa.

La población de virus clonada resultante que se produce a partir del procedimiento de acuerdo a la invención se puede amplificar subcultivando adicionalmente sobre una línea celular adecuada.

- 30 Los tipos de células adecuados para subcultivar la población de Rotavirus en el procedimiento anterior incluyen células de riñón de mono verde africano (AGMK), que pueden ser líneas de células establecidas o células AGMK primarias. Las líneas de células AGMK adecuadas incluyen por ejemplo Vero (ATCC CCL-81), DBS-FRHL-2 (ATCC CL-160), BSC-1 (ECACC 85011422) y CV-1 (ATCC CCL-70). Son también adecuadas líneas de células MA-104 (mono rhesus) y MRC-5 (humanas – ATCC CCL-171). Las células Vero son particularmente adecuadas para
- 35 propósitos de amplificación. El subcultivo sobre células Vero proporciona una alta producción de virus.

Las técnicas para comprobar si existe una sola variante en una población de virus que se produce a partir del procedimiento, y para determinar la naturaleza de esa única variante implican procedimientos de secuenciación o de hibridación convencionales conocidos en la técnica y se describen en la presente memoria descriptiva más adelante.

- 40 En un aspecto específico, el procedimiento de la invención se lleva a cabo usando un Rotavirus apropiado, particularmente Rotavirus que tienen las características de la cepa 89-12 o de un derivado subcultivado del mismo.

Una población variante única particularmente adecuada es P43, que se obtuvo de P33 (un Rotavirus humano aislado subcultivado 33 veces en cultivo sobre tipos de células apropiados) mediante una serie de etapas de clonación de dilución final seguidas del subcultivo del material clonado en células Vero para amplificación.

- 45 Una población P43 se depositó en la Colección Europea de Cultivos de Células de Animales (ECACC), Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Reino Unido el 13 de agosto de 1999 bajo el número de deposición 99081301, bajo los términos del tratado de Budapest, y se divulga en el documento WO 01/12797.

- 50 Aunque esta disponibilidad pública indicada es el procedimiento más sencillo de obtener el Rotavirus humano P43, se pueden producir Rotavirus similares y funcionalmente sustancialmente idénticos mediante estos u otros procedimientos en vista de las enseñanzas de la presente invención. Tales Rotavirus funcionalmente sustancialmente idénticos se consideran que son biológicamente equivalentes al Rotavirus humano P43 de la presente invención y por lo tanto están dentro del alcance general de la presente invención. Por lo tanto se entenderá que la invención abarca poblaciones de Rotavirus que tienen las características de la variante P43 como

se ha descrito en la presente memoria descriptiva.

También se entenderá que la divulgación abarca materiales derivados del P43 depositado ECACC 99081301 sometiendo a un procesamiento adicional tal como propagándolo mediante subcultivo adicional, clonación, u otros procedimientos usando el virus vivo o modificando P43 de cualquier forma incluyendo mediante técnicas de ingeniería genética o técnicas de reagrupación. Tales etapas y técnicas se conocen bien en la técnica.

Los materiales derivados de P43 depositado que están cubiertos por la invención incluyen material genético y proteico. De particular interés son Rotavirus reagrupados que comprenden al menos un antígeno o al menos un segmento de P43, por ejemplo reagrupamientos que comprenden una cepa virulenta de Rotavirus en la que una parte de uno o parte de los 11 segmentos de genoma se ha reemplazado por el segmento de genoma o parte del mismo de P43. Específicamente, un reagrupamiento de Rotavirus en el que el segmento o segmento parcial que codifica NSP4 es un segmento de P43 o segmento parcial pueden tener propiedades útiles. Los Rotavirus de reagrupamiento y técnicas para prepararlos son bien conocidas (Foster, R. H. y Wagstaff, A. J. Tetravalent Rotavirus Vaccine, una revisión. ADIS drug evaluation, BioDrugs, Gev, 9 (2), 155 - 178, 1998).

Los materiales de interés particular son descendientes de P43 y derivados inmunológicamente activos de P43. Los derivados inmunológicamente activos significa los materiales obtenidos a partir de o con el virus P43, particularmente antígenos del virus, que son capaces de inducir una respuesta inmune que es reactiva contra Rotavirus cuando se inyecta en un animal huésped.

En la adaptación del Rotavirus a una línea celular apropiada, por ejemplo células Vero, puede ser necesario tratar el virus de manera que consiga librarse de cualquier contaminante potencial tal como cualesquiera agentes inesperados que pueden estar presentes y que de otra manera provocarían contaminación. En el caso de virus inesperados sensibles a éter, esto se puede hacer mediante tratamiento con éter como se describe en la presente memoria descriptiva más adelante. La presente invención también se refiere a la inclusión de tal tratamiento con éter como una etapa opcional en el procedimiento global para obtener un Rotavirus vivo atenuado o vacuna formulada con él.

La cepa de Rotavirus de protección cruzada para su uso de acuerdo con la presente invención se puede combinar con otras cepas de Rotavirus para proporcionar protección adicional o protección cruzada contra infección o enfermedad por Rotavirus.

La presente divulgación también se refiere a una vacuna de Rotavirus atenuado vivo capaz de proporcionar protección cruzada, como se ha definido en la presente memoria descriptiva anteriormente, mezclada con un adyuvante o vehículo farmacéutico adecuado.

En un aspecto, la vacuna de Rotavirus para uso de acuerdo con la invención es una vacuna de Rotavirus monovalente que contiene una única cepa de Rotavirus tal como la cepa G1P[8].

La presente invención es particularmente ventajosa proporcionando una vacuna de Rotavirus vivo en la que el Rotavirus atenuado vivo es un rotavirus humano y no provoca invaginación intestinal.

Los vehículos farmacéuticos adecuados para uso con la cepa de Rotavirus atenuado de acuerdo con la invención incluyen los conocidos en la técnica por ser adecuados para la administración oral, especialmente a niños. Tales vehículos incluyen, y no se limitan a, carbohidratos, polialcoholes, aminoácidos, hidróxido de aluminio, hidróxido de magnesio, hidroxipatita, talco, óxido de titanio, hidróxido de hierro, estearato de magnesio, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina, gelatina, peptona vegetal, xantano, carragenano, goma arábiga,  $\beta$ -ciclodextrina. La divulgación también describe un procedimiento para preparar una vacuna de Rotavirus, por ejemplo secando por congelación el virus en presencia de estabilizadores adecuados o mezclando el virus de acuerdo con la invención con un adyuvante adecuado o un vehículo farmacéutico.

También puede ser ventajoso formular el virus de la invención en vehículos basados en lípidos tales como virosomas o liposomas, en emulsiones de aceite en agua o con partículas de vehículo. Como alternativa, o además, se pueden incluir en la formulación inmunoestimulantes tales como los conocidos en la técnica para vacunas orales. Tales inmunoestimulantes incluyen toxinas bacterianas, particularmente toxina de cólera (CT) en la forma de la holotoxina (molécula entera) o la cadena B solamente (CTB) y la enterotoxina lábil por calor de E. coli (LT). Las LT mutadas (mLT) que es menos probable que se conviertan en su forma activa que la LT nativa se describen en los documentos WO 96/06627, WO 93/13202 y US 5.182.109.

Otros inmunoestimulantes que se pueden incluir de manera ventajosa son derivados de saponina tales como QS21 y monofosforilo lípido A, en particular 3-des-O-acilado monofosforilo lípido A (3D-MPL). Las saponinas purificadas como adyuvantes orales se describen en el documento WO 98/56415. Las saponinas y el monofosforilo lípido A se pueden emplear de manera separada o en combinación (por ejemplo, el documento WO 94/00153) y se pueden formular en sistemas de adyuvantes junto con otros agentes. 3D-MPL es un adyuvante fabricado por Ribi Immunochem, Montana y su fabricación se describe en el documento GB 2122204.

Una explicación general de vehículos y adyuvantes para la inmunización oral se puede encontrar en Vaccine

Design, The Subunit and Adjuvant Approach, editado por Powell y Newman, Plenum Press, Nueva York, 1995.

La divulgación también se refiere a un procedimiento de vacunación de sujetos humanos, especialmente niños, mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo de una cantidad eficaz de una composición de vacuna de acuerdo con la invención. De manera adecuada la vacuna atenuada viva se administra mediante administración oral.

En un aspecto específico, la cepa de Rotavirus atenuada de acuerdo con la invención se formula con un antiácido para minimizar la inactivación de la vacuna mediante el ácido del estómago. Los componentes antiácido adecuados incluyen antiácidos inorgánicos por ejemplo hidróxido de aluminio  $\text{Al}(\text{OH})_3$  e hidróxido de magnesio  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ . Los antiácidos comercialmente disponibles que son adecuados para uso en la invención incluyen Mylanta (marca comercial) que contiene hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio. Éstos son insolubles en agua y se proporcionan en suspensión.

El hidróxido de aluminio es un componente particularmente adecuado de una composición de vacuna para su uso de acuerdo con la invención ya que puede proporcionar no sólo un efecto antiácido sino también un efecto adyuvante.

Son también adecuados para uso como antiácidos en la vacuna de la invención los antiácidos orgánicos tales como sales carboxilato de ácidos orgánicos. Un antiácido adecuado en la composición de vacuna para su uso de acuerdo con la invención contiene una sal carboxilato de ácido orgánico, específicamente una sal de ácido cítrico tal como citrato de sodio o citrato de potasio.

Un antiácido particularmente adecuado que se puede usar en la composición de vacuna para su uso de acuerdo con la presente invención es la sal inorgánica insoluble, carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ). El carbonato de calcio es capaz de asociarse con el Rotavirus y la actividad de Rotavirus se mantiene durante la asociación con el carbonato de calcio.

Para prevenir la sedimentación de carbonato de calcio durante la etapa de llenado, los agentes viscosos se presentan de manera adecuada en la formulación.

Los posibles agentes viscosos que se pueden usar incluyen excipientes pseudoplásticos. Una solución pseudoplástica se define como una solución que tiene mayor viscosidad tras reposo comparada con su viscosidad bajo agitación. Los excipientes de este tipo son polímeros naturales tales como goma arábiga, goma adragante, agar - agar, alginatos, pectinas o polímeros semisintéticos por ejemplo: carboximetilcelulosa (Tyloses C®), metilcelulosa (Methocels A®, Viscotrans MC®, Tylose MH® y MB®), hidroxipropilcelulosa (Klucels®), e hidroxipropilmetilcelulosa (Methocels E® y K®, Viscontrans MPH®). En general, aquellos excipientes pseudoplásticos se usan juntos con agentes tixotrópicos. Agentes viscosos alternativos que se pueden usar son excipientes pseudoplásticos con poca capacidad de fluir. Esos polímeros, a una concentración suficiente, dan lugar a una disposición de fluido estructural que da como resultado una solución de alta viscosidad que tiene poca capacidad de fluir tras reposo. Se requiera proporcionar una cierta cantidad de energía al sistema para permitir el flujo y transferencia.

Se necesitan energías externas (agitación) para destruir de manera temporal la disposición de fluido estructural con el fin de obtener una solución fluida.

Los ejemplos de tales polímeros son Carbopol® y goma xantano.

Los excipientes tixotrópicos llegan a tener una estructura de gel tras reposo mientras que si están bajo agitación forman una solución fluida. Los ejemplos de excipientes tixotrópicos son: Veegum® (silicato de Magnesio-aluminio) y Avicel RC® (celulosa microcristalina aproximadamente al 89 % y carboximetilcelulosa de sodio al 11 %).

La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la presente invención comprende de manera adecuada un agente viscoso seleccionado entre goma xantano o almidón.

De este modo, la composición de vacuna para su uso de acuerdo con la presente invención se formula típicamente con una combinación de carbonato de calcio y goma xantano.

Otros componentes de una composición usada en la invención incluyen de manera adecuada azúcares por ejemplo sacarosa y/o lactosa.

La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la invención puede contener componentes adicionales que incluyen por ejemplo aromatizantes (particularmente para una vacuna oral) y agentes bacteriostáticos.

Se conciben diferentes presentaciones de la composición de vacuna para uso de acuerdo con la invención.

En un aspecto, la divulgación se refiere a una vacuna administrada en forma de una formulación líquida. De manera adecuada, la formulación líquida se reconstituye antes de la administración a partir de al menos los siguientes dos componentes:

- i) componente de virus

ii) componente líquido

5 En este aspecto, el componente de virus y el componente líquido están normalmente presentes en envases separados, que pueden ser convenientemente compartimentos separados de un único recipiente, o recipientes separados que pueden estar conectados de tal forma que la composición de vacuna final se reconstituye sin exposición al aire.

10 Antes de la reconstitución, el virus puede estar en una forma seca o una forma líquida. De manera adecuada el componente de virus se liofiliza. El virus liofilizado es más estable que el virus en una solución acuosa. El virus liofilizado se puede reconstituir de manera adecuada usando una composición de antiácido líquida para producir una formulación de vacuna líquida. Como alternativa el virus liofilizado se puede reconstituir con agua o solución acuosa, en cuyo caso la composición de virus liofilizado contiene de manera adecuada un componente antiácido.

De manera adecuada, la formulación de vacuna comprende un componente de virus formulado con carbonato de calcio y goma xantano en un compartimento o recipiente y éste se reconstituye con agua o solución acuosa presente en el segundo compartimento o recipiente.

15 En otro aspecto, la composición de vacuna como se divulga en el mismo es una formulación sólida, de manera adecuada una torta liofilizada que es adecuada para la disolución inmediata cuando se coloca en la boca. Las formulaciones liofilizadas se pueden proporcionar de manera conveniente en la forma de comprimidos en un envase blíster farmacéutico.

En otro aspecto, la divulgación describe una vacuna de Rotavirus en la forma de un comprimido de disolución rápida para la administración oral.

20 En otro aspecto, la divulgación describe una composición que comprende una cepa de Rotavirus atenuado vivo, en particular una cepa de Rotavirus humano, en la que la composición es un sólido liofilizado capaz de disolución inmediata cuando se coloca en la boca.

25 De manera adecuada, el comprimido de disolución rápida de acuerdo con la invención se disuelve en la boca del sujeto lo suficientemente rápido para prevenir la deglución del comprimido no disuelto. Este planteamiento es particularmente ventajoso para vacunas de Rotavirus pediátricas.

De manera adecuada, el virus es un Rotavirus humano atenuado vivo que se formula con un antiácido inorgánico tal como carbonato de calcio y un agente viscoso tal como goma xantano. Un aspecto adicional de la presente divulgación es la descripción de una formulación liofilizada en la que el componente de virus es cualquier cepa de rotavirus que se formula con carbonato de calcio y goma xantano.

30 Las vacunas para su uso de acuerdo con la invención se pueden formular y administrar mediante técnicas conocidas, usando una cantidad adecuada del virus vivo para proporcionar protección eficaz contra infección por Rotavirus sin efectos secundarios adversos significativos en las vacunas típicas. Una cantidad adecuada de virus vivo estará normalmente entre  $10^4$  y  $10^7$  unidades formadoras de focos (uff) por dosis. Una dosis típica de vacuna puede comprender  $10^5$  -  $10^6$  uff por dosis y se puede proporcionar en varias dosis durante un período de tiempo, por ejemplo en dos dosis proporcionadas con un intervalo de dos meses. Los beneficios pueden sin embargo obtenerse tomando más de 2 dosis, por ejemplo un régimen de 3 o 4 dosis, particularmente en países en vías de desarrollo. El intervalo entre dosis puede ser más o menos que dos meses de duración. Una cantidad óptima de virus vivo para una sola dosis o para un régimen de dosis múltiple, y programación óptima para las dosis, se puede determinar mediante estudios convencionales que implican la observación de títulos de anticuerpos y otras respuestas en sujetos.

La vacuna para su uso de acuerdo con la invención también puede comprender otros virus vivos adecuados para protección contra otras enfermedades, por ejemplo poliovirus. Como alternativa otras vacunas de virus vivo adecuadas para la administración oral se pueden proporcionar en una dosis separada pero en la misma ocasión que la composición de vacuna de Rotavirus de acuerdo con la invención.

45 Sueros de 12 niños de 4 a 6 meses de edad vacunados con el material de P33 como se describe en el artículo de Vaccine (1998) se ensayaron para neutralización de P33, P38, P43 y 89-12C2.

50 El intervalo de los títulos de neutralización de todos los sueros ensayados es similar para P33, P38 y P43. El análisis estadístico no muestra diferencia significativa en los títulos globales de neutralización contra los tres virus. Esto sugiere que los epítopos de neutralización conformacional y no conformacional de P33, P38 y P43 se reconocen igual de bien por los sueros anti-P33 de niños vacunados con P33. Esta observación indirectamente sugiere que los epítopos de neutralización revelados en este ensayo in vitro no estaban alterados entre P33, P38 y P43.

55 Sin embargo el intervalo de los títulos de neutralización de P89-12C2 difiere significativamente de P33, P38 and P43. Esta observación sugiere que los epítopos de neutralización conformacional y no conformacional de P33, P38 y P43 no son reconocidos igual de bien por los sueros anti-P33 de niños vacunados con P33. Esta observación sugiere indirectamente que los epítopos de neutralización revelados en este ensayo in vitro estaban alterados entre

89- 12 C2 y P33, P38 y P43.

Los fragmentos inmunogénicos se pueden definir en el contexto de la presente invención como fragmentos que cuando se administran a una dosis eficaz (o bien solos o como un hapteno unido a un vehículo) inducen una respuesta protectora inmune contra infección por Rotavirus.

5 Los siguientes ejemplos no limitantes, ilustran la invención.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1: Demostración de que la cepa 89-12 en el subcultivo 26 (P26) es una mezcla de variantes**

**Secuenciación de los genes VP4 y VP7 de lotes de subcultivo diferentes**

10 Se realizó la secuenciación de los genes VP4 y VP7 del subcultivo P26 (células AGMK primarias), subcultivo P33 (línea de células establecida AGMK (como opuestas a las primarias)), subcultivo P41 y subcultivo P43. La extracción del ARN total se transcribió inversamente y se amplificó mediante PCR en un tubo/una etapa.

Los cebadores Rota 5bis y Rota 29bis amplificaron el gen completo VP4 y los cebadores Rota 1 y Rota 2bis amplificaron el gen completo VP7. El material de PCR se ha secuenciado usando cebadores diferentes (véase la Tabla 1).

15 La secuencia del subcultivo P26 difería de la secuencia del subcultivo P33 en 3 bases (en las posiciones 501, 788 y 802 pares de bases a partir del codón de iniciación) en VP4 y en tres bases en VP7 (108, 605 y 897 pares de bases a partir del codón de iniciación).

20 Las exploraciones de la secuencia del subcultivo P26 de VP4 y VP7 muestran en posiciones mutadas la presencia de la secuencia del subcultivo P33 como un fondo. De este modo se puede ver que el subcultivo de subcultivo P26 es una mezcla de al menos 2 variantes.

Las exploraciones de la secuencia del subcultivo P33 parecen homogéneas en VP4 y heterogéneas para VP7 (véase la Tabla 2).

25 El subcultivo P38 (derivado del subcultivo 33) se subcultivó 5 veces sobre células Vero y mostró el mismo conjunto de secuencias VP4 y VP7 que el subcultivo P33 (línea de células de AGMK). De este modo no existía ningún cambio principal en las poblaciones entre P33 y P38.

TABLA 1: Oligonucleótidos usados para RT-PCR y secuenciación

	nombre	secuencia	posición
VP7	Rota 1	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G (SEC ID N° 11)	-49 a -22
	Rota 1bis	GGT TAG CTC CTT TTA ATG TAT GGT A (SEC ID N° 12)	-16 a 10
	Rota 2bis	GGT CAC ATC GAA CAA TTC TAA TCT AAG (SEC ID N° 13)	1014-988
	Rota 7	CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G (SEC ID N° 14)	266-287
	Rota 12	TGT TGA TTT TTC TGT CGA TCC AC (SEC ID N° 15)	372-394
	Rota 46	GGT TGC TGA GAA TGA GAA ATT AGC TAT AGT GG (SEC ID N° 16)	651-682
	Rota 18	CCA CTA TAG CTA ATT TCT CAT TCT CAG CAA CC (SEC ID N° 17)	682 - 651
VP4	Rota 5	TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A (SEC ID N° 18)	2-23
	Rota 6	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC (SEC ID N° 19)	878 - 859
	Rota 5bis	TGG CTT CAC TCA TTT ATA GAC A (SEC ID N° 20)	2 - 23
	Rota 6bis	ATT TCA GAC CAT TTA TAA CCT AG (SEC ID N° 21)	878 - 856
	Rota 25	GGA GTA GTA TAT GAA AGT ACA AAT AAT AG (SEC ID N° 22)	268 - 296
	Rota 26	CTA TTA TTT GTA CTT TCA TAT ACT ACT CC (SEC ID N° 23)	296 - 268
	Rota 27bis	TCG ATA CAG TAT AAG AGA GCA CAA G (SEC ID N° 24)	721 - 745

ES 2 534 637 T3

Rota 28	TTC ATT AAC TTG TGC TCT CTT ATA CTG (SEC ID N° 25)	753 - 727
Rota 31	GTA TAT GTA GAC TAT TGG GAT G (SEC ID N° 26)	1048 - 1070
Rota 32	CAT CCC AAT AGT CTA CAT ATA C (SEC ID N° 27)	1070 - 1048
Rota 45	TGT AAC TCC GGC AAA ATG CAA CG (SEC ID N° 28)	1205 - 1227
Rota 53	CGT TGC ATT TTG CCG GAG TTA CA (SEC ID N° 29)	1227 - 1205
Rota 54	GTA AGA CAA GAT TTA GAG CGC CA (SEC ID N° 30)	1465 - 1487
Rota 55	TGG CGC TCT AAA TCT TGT CTT AC (SEC ID N° 31)	1487 - 1465
Rota 40	CTT GAT GCT GAT GAA GCA GCA TCT G (SEC ID N° 32)	1703 - 1727
Rota 39	CAG ATG CTG CTT CAT CAG CAT CAA G (SEC ID N° 33)	1727 - 1703
Rota 33	CGA TCA TAT CGA ATA TTA AAG GAT G (SEC ID N° 34)	2008 - 2032
Rota 34	CAT CCT TTA ATA TTC GAT ATG ATC G (SEC ID N° 35)	2032 - 2008
Rota 29bis	AGC GTT CAC ACA ATT TAC ATT GTA G (SEC ID N° 36)	2335 - 2311

TABLA 2: oligonucleótidos usados en hibridación

	nombre	secuencia	posición
VP7	Rota 41	AGT ATT TTA TAC TAT AGT AGA TTA TAT TAA TC (SEC ID N° 37)	882 - 913
	Rota 42	AGT ATT TTA TAC TAT GGT AGA TTA TAT TAA TC (SEC ID N° 38)	882 - 913
VP4	Rota 15	ATC CCC ATT ATA CTG CAT TCC TTT C (SEC ID N° 39)	807 - 783
	Rota 16	ATC CCT ATT ATA CTG CAT TTC TTT C (SEC ID N° 40)	807 - 783
	Rota 35	ATC CCC ATT ATA CTG CAT TTC TTT C (SEC ID N° 41)	807 - 783
	Rota 36	ATC CCT ATT ATA CTG CAT TCC TTT C (SEC ID N° 42)	807 - 783

Las bases mostradas en letra **negrita** en la Tabla 2 son los sitios de variación de secuencia específica en VP4 y VP7.

5

TABLA 3: variación de secuencia de los genes VP4 y VP7

Tabla 3.1

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

N.B. En un segundo clon de los 3 clones que se desarrollaron hasta el nivel de lote de producción, el nucleótido de la posición 897 pares de bases de VP7 es G, en lugar de A como en el clon seleccionado P43. Esto da como resultado una metionina en lugar de una isoleucina en la secuencia de aminoácidos. Las variantes correspondientes

10

a tanto el clon de P43 seleccionado como el clon en el que hay una G en VP7 a 897 pares de bases a partir del codón de iniciación, se excretaron en las deposiciones de niños que habían sido vacunados con el material P33.

En la Tabla 3.1, donde hay dos bases alternativas en una posición particular, la primera de las dos representa la base que aparece en la población mayoritaria y la segunda es la base que aparece en la población minoritaria. Las poblaciones variantes mayoritaria y minoritaria se juzgan por la fuerza de la señal en la secuenciación.

Tabla 3.2

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

Tabla 3.2 muestra los cambios de aminoácidos que se producen por las diferencias de nucleótidos entre las variantes.

TABLA 4

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

**Hibridación de transferencia en ranura**

El cambio en poblaciones entre los subcultivos P26 a P33 sobre células AGMK se ha confirmado adicionalmente mediante hibridación de transferencia en ranura. Los fragmentos de los genes VP4 y VP7 generados por RT/PCR se hibridaron con sondas de oligonucleótidos específicas para cada variante (véase la Tabla 3.1 y 3.2). En contraste a P26 que se hibrida con Rota 16, Rota 35 y Rota 36 y no con Rota 15, el fragmento de la PCR de VP4 del material P33, en las posiciones 788 y 802 se hibridó solamente con Rota 16 y no con o bien Rota 15 o Rota 35 o Rota 36. Estos resultados establecían la presencia de al menos 3 variantes en P26 (véase la Tabla 4).

Para el fragmento de PCR de VP7 del material P33, posición 897 se hibridó con Rota 41 y Rota 42. Estos resultados establecieron la presencia de al menos dos variantes en el material P33.

**Ejemplo 2: Aislamiento y caracterización del clon P43**

Para aislar los componentes de P33 como una población de virus homogénea, se realizaron tres diluciones de punto final de P33/AGMK sobre células Vero y el virus resultante se usó para infectar células Vero.

Se seleccionaron pocillos positivos usando dos criterios: crecimiento demostrado por el mayor número de focos detectados en los pocillos y la mayoría de pocillos positivos aislados en las placas, como se hace de manera clásica. Después de 3 subcultivos de dilución final en placas de microtitulación de 96 pocillos, se amplificaron sucesivamente

10 pocillos positivos sobre células Vero y se evaluaron por su rendimiento.

Basado en el rendimiento, se desarrollaron tres clones hasta el nivel de subcultivo del lote de producción. El inmunorreconocimiento mediante anticuerpos policlonales se mostró que era similar tanto entre los tres clones como entre los clones y P33. La homogeneidad de los clones se determinó mediante hibridación de transferencia en ranura. La selección final de un solo clon se basó en el rendimiento y secuencia.

El clon seleccionado se amplificó mediante pases sucesivos sobre células Vero para generar una semilla Maestra, una semilla de Trabajo y finalmente lotes de producción.

El clon seleccionado se caracterizó genéticamente a niveles de subcultivo diferentes mediante la secuenciación de VP4 y VP7 (identidad) y mediante hibridación de transferencia en ranura específica del VP4 y VP7 (homogeneidad) de los materiales amplificados por la PCR. Las secuencias de los genes VP4 y VP7 del material P43 se proporcionan en las Figuras 1 y 3 respectivamente y son idénticas a P41.

La homogeneidad del clon seleccionado se determinó mediante hibridación selectiva usando sondas de oligonucleótidos que discriminan los cambios de nucleótidos en las regiones VP4 y/o VP7 para cada variante identificada durante la secuenciación de P26/ AGMK primarias (véase la tabla 4).

El fragmento VP4 se hibridó con Rota 16 y no con Rota 15, Rota 35 o Rota 36. El fragmento VP7 se hibridó con Rota 41 y no con Rota 42.

Estos resultados confirman que P43 es una población homogénea.

### Ejemplo 3: Retirada de potenciales virus inesperados

Se añadió éter a P33 (cultivadas en AGMK) hasta una concentración final de 20 % durante 1 hora. Después se retiró el éter mediante burbujas con N<sub>2</sub> durante 35 minutos. No se observó ningún impacto sobre la titulación de la semilla de P33.

### Ejemplo 4: Formulación de una vacuna atenuada viva

Los lotes de producción descritos anteriormente se formulan para administración oral a niños mediante el siguiente procedimiento.

#### 1. Virus liofilizado

Se usan técnicas convencionales para preparar dosis de virus. Se descongela una masa viral purificada congelada y se diluye con composición de medio apropiada, en este caso Medio de Eagle modificado por Dulbecco, hasta una concentración viral convencional deseada, en este caso 10<sup>8,2</sup> uff/ml. El virus diluido se diluye después adicionalmente con estabilizador de liofilización (sacarosa 4 %, dextrano 8 %, sorbitol 6 %, aminoácido 4 %) hasta la titulación viral diana, en este caso 10<sup>5,6</sup> uff/dosis. Se transfieren de manera aséptica alícuotas de 0,5 ml de composición de virus estabilizada a viales de 3 ml. Cada vial se cerró después parcialmente con un tapón de caucho, la muestra se seca por congelación a vacío, después el vial se cierra completamente y se engasta una tapa de aluminio en el sitio alrededor del vial para mantener el tapón en el sitio.

Para uso, el virus se reconstituye usando uno de los siguientes reconstituyentes antiácidos:

#### (a) Reconstituyente de citrato

Se disuelve citrato sódico en agua, se esteriliza mediante filtración y se transfiere de manera aséptica en recipientes reconstituyentes en cantidades de 1,5 ml a una concentración de 544 mg de Na<sub>3</sub>Citrato.2H<sub>2</sub>O por dosis de 1,5 ml. Los recipientes reconstituyentes pueden ser por ejemplo viales de 3 ml, o viales de 4 ml, o jeringas de 2 ml, o cápsulas que se pueden comprimir plásticas blandas para la administración oral. Como una alternativa para mantener los componentes estériles en condiciones estériles, el recipiente final se puede esterilizar en autoclave.

#### (b) Reconstituyente de Al(OH)<sub>3</sub>

Una suspensión de hidróxido de aluminio aséptica (marca registrada - Mylanta) se diluye de manera aséptica en agua estéril, se transfiere de manera aséptica a recipientes reconstituyentes (por ejemplo jeringas de 2 ml, o cápsulas que se pueden comprimir plásticas blandas) en cantidades de 2 ml que contiene cada una de ellas 48 mg de Al(OH)<sub>3</sub>. Una alternativa a usar componentes estériles en condiciones estériles es irradiar con rayos γ y la suspensión de hidróxido de aluminio (preferiblemente en una fase diluida).

Se incluyen ingredientes convencionales para evitar que la suspensión se sedimente. Tales ingredientes convencionales incluyen por ejemplo estearato de magnesio, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina, y polímeros de silicona. También se pueden incluir agentes bacteriostáticos por ejemplo, butilparabeno, propilparabeno u otros agentes bacteriostáticos convencionales usados en alimentación, y aromatizantes.

2. Virus liofilizados con Al(OH)<sub>3</sub> en formulación líquida

5 Se usan técnicas convencionales para preparar dosis de virus. Se descongela una masa viral purificada congelada y se diluye con composición de medio apropiada, en este caso Medio de Eagle modificado por Dulbecco, hasta una concentración viral convencional deseada, en este caso 10<sup>6,2</sup> uff/ml. Se añade suspensión de hidróxido de aluminio hasta alcanzar una cantidad final de 48 mg/dosis y la composición de virus se diluye con estabilizador de liofilización (sacarosa 4 %, dextrano 8 %, sorbitol 6 %, aminoácido 4 %) hasta el título viral diana, en este caso 10<sup>5,6</sup> uff/dosis. Se transfieren asépticamente alícuotas de 0,5 ml de composición de virus estabilizado a viales de 3 ml. La liofilización y cierre de los viales se lleva después a cabo como se ha descrito en la parte 1.

3. Virus liofilizados con Al(OH)<sub>3</sub> para presentación de blíster

10 Se usan técnicas convencionales para preparar dosis de virus. Se descongela una masa viral purificada congelada y se diluye con composición de medio apropiada, en este caso Medio de Eagle modificado por Dulbecco, hasta una concentración viral convencional deseada, en este caso 10<sup>6,2</sup> uff/ml. Se añade suspensión de hidróxido de aluminio hasta alcanzar una cantidad final de 48 mg/dosis y la composición de virus se diluye con estabilizador de liofilización que puede ser sacarosa, dextrano o aminoácido 4 %, o gelatina, o peptona vegetal, o xantano hasta la titulación viral diana de 10<sup>5,6</sup> uff/dosis. Se emplea una operación de llenado aséptico para transferir dosis de 0,5 ml o preferiblemente menores a cavidades blíster. La composición se liofiliza, y las cavidades blíster se sellan mediante sellado térmico.

20 Se incluyen opcionalmente ingredientes convencionales para prevenir que la suspensión de hidróxido de aluminio se sedimente. Tales ingredientes convencionales incluyen por ejemplo estearato de magnesio, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina, y polímeros de silicona. También se pueden incluir aromatizantes.

**Ejemplo 5. Titulación viral de Rotavirus para diversas formulaciones**

**5.1: Comparación entre formulaciones basadas en lactosa y sacarosa:**

Tabla 5

Nº de lote	Composición de formulación	Titulación viral antes de la liofilización	Titulación viral después de la liofilización y 1 semana a 37 °C
98G06/01	Lactosa:2 %; Dextrano:4 %; Sorbitol:3 %; Aminoácidos:2 %	10 <sup>5,22</sup>	10 <sup>4,67</sup>
98G06/03	Sacarosa:2 %; Dextrano:4 %; Sorbitol:3 %; Aminoácidos:2 %	10 <sup>5,28</sup>	10 <sup>4,92</sup>

25 El Rotavirus P43 se formuló o bien con sacarosa o con lactosa como se ha mostrado en la tabla anterior.

La titulación viral antes de la liofilización es la titulación viral en el líquido formulado completo (que contiene sacarosa dextrano sorbitol aminoácidos) y sin la etapa de liofilización.

Buenos resultados son aquellos en los que se logran una disminución <0,5 log en la etapa de liofilización y una disminución <0,5 log durante la "1 semana a 37 °C" (ensayo de estabilidad acelerada).

30 La precisión de la titulación viral es aproximadamente + o - 0,2 log.

Los resultados indican que se puede usar sacarosa en lugar de lactosa.

**5.2: Efecto de la arginina y reemplazo de sorbitol por maltitol:**

Tabla 6

Nº de lote	Composición de formulación	Titulación viral en el momento = 0 después de la liofilización	Titulación viral después de la liofilización y 1 semana a 37 °C
98L16/01	Lactosa:2 %; Dextrano:4 %; Sorbitol:3 %; Aminoácidos:2 %	10 <sup>4,8</sup>	10 <sup>4,8</sup>
98L16/02	Lactosa:2 %; Dextrano:4 %; Sorbitol:3 %; Aminoácidos:2 % Arginina: 3 %	10 <sup>4,8</sup>	10 <sup>4,9</sup>
98L16/04	Lactosa:2 %; Dextrano:4 %; Maltitol:3 %; Aminoácidos:2 % Arginina: 3 %	10 <sup>4,7</sup>	10 <sup>5</sup>

5 Los resultados demuestran que la adición de arginina (que se sabe que mejora la estabilidad del virus durante la liofilización y también proporciona un medio básico con el fin de compensar la acidez del estómago) mantiene la titulación viral.

El sorbitol tiende a disminuir la temperatura de transición vítrea de la torta liofilizada en tanto como un grado. Esto se puede superar usando maltitol en lugar de sorbitol como se ha mostrado anteriormente y la titulación viral se mantiene todavía.

10

**5.3: Diversas composiciones de formulación**

Este experimento demuestra que son posibles una serie de formulaciones.

Tabla 7

Nº de lote	Composición de formulación	Titulación viral antes de la liofilización	Titulación viral después de la liofilización y 1 semana a 37 °C
99C11/01	Sacarosa:2 %; Dextrano:4 %; Sorbitol:3 %; Aminoácidos:2 %	10 <sup>5,24</sup>	10 <sup>5,07</sup>
99C11/02	Sacarosa:2 %;	10 <sup>5,09</sup>	10 <sup>4,92</sup>

ES 2 534 637 T3

	Dextrano:4 %; Maltitol:3 %; Aminoácidos:2 %		
99C11/04	Dextrano:4 %; Maltitol:3 %; Aminoácidos:2 %	$10^{4,89}$	$10^{5,06}$

Nº de lote	Composición de formulación	Titulación viral en el momento = 0 después de la liofilización	Titulación viral después de la liofilización y 1 semana a 37°C
99C17/01	Sacarosa:2 %; Dextrano:4 %; Sorbitol:3 %; Aminoácidos:2 %	$10^{5,40}$	$10^{5,41}$
99C17/02	Sacarosa:2 %; Dextrano:4 %; Sorbitol:1,5 %; Aminoácidos:2 %	$10^{5,30}$	$10^{4,93}$
99C17/03	Sacarosa:2 %; Dextrano:4 %; Aminoácidos:2 %	$10^{5,31}$	$10^{5,24}$
99C17/04	Sacarosa:2 %; Dextrano:4 %; Maltitol:3 %; Aminoácidos:2 %	$10^{4,42}$	$10^{4,45}$
99C17/05	Sacarosa:2 %; Dextrano:4 %; Maltitol:1,5 %; Aminoácidos:2 %	$10^{4,39}$	$10^{4,40}$
99C17/06	Sacarosa:2 %; Dextrano:4 %; Sorbitol:3 %;	$10^{5,44}$	$10^{4,97}$

99C17/07	Sacarosa:2 %; Dextrano:4 %; Sorbitol:1,5 %;	$10^{5,11}$	$10^{4,89}$
----------	---	-------------	-------------

**5.4: Asociación entre Rotavirus y antiácido  $Al(OH)_3$ :**

Tabla 8

Rotavirus	$Al(OH)_3$	H <sub>2</sub> O	Tiempo de contacto a temperatura ambiente	Centrifugación	Titulación viral del sobrenadante en uff/ml	Titulación viral de los sedimentos en uff/ml
$10^{5,6}$ uff/ml	48 mg en 0,240 ml	0,76 ml	30 min	8000 rpm, 10 min	$10^{3,66}$	
$10^{5,6}$ uff/ml	0,48 mg en 0,240 ml	0,76 ml	30 min	8000 rpm, 10 min	$10^{4,41}$	
$10^{5,6}$ uff/ml		1 ml	30 min	8000 rpm, 10 min	$10^{5,68}$	
Rotavirus en torta liofilizada	12 mg en 0,120 ml	1,380 ml	30 min	8000 rpm, 10 min	Por debajo de la detección	$10^{4,7}$

- 5 Se usa  $Al(OH)_3$  como un antiácido. Esto muestra que el Rotavirus está asociado con la sal inorgánica insoluble de  $(Al(OH)_3)$  ya que se centrifuga con el  $Al(OH)_3$  (disminución de actividad viral en el sobrenadante).

**5.5: Disolución del antiácido  $Al(OH)_3$  por citrato sódico antes de la titulación viral**

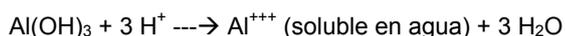
Tabla 9

Muestras virales	Disolución	Condiciones	Titulaciones virales uff/ml
formulación líquida 99B10/06 antes de la liofilización; $10^{5,43}$	1,5 ml de CitratoNa <sub>3</sub>	24 h a temperatura ambiente	$10^{5,11}$
99B10/06:liofilizado $10^{5,43}$	1,5 ml de CitratoNa <sub>3</sub>	24 h a temperatura ambiente	$10^{4,53}$

5 Cuando el Rotavirus está asociado al Al(OH)<sub>3</sub>, es posible liofilizar todo (incluyendo el Al(OH)<sub>3</sub>). Después de la liofilización es posible recuperar Rotavirus disolviendo Al(OH)<sub>3</sub> en citrato sódico. Esta etapa no daña el Rotavirus y retiene su actividad después de la etapa de disolución.

**5.6: Infectividad del Rotavirus después de la liberación de la asociación Al(OH)<sub>3</sub>-Rotavirus:**

10 El mecanismo de la liberación de virus (mediante disolución del vehículo) se puede muy bien producir *in vivo*. De hecho, por debajo de pH 6, el hidróxido de aluminio se llega a hacer completamente soluble, y de esta manera, el Rotavirus se liberará en el estómago.



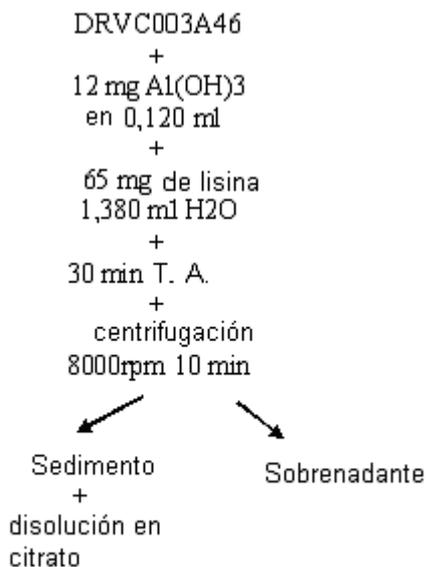
En el estómago, los iones Al<sup>+++</sup> no se absorben (J.J. Powell, R. Jugdaohsingh y R.P.H. Thompson, The regulation of mineral adsorption in the gastrointestinal track, Proceedings of the Nutrition Society (1999), 58, 147 - 153).

15 En el intestino, debido al incremento del pH, las formas insolubles de aluminio se precipitan (Al(OH)<sub>3</sub> o AlPO<sub>4</sub>), y se eliminan por la forma natural.

Se desconoce si el precipitado Al(OH)<sub>3</sub> (o AlPO<sub>4</sub>) nuevamente formado será capaz de reasociarse con los Rotavirus libres. Esto hace surgir la cuestión de la infectividad de la propia asociación Al(OH)<sub>3</sub>-Rotavirus.

La liberación del Rotavirus de la asociación Al(OH)<sub>3</sub>-Rotavirus por otros mecanismos es también posible. La lisina, por ejemplo, interfiere con la adsorción viral sobre Al(OH)<sub>3</sub>.

20 Otros aniones como borato, sulfato, carbonato y fosfato se conoce que se adsorben específicamente sobre hidróxido de aluminio, de este modo, teóricamente, debe ser posible desplazar (mediante competición por el sitio de adsorción) Rotavirus de la asociación Al(OH)<sub>3</sub>-Rotavirus.



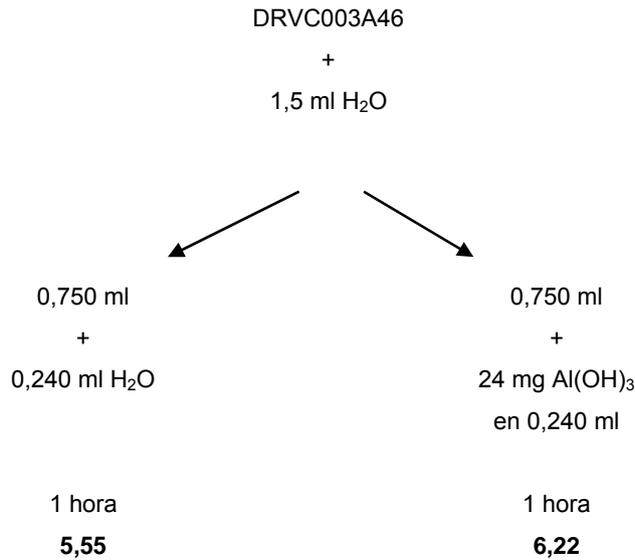
**por debajo de detección 3,8**

De este modo, se puede liberar Rotavirus de la asociación Rotavirus -  $\text{Al}(\text{OH})_3$  y el Rotavirus liberado permanece activo.

Esta liberación se puede hacer o bien disolviendo  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (por HCl en el estómago, o por CitratoNa3 in vitro) o desplazando el Rotavirus por un aminoácido básico (por ejemplo lisina).

5 **5.7: Infectividad de la asociación  $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Rotavirus**

Se reconstituyó una única dosis de Rotavirus liofilizado con agua y se dividió en dos partes. La primera parte, considerada como referencia, recibió un volumen adicional de agua. La segunda parte recibió 24 mg de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  se suspendió en 0,240 ml de agua (titulaciones virales preclínicas).



10 Cuando está presente  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , el Rotavirus está activo y el valor de titulación viral es mayor comparado con la muestra de referencia.

Este experimento se repitió sin dividir la dosis liofilizada, y añadiendo 12 mg de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  o 24 mg de  $\text{Al}(\text{OH})_3$ .

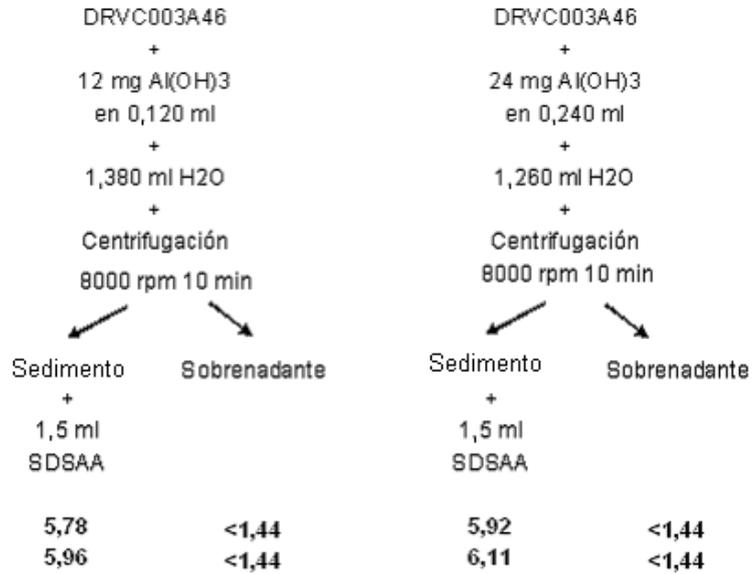
Aquí la muestra de referencia era la reconstituida con un tampón Citrato-Bicarbonato. De este modo, la titulación viral es otra vez mayor en la presencia de  $\text{Al}(\text{OH})_3$ .

15

DRVC003A46	DRVC003A46	DRVC003A46
+	+	+
1,5 ml de tampón WL	12 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ en 0,120 ml	24 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ en 0,240 ml
	+	+
	1,380 ml H <sub>2</sub> O	1,260 ml H <sub>2</sub> O
<b>5,34</b>	<b>6,24</b>	<b>6,05</b>
<b>5,32</b>	<b>5,95</b>	<b>6,26</b>

## ES 2 534 637 T3

Como en el ejemplo anterior, el Rotavirus se asocia con las partículas de  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , ya que el virus se puede desechar por centrifugación. DRVC003A46 es un Rotavirus formulado liofilizado (Sacarosa: 2 %; Dextrano: 4 %, Sorbitol: 3 %; aminoácidos: 2 %).



SDSAA= sacarosa 2%, Dextrano 4%, Sorbitol 3%, aminoácido 2%.

- 5 De acuerdo con la titulación viral llevada a cabo sobre el sobrenadante, la cantidad de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  necesaria para adsorber el Rotavirus parece ser baja (comenzando con una dosis liofilizada de 5,7 log) aumentada a escala la titulación viral):

Tabla 10

Al(OH) <sub>3</sub>	Tiempo de adsorción	Titulación en el sobrenadante
12 mg	1 hora a T. A.	2,7
24 mg	1 hora a T. A.	3,4
48 mg	1 hora a T. A.	3,4
72 mg	1 hora a T. A.	2,0
96 mg	1 hora a T. A.	por debajo de la detección
12 mg	Durante toda una noche	2,7
24 mg	Durante toda una noche	por debajo de la detección
48 mg	Durante toda una noche	2,5
12 mg	inmediato	por debajo de la detección
24 mg	Inmediato	2,0
48 mg	Inmediato	por debajo de la detección

El tiempo necesario para adsorber Rotavirus sobre  $\text{Al}(\text{OH})_3$  parece ser corto:

Una dosis de Rotavirus liofilizado se reconstituyó en presencia de 24 mg de  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , y se centrifugó después de 0, 15, 60 min y 24 horas. El "Sedimento" se volvió a suspender en SDSAA antes de la titulación viral:

5

Tabla 11

Tiempo	Sedimento	Sobrenadante
0 min	5,26	3,17
15 min	5,34	<1,44
60 min	5,96	<1,44
24 horas	6,13	<1,44

**5.8: Usando  $\text{CaCO}_3$  como antiácido**

Con el fin de evitar aluminio en la vacuna, el antiácido  $\text{Al}(\text{OH})_3$  se reemplazó por otra sal inorgánica insoluble:  $\text{CaCO}_3$  (carbonato de calcio).

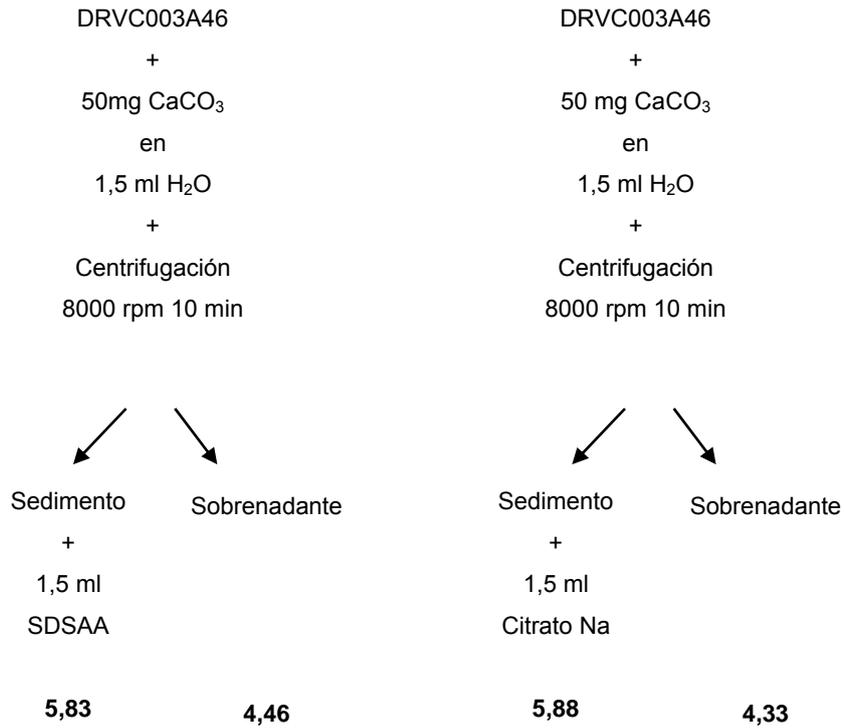
10 Los fenómenos observados con  $\text{CaCO}_3$  son paralelos a los descritos para  $\text{Al}(\text{OH})_3$ :

- Asociación de Rotavirus con la sal inorgánica;
- Mantenimiento de la actividad de Rotavirus cuando está asociado con la sal inorgánica;
- Posibilidad de liberación de Rotavirus de la asociación mediante disolución de la base inorgánica por un ácido;
- Posibilidad de coliofilización del antiácido y el Rotavirus.

15 **Asociación de  $\text{CaCO}_3$  y Rotavirus**

En el primer ensayo, Rotavirus liofilizado (titulación viral 5,7) se reconstituyó con una suspensión de  $\text{CaCO}_3$  en agua (50 mg en 1,5 ml); y después se centrifugó y la titulación viral del sobrenadante se comparó con el sedimento.

## ES 2 534 637 T3

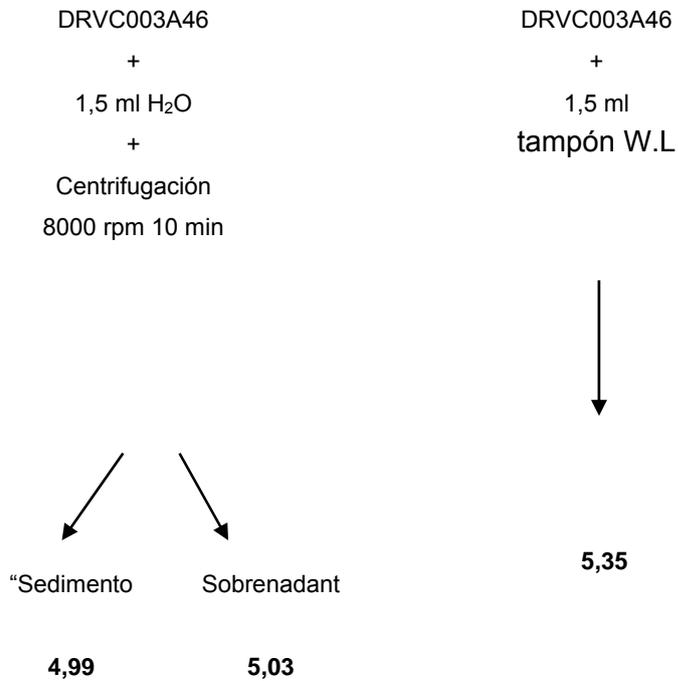


Esto indica que más del 90 % del Rotavirus está asociado a CaCO<sub>3</sub>.

También, cuando el virus estaba asociado, fue posible realizar la titulación y recuperar las cantidades virales originales.

También, las titulaciones virales son ligeramente mayores que las obtenidas sin CaCO<sub>3</sub>.

### 5 Cantidad de asociación de CaCO<sub>3</sub> y Rotavirus



Se reconstituyó Rotavirus con una suspensión de CaCO<sub>3</sub> en agua (1,5 ml):

10 mg

50 mg

100 mg

y después se centrifugó, y la titulación viral del sobrenadante se comparó con el sedimento.

Tabla 12

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

5 De este modo, está claro que más CaCO<sub>3</sub> y más virus se asocia, y se encuentra menos en el sobrenadante.

Sin embargo, la dosis total no se recupera completamente (se espera un total de 5,3 al menos o incluso 5,8 como se ha obtenido antes, véase anteriormente).

#### **Protección por CaCO<sub>3</sub> de Rotavirus durante titulación de antiácido Rossett-Rice en bebés**

10 Usando 10 dosis de Rotavirus liofilizado (DRVC003A46) y 50 mg de CaCO<sub>3</sub>, se llevaron a cabo dos tipos de titulación por Rossett-Rice en bebés:

En una titulación clásica por Rossett- Rice, el antiácido se mezcla con Rotavirus y se vierte HCl en este medio.

En la titulación Rossett-Rice en bebés "inversa", la situación es la inversa: se añade gota a gota antiácido en el conjunto de HCl (como se produce in vivo).

Tabla 13

Titulación clásica de Rossett-Rice en bebés			
Rotavirus liofilizado almacenado a:	Tampón	Titulación viral teórica	Titulación viral medida
4°C	60 mg de CaCO <sub>3</sub>	5,3	4,6
-80°C	60 mg de CaCO <sub>3</sub>	5,3	4,6
4°C	24 mg de Al(OH) <sub>3</sub>	5,4	<2,9
-80°C	24 mg de Al(OH) <sub>3</sub>	5,4	<2,9

15

Titulación inversa por Rossett-Rice en bebé			
Rotavirus liofilizado almacenado a:	Tampón	Titulación viral teórica	Titulación viral medida
4°C	60 mg de CaCO <sub>3</sub>	5,3	4,6
-80°C	60 mg de CaCO <sub>3</sub>	5,3	4,6
4°C	24 mg de Al(OH) <sub>3</sub>	5,4	<2,9
-80°C	24 mg de Al(OH) <sub>3</sub>	5,4	<2,9

De este modo, en este experimento *in vitro*, el carbonato de calcio es capaz de proteger aproximadamente 20 % de Rotavirus de la presencia de HCl, mientras el hidróxido de aluminio no es capaz de hacerlo.

5.9: Liofilización of Rotavirus en presencia del antiácido CaCO<sub>3</sub>:

Tabla 14

Nº de lote	Composición	Titulación viral en el momento = 0 después de la liofilización	Titulación viral después de la liofilización y 1 semana a 37°C
99K08/01	Sacarosa: 2 % Dextrano: 4 % Sorbitol: 3 % aminoácidos: 2 % CaCO <sub>3</sub> : 50 mg	10 <sup>5,28</sup>	10 <sup>5,10</sup>
99K08/02	Sacarosa: 2 % Dextrano: 4 % Sorbitol: 3 % Aminoácidos: 2 % CaCO <sub>3</sub> : 60 mg	10 <sup>5,16</sup>	10 <sup>5,15</sup>
00C24/01	Sacarosa: 2 % Dextrano: 4 % Sorbitol: 3 % Aminoácidos: 2 % CaCO <sub>3</sub> : 60 mg Xantano 0,3 %	10 <sup>5,07</sup>	10 <sup>4,69</sup>
00C24/03	Sacarosa: 2 % Dextrano: 4 % Sorbitol: 3 % Aminoácidos: 2 % CaCO <sub>3</sub> : 60 mg Xantano 0,3 %	10 <sup>5,07</sup>	10 <sup>4,85</sup>
00E09/25	Sacarosa: 2 % Dextrano: 4 % Sorbitol: 3 % Aminoácidos: 2 % CaCO <sub>3</sub> : 60 mg Xantano 0,25 %	10 <sup>5,03</sup>	10 <sup>4,91</sup>
00E09/30	Sacarosa: 2 %	10 <sup>5,01</sup>	10 <sup>4,87</sup>

	Dextrano: 4 % Sorbitol: 3 % Aminoácidos: 2 % CaCO <sub>3</sub> : 60 mg Xantano 0,30 %		
00F26/06	Sacarosa: 2 % Dextrano: 4 % Sorbitol: 3 % Aminoácidos: 2 % CaCO <sub>3</sub> : 60 mg Almidón: 2 %	10 <sup>4,50</sup>	10 <sup>4,70</sup>

Esta es la liofilización de "todo en uno" de Rotavirus y antiácido (CaCO<sub>3</sub>) juntos en el mismo vial. Para evitar la sedimentación de CaCO<sub>3</sub> durante la etapa de llenado, son necesarios agentes viscosos. Los ejemplos de tales agentes viscosos incluyen goma Xantano y almidón. La actividad de Rotavirus se mantiene incluso en la presencia de goma Xantano y almidón.

5

**5.10 Comprimidos liofilizados para la disgregación rápida cuando se colocan en la boca:**

Las siguientes formulaciones demuestran el concepto "lyoc". Es decir, la disolución rápida de la torta liofilizada en la boca.

Tabla 15

Nº de lote	Composición de formulación	Titulación viral antes de la liofilización	Titulación viral después de la liofilización y 1 semana a 37°C
99B10/06	Sacarosa 4 % glutamato de sodio 3,7 % <u>Al(OH)<sub>3</sub></u> 48 mg	10 <sup>5,11</sup>	10 <sup>4,53</sup>
99C11/12	Maltitol 3 % <u>Al(OH)<sub>3</sub></u> 48 mg hidroxipropilmetil celulosa: 1 %	10 <sup>4,16</sup>	10 <sup>3,79</sup>

Nº de lote	Composición de formulación	Titulación viral en el momento = 0 después de la liofilización	Titulación viral después de la liofilización y 1 semana a 37°C
00C24/05	Sacarosa: 2 % Dextrano: 4 % Sorbitol: 3 % Aminoácidos: 2 % CaCO <sub>3</sub> : 60 mg Xantano 0,3 %	10 <sup>5,02</sup>	10 <sup>4,54</sup>
00C24/06	Sacarosa: 2 % Dextrano: 4 % Sorbitol: 3 % Aminoácidos: 2 % CaCO <sub>3</sub> : 60 mg Xantano 0,3 %	10 <sup>4,86</sup>	10 <sup>4,56</sup>
00F26/11	Sacarosa: 1 % Dextrano: 2 % Sorbitol: 1,5 % Aminoácidos: 1 % CaCO <sub>3</sub> : 60 mg Almidón: 2 %	10 <sup>4,70</sup>	10 <sup>4,40</sup>

5 En el "concepto lyoc" se puede usar tanto Xantano como almidón (manteniendo las propiedades de disolución rápida de la torta liofilizada).

**Ejemplo 6: Uso de carbonato de calcio como el antiácido para la composición de vacuna de Rotavirus**

5 Cuando se usa una suspensión de  $\text{CaCO}_3$  en agua como el antiácido para el Rotavirus existe un problema porque las partículas de carbonato de calcio sedimentan rápidamente cuando se colocan en agua ya que el valor de la densidad de polvo se aproxima a 2,6 y el tamaño medio de partícula es 30  $\mu\text{m}$ . Esta sedimentación se puede ralentizar mediante:

- 1 incremento de la densidad del medio circundante
- 2 incremento de la viscosidad del medio circundante
- 3 reducción del tamaño de partícula
- 4 mantenimiento de las partículas separadas entre sí

10 **6.1: Incremento de la densidad del medio circundante:**

Cuando la suspensión en agua de  $\text{CaCO}_3$  (cuando se coloca en la jeringa) se coloca en la torta liofilizada (que contiene sacarosa 2 %, dextrano 4 %; sorbitol 3 %; aminoácidos 2 %) se incrementa la densidad del medio circundante pero la velocidad de sedimentación de  $\text{CaCO}_3$  no es muy diferente a la de la suspensión en agua de  $\text{CaCO}_3$ .

15 **6.2 Incremento de la viscosidad del medio circundante:**

**Excipientes pseudoplásticos**

Una solución pseudoplástica se define como una solución que tiene una viscosidad mayor en reposo cuando se compara con su viscosidad en agitación.

Los excipientes usuales de este tipo son:

20 **Polímeros naturales, por ejemplo:**

- goma arábica
- goma adragante
- agar-agar
- alginatos
- 25 pectinas

**Polímeros semisintéticos, por ejemplo:**

- carboximetilcelulosa (Tyloses C®)
- metilcelulosa (Methocels A®, Viscotrans MC®, Tylose MH® y MB®)
- hidroxipropilcelulosa (Klucels®)

30 **hidroxipropilmetilcelulosa (Methocels E® y K®, Viscontrans MPH®)**

En general dichos excipientes pseudoplásticos se usan junto con agentes tixotrópicos.

**Excipientes pseudoplásticos con baja capacidad de fluir**

35 Esos polímeros, a una concentración suficiente, dan lugar a una disposición de fluido estructural que da como resultado una solución de alta viscosidad que tiene capacidad de fluir baja en reposo. Una cierta cantidad de energía necesita proporcionarse al sistema para dejar que fluya y se transfiera. Son necesarias energías externas (agitación) para destruir temporalmente la disposición de fluido estructural con el fin de obtener una solución fluida.

Ejemplos de dichos polímeros son Carbopols ® y goma xantano.

**Excipientes tixotrópicos**

40 Con estos excipientes, en reposo, se obtiene una estructura de gel; mientras en agitación se obtiene una solución fluida.

Los ejemplos de excipientes tixotrópicos son: Veegum ® (silicato de magnesio y aluminio) y Avicel RC® (aproximadamente 89 % de celulosa microcristalina y 11 % de carboximetilcelulosa de Na).

6.3 Reducción del tamaño de partículas

Una reducción del tamaño de partículas de  $\text{CaCO}_3$  dio como resultado una disminución de la capacidad antiácido del compuesto.

6.4 Mantenimiento de la partículas separadas entre sí

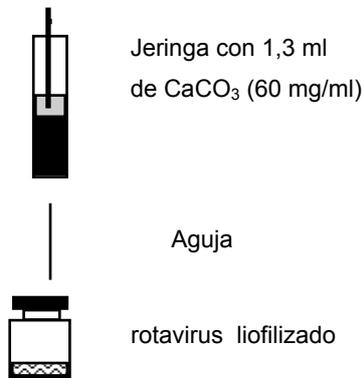
- 5 Este es el caso en Veegum® y Avicel® para los que partículas insolubles más pequeñas (aproximadamente  $1 \mu\text{m}$ ) que las partículas de  $\text{CaCO}_3$ , se colocan entre las partículas de  $\text{CaCO}_3$  con el fin de prevenir la agregación.

**Ejemplo 7: Diseño de producto**

Los siguientes esquemas demuestran los ejemplos de posibles diseños de producto.

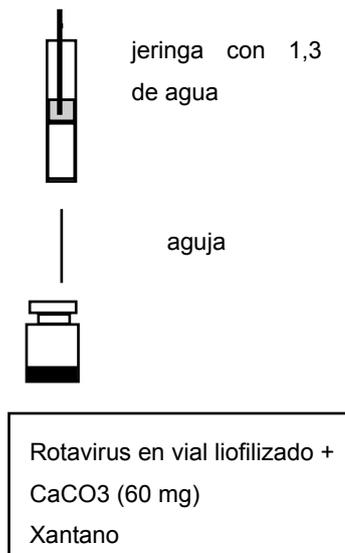
7. 1  $\text{CaCO}_3$  en la jeringa

- 10 Teniendo ya lotes clínicos de Rotavirus en viales liofilizados, el antiácido se puede colocar en el líquido reconstituyente contenido en la jeringa.



En esta presentación del producto, la sedimentación de  $\text{CaCO}_3$  debe estar bajo control no solamente durante las etapas de llenado, sino también durante la vida útil completa del producto (al menos 2 años).

- 15 7. 2  $\text{CaCO}_3$  en el vial liofilizado



**7.3. Liofilización en un blíster**

En este caso el Rotavirus,  $\text{CaCO}_3$  y goma Xantano se liofilizan juntos directamente en el blíster.



**Ejemplo 8: Liofilización de cepa diferente de Rotavirus**

Tabla 16

Nº de lote	Cepa de Rotavirus	Composición de formulación	Titulación viral en el momento = 0 después de la liofilización	Titulación viral después de la liofilización y 1 semana a 37 °C
00F26/01	G1 SB purif n°61 PRO/0232	Sacarosa: 2 % Dextrano: 4 % Sorbitol: 3 % Aminoácidos: 2 %	10 <sup>4.6</sup>	10 <sup>4.7</sup>
00F26/02	G2 (DS-1)	Sacarosa: 2 % Dextrano: 4 % Sorbitol: 3 % Aminoácidos: 2 %	10 <sup>4.4</sup>	10 <sup>4.4</sup>
00F26/03	G3(P)	Sacarosa: 2 % Dextrano: 4 % Sorbitol: 3 % Aminoácidos: 2 %	10 <sup>4.6</sup>	10 <sup>4.5</sup>
00F26/04	G4 (VA-70)	Sacarosa: 2 % Dextrano: 4 % Sorbitol: 3 % Aminoácidos: 2 %	10 <sup>4.8</sup>	10 <sup>4.8</sup>
00F26/05	G9 (W161)	Sacarosa: 2 % Dextrano: 4 % Sorbitol: 3 % Aminoácidos: 2 %	10 <sup>4.6</sup>	10 <sup>4.5</sup>

- 5 Las cepas DS-1, P y VA70 se describen como cepas de referencia de Rotavirus humanos para el serotipo G2, G3 y G4 respectivamente en la página 1361 de "Fields" Raven press 1990, segunda edición.

En este experimento se han liofilizado cepas de Rotavirus diferentes.

Para todas, se ha mostrado tanto que se ha mantenido la titulación viral durante la liofilización como la estabilidad acelerada (una semana a 37 °C).

- 10 **Ejemplo 9: Estudio de seguridad de fase I en adultos de una administración oral de la vacuna de Rotavirus.**

Se llevó a cabo un estudio de fase I para determinar la seguridad y reactogenicidad de una única dosis oral de 10<sup>6.0</sup> uff de la vacuna de P43 en adultos sanos de 18 a 45 años de edad.

El ensayo clínico era doble ciego y aleatorio. Estaba controlado por placebo y auto-contenido. El estudio se realizó en un único centro en Bélgica.

**9.1. Población de estudio**

5 Un total de 33 sujetos, 11 en el grupo placebo y 22 en el grupo de vacuna, se alistaron y todos completaron el estudio. Todos los voluntarios eran caucásicos. Su edad media en el momento de la vacunación era 35,3 años, con un intervalo de 18 a 44 años. El ensayo comenzó en enero y se desarrolló durante poco más de un mes.

**9.2. Material**

Vacuna

10 Se produjeron lotes clínicos de vacuna de P43, se purificaron, se formularon y se liofilizaron de acuerdo a las Buenas Prácticas de Fabricación. Los lotes fueron liberados por Control de calidad y Seguridad de Calidad. Cada vial de vacuna contenía los siguientes componentes:

Ingrediente activo:

Cepa P43      Min. 10<sup>5,8</sup> uff

Excipientes, estabilizantes:

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

15

Placebo

Se prepararon viales de placebo y se liberaron. Cada vial de placebo contenía los siguientes componentes:

Excipientes, estabilizantes:

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

Diluyente

20 Se usó agua para inyección como diluyente para reconstituir la vacuna y placebo.

**9.3. Administración**

Aproximadamente 10 a 15 minutos antes de la administración de la vacuna o del placebo, a los sujetos de ambos grupos se les administraron 10 ml de Mylanta® por vía oral. Mylanta® es un antiácido registrado. El antiácido incrementa el pH del estómago y evita la inactivación del Rotavirus durante su pase a través del estómago.

25 Para preparar la vacuna, dos viales de P43 liofilizado que contenía 10<sup>5,8</sup> uff por vial se reconstituyeron con 1,5 ml del diluyente agua para inyección. Esto logró una titulación viral calculada de 10<sup>6,1</sup> uff por dosis. La vacuna reconstituida se administró prontamente como una única dosis oral.

Para preparar el placebo, dos viales de placebo liofilizado se reconstituyeron con 1,5 ml de agua para inyección y se administró por vía oral como una única dosis.

30 **9.4. Seguridad y reactogenicidad**

Los siguientes criterios de seguridad y reactogenicidad se aplicaron.

Los síntomas generales inducidos fueron fiebre, diarrea, vómitos, nauseas, dolor abdominal y pérdida de apetito. Se

registraron durante ocho días después de la administración.

Los síntomas no inducidos se registraron durante 30 días después de la administración.

Los episodios adversos graves se registraron durante el período completo de estudio.

Las muestras de diarrea se recogieron durante ocho días después de la administración.

5 Los resultados fueron:

No se registraron síntomas inducidos, ni síntomas no inducidos ni episodios adversos graves durante los períodos de observación respectivos.

No se registraron casos de diarrea.

### 9.5. Conclusiones

10 La vacuna de P43 de SB Biologicals era segura con relación al placebo cuando se administraba por vía oral de una manera doble ciego como una única dosis a la dosis de  $10^{6,1}$  uff a voluntarios adultos sanos de 18 a 44 años de edad.

### Ejemplo 10 - Eficacia de dos dosis de una vacuna de Rotavirus monovalente humana, que contiene RIX 4414 en la prevención de gastroenteritis debida a Rotavirus G1 y no-G1 (G9)

15 **10.1. Procedimientos**

Un ensayo de fase II aleatorio, doble - ciego, controlado por placebo se llevó a cabo en Latinoamérica para evaluar la eficacia protectora de una vacuna (cepa de Rotavirus humano RIX4414) derivada de la cepa humana 89-12 de G1P[8] para inmunización de niños. La vacuna RIX4414 comprende como componente de Rotavirus la cepa humana atenuada de G1P[8] depositada como ECACC depósito 99081301 (documento WO 01/12797).

20 Composición de vacuna (Tabla 17)

La vacuna de HRV o placebo se preparó para administración mediante la inyección del contenido entero de una jeringa llenada previamente que contenía el tampón de carbonato cálcico en el vial del producto liofilizado (vacuna o placebo). El vial se agitó para resuspender la vacuna/placebo. El volumen entero del producto resuspendido se recogió en la misma jeringa, la aguja se desechó y el producto resuspendido se administró prontamente como una  
25 única dosis oral (aproximadamente 1,0 ml).

**Tabla 17 - Composición de vacuna de Rotavirus RIX4414**

Ingredientes		Cantidad (por dosis nominal: 1 ml)
<b>Ingrediente activo</b>		
RIX4414		$10^{5,8}$ uff/dosis
<b>Excipientes</b>		
Vacuna liofilizada en vial de vidrio	Sacarosa	9 mg
	Dextrano	18 mg
	Sorbitol	13,5 mg
	Aminoácidos	9 mg
	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)	2,25 mg
<b>Diluyente líquido (basado en <math>\text{CaCO}_3</math>) en la jeringa llenada previamente</b>		
	Carbonato de calcio	60 mg
	Xantano	2,5 mg
	Agua para inyecciones	c. s. para 1 ml

Administración de vacunas

5 Niños sanos (493) recibieron dos dosis de la vacuna de Rotavirus RIX4414 a una concentración viral de  $10^{5.8}$  uff por dosis, o placebo (504) a una edad de 2 y 4 meses, simultáneamente con vacunas DTPw-HBV y Hib. Se proporcionaron tres dosis de OPV (vacuna de virus del polio oral) con una separación de 2 semanas de la vacuna de estudio, es decir, no se administraron durante el período que comienza 2 semanas antes de cada dosis de vacuna de estudio y que termina 2 semanas después. Otros dos grupos recibieron 2 dosis de la vacuna de Rotavirus RIX4414 a diferentes concentraciones virales:  $10^{4.7}$  uff y  $10^{5.2}$  uff. Se ensayaron muestras de diarrea para determinar la presencia de Rotavirus (ELISA) y se determinaron los serotipos en muestras positivas (RT-PCR). Los episodios de diarrea reseñados a partir de dos semanas después de la segunda dosis se consideraron para el análisis de eficacia. La gravedad se determinó usando una escala de 20 puntos (Ruuska y Vesikari, 1990). El sistema de puntuación de 20 puntos usado para determinar la gravedad de cada episodio de diarrea en este estudio se muestra más adelante en la tabla 18. Una puntuación  $\geq 11$  definía una enfermedad grave.

**Tabla 18**

<b>Experiencia adversa</b>	<b>Puntos</b>
<b>Duración de deposiciones más sueltas que lo normal (días)</b>	
1 - 4	1
5	2
$\geq 6$	3
<b>Número máximo de deposiciones más sueltas que lo normal/24 horas</b>	
1 - 3	1
4 - 5	2
$\geq 6$	3
<b>Duración de vómitos (días)</b>	
1	1
2	2
$\geq 3$	3
<b>Número máximo de episodios de vómitos/24 horas</b>	
1	1
<b>2 - 4</b>	2
$\geq 5$	3
<b>Fiebre (medida por vía rectal/vía axilar)*</b>	
37,1 - 38,4 °C/36,6 - 37,9 °C	1
38,5 - 38,9 °C/38,0 - 38,4 °C	2
$\geq 39$ °C/ $\geq 38,5$ °C	3
<b>Tratamiento</b>	
Rehidratación	1
Hospitalización	2
<b>Deshidratación</b>	
1 - 5 %	2

$\geq 6 \%$ * Se puntuó la temperatura más alta registrada durante el episodio.	3
--	---

## 10.2. Resultados

Se realizó un análisis provisional de eficacia sobre el grupo anteriormente mencionado y los serotipos aislados eran principalmente G1 y G9, distribuidos de manera casi equitativa. La velocidad de ataque global en el grupo placebo variaba entre 4,8 % para G1 a 3,6 % para G9 durante el período de 6 meses de observación. Dos dosis de vacuna de Rotavirus RIX4414 a  $10^{5,8}$  uff protegían contra todos los tipos de diarrea provocada por G1 con 83 % de eficacia [IC del 95 %: 50,4 - 95,7] y 92,1 % de eficacia [IC del 95 %: 47,6 - 99,8] contra gastroenteritis grave. Si la diarrea estaba provocada por G9, la protección contra todos los tipos de diarrea era 60,2 % [IC del 95 %: 0,2 - 86,0] y 80,8 % [IC del 95 %: 33,0 - 96,4] contra gastroenteritis grave. Para cada uno de estos puntos finales de eficacia (cualquiera y grave para G1 y G9), había una disminución estadísticamente significativa en los episodios de diarrea en el grupo HRV comparado con el grupo placebo ( $p < 0,05$ , Prueba exacta de Fisher de dos colas).

Los resultados obtenidos en los otros dos grupos de vacuna (concentración de Rotavirus diferente) son consistentes con los reseñados en el Ejemplo, y se presentan en el análisis final (Ejemplo 11). También se analizaron los datos de eficacia para G2, G3 y G4. No se extrajo ninguna conclusión de este estudio sobre protección cruzada de G2, G3 y G4 ya que se reseñaron muy pocos casos. Sin embargo los datos de eficacia contra G2, G3 y G4 se presentan en el análisis final en un tamaño de muestra más importante (Ejemplo 11).

## 10.3. Conclusión.

Estos resultados apoyan en gran medida la eficacia de dos dosis de una vacuna de HRV monovalente, la vacuna de Rotavirus RIX4414 en la protección de niños jóvenes contra la cepa G1 y protección cruzada contra la cepa G9.

### 20 **Ejemplo 11 - Eficacia de dos dosis de una vacuna de Rotavirus monovalente humana, que contiene la cepa RIX4414, administrada a tres concentraciones de virus diferentes en la prevención de gastroenteritis debido a Rotavirus G1 y no- G1 (G2, G3, G4, G9)**

#### 11.1. Procedimientos

Un ensayo de fase II aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo se llevó a cabo en Latinoamérica para evaluar la eficacia protectora y eficacia contra la hospitalización de una vacuna derivada de la cepa humana 89-12 de G1P[8] para inmunización de niños. Específicamente la vacuna usada se llamó vacuna de Rotavirus RIX4414, y comprende como componente de Rotavirus la cepa humana atenuada de G1 depositada como ECACC depósito 99081301.

Niños sanos recibieron dos dosis de vacuna de Rotavirus RIX4414 a tres concentraciones de virus diferentes. La cohorte para análisis de eficacia constaba de 1846 sujetos (468 sujetos en el grupo de vacuna de HRV de  $10^{4,7}$  uff, 460 sujetos en el grupo de vacuna de HRV de  $10^{5,2}$  uff, 464 sujetos en el grupo de vacuna de HRV de  $10^{5,8}$  uff y 454 en el grupo placebo a la edad de 2 y 4 meses, simultáneamente con vacunas DTPw-HBV y Hib. Se proporcionaron tres dosis de OPV con una separación de 2 semanas de la vacuna de estudio, es decir, no se administraron durante el período que comienza 2 semanas antes de cada dosis de vacuna de estudio y que termina 2 semanas después. Se ensayaron muestras de diarrea para determinar la presencia de Rotavirus (ELISA) y se determinaron los serotipos en muestras positivas (RT-PCR). Los episodios de diarrea reseñados a partir de dos semanas después de la segunda dosis hasta que los sujetos alcanzaban un año de edad se consideraron para el análisis de eficacia. La gravedad se determinó usando una escala de 20 puntos (Ruuska and Vesikari, 1990). Una puntuación  $\geq 11$  definía una enfermedad grave (véase el ejemplo 10 para la descripción del sistema de puntuación de 20 puntos).

#### 40 **11.2. Resultados**

Los resultados que son el análisis final de los datos mencionados en el Ejemplo 10 se ilustran en las tablas más adelante. Los niños en los grupos de vacuna tenían significativamente menos episodios de gastroenteritis por Rotavirus que los niños en el grupo placebo ( $p < 0,001$ , Prueba exacta de Fisher de dos colas) (Tabla 19). Dependiendo de la dosificación, la eficacia protectora contra gastroenteritis por Rotavirus grave alcanzaba el 85,6 % (IC del 95 %: 63,0 % - 95,6 %), y 70 % (IC del 95 %, 45,7 % - 84,4 %) contra cualquier gastroenteritis de Rotavirus (Tabla 20). Para cada uno de estos puntos finales de eficacia, existía una disminución estadísticamente significativa en episodios de diarrea en el grupo de HRV comparado con el grupo placebo ( $p < 0,001$ , Prueba exacta de Fisher de dos colas). Se identificaron múltiples serotipos de Rotavirus (G1, G2, G3, G4 y G9) a partir de deposiciones de gastroenteritis (ELISA y RT-PCR) permitiendo calcular también la eficacia de vacuna contra serotipos no- G1. Como se puede ver a partir de la tabla 21 en particular, para los serotipos no- G1 (G2, G3, G4 y G9), y dependiendo de la dosificación, la eficacia contra gastroenteritis por Rotavirus grave alcanzó el 82,7 % (IC del 95 %: 40,3 % - 96,8 %), proporcionando la prueba del concepto de que la vacuna monovalente de Rotavirus humano de G1P1A P[8] basado en G1 induce protección cruzada contra cepas heterotípicas (es decir, no- G1 y no- P[8]).

**Tabla 19: Características de episodios de gastroenteritis por Rotavirus reseñados durante el estudio**

		RIX4414 10 <sup>4,7</sup> uff	RIX4414 10 <sup>5,2</sup> uff	RIX4414 10 <sup>5,8</sup> uff	Placebo
<b>Cualquier gastroenteritis por Rotavirus</b>					
		21	22	15	51
<b>nº de episodios (por ciento) con característica específica entre todos los episodios de gastroenteritis por Rotavirus reseñados</b>					
<b>Puntuaciones de gravedad</b>	< 7	4 (19,0)	8 (36,4)	2 (13,3)	5 (9,8)
	7 - 10	5 (23,8)	4 (18,2)	8 (53,3)	12 (23,5)
	≥ 11	12 (57,1)	10 (45,5)	5 (33,3)	34 (66,7)
<b>Serotipos de Rotavirus identificados</b>					
	G1 salvaje	12 (57,1)	6 (27,3)	7 (46,7)	30 (58,8)
	G2	0	0	1 (6,7)	3 (5,9)
	G3	1 (4,8)	0	0	2 (3,9)
	G4	0	0	1 (6,7)	0
	G9	8 (38,1)	14 (63,6)	7 (46,7)	15 (29,4)
	Canino	0	0	0	1(2,0)
	Desconocido	0	2 (9,1)	0	0

**Tabla 20: Eficacia protectora de dos dosis de vacuna de Rotavirus humano RIX4414 contra gastroenteritis por Rotavirus**

	N	Cualquier gastroenteritis por Rotavirus		Gastroenteritis por Rotavirus grave		Hospitalización por Gastroenteritis por Rotavirus	
		n (%)	Eficacia (IC del 95 %)	n (%)	Eficacia (IC del 95 %)	n (%)	Eficacia (IC del 95 %)
Grupos de vacuna reunidos	1392	58 (4,2)*	61,4 (42,3; 4,1)	27 (1,9)*	74,1 (55,8; 85,0)	9 (0,6) *	79,0 (48,0;92,0)
RIX4414 10 <sup>5,8</sup> uff	464	15 (3,2)*	70,0 (45,7; 84,4)	5 (1,1)*	85,6 (63,0; 95,6)	3 (0,6)‡	79,0 (24,9; 96,1)
RIX4414 10 <sup>5,2</sup> uff	460	22 (4,8)*	55,7 (25,3;74,5)	10 (2,2)*	71,0 (39,9; 87,2)	1 (0,2)*	93,0 (53,7; 99,8)
RIX4414 10 <sup>4,7</sup> uff	468	21 (4,5)*	58,4 (29,4;76,3)	12 (2,6)*	65,8 (32,2;83,9)	5 (1,1)†	65,4 (-1,8; 90,2)

Placebo	454	49 (10,8)	-	34 (7,5)	-	14 (3,1)	-
---------	-----	--------------	---	----------	---	----------	---

\*p < 0,001 para cada comparación entre los grupos de vacuna y de placebo mediante Prueba exacta de Fisher de dos colas (nivel de significación de  $\alpha = 0,05$ )

†p = 0,037 para la comparación entre los grupos de vacuna y de placebo mediante Prueba exacta de Fisher de dos colas (nivel de significación de  $\alpha = 0,05$ )

5 ‡p = 0,007 para la comparación entre los grupos de vacuna y de placebo mediante Prueba exacta de Fisher de dos colas (nivel de significación de  $\alpha = 0,05$ )

N = número de sujetos

n/% = número/porcentaje de sujetos que presentan al menos un episodio de gastroenteritis por Rotavirus especificado

10 Se muestran intervalos de confianza al 95 % exactos

**Tabla 21: Eficacia protectora de dos dosis de vacuna de Rotavirus humano RIX4414 contra gastroenteritis grave por Rotavirus específica de serotipo**

	Gastroenteritis por Rotavirus grave			
	N	n(%)	Eficacia (IC del 95 %)	valor de p*
<b>Rotavirus de tipo salvaje G1</b>				
Grupos de vacuna reunidos	1392	13 (0,9)	73,5 (41,2;88,3)	< 0,001
RIX4414 10 <sup>5,8</sup> uff	464	2 (0,4)	87,8 (48,0;98,6)	< 0,001
RIX4414 10 <sup>5,2</sup> uff	460	4 (0,9)	75,3 (23,5; 94,0)	0,006
RIX4414 10 <sup>4,7</sup> uff	468	7 (1,5)	57,6 (-9,0; 85,2)	0,057
Placebo	454	16 (3,5)	-	-
<b>Rotavirus No- G1 (principalmente G9 con tipos G2, G3 y G4)</b>				
Grupos de vacuna reunidos	1392	14 (1,0)	73,1 (42,1; 87,7)	< 0,001
RIX4414 10 <sup>5,8</sup> uff	464	3 (0,6)	82,7 (40,3; 96,8)	0,001
RIX4414 10 <sup>5,2</sup> uff	460	6 (1,3)	65,2 (7,4; 88,8)	0,020
RIX4414 10 <sup>4,7</sup> uff	468	5 (1,1)	71,5 (19,4; 91,8)	0,009
Placebo	454	17 (3,7)	-	-

\*Prueba exacta de Fisher de dos vías (nivel de significación de  $\alpha = 0,05$ ) usado para cada comparación entre los grupos de vacuna y de placebo.

N = número de sujetos

n/% = número/porcentaje de sujetos que presentan al menos un episodio de gastroenteritis grave por Rotavirus especificado

Se muestran intervalos de confianza al 95 % exactos

### 11.3. Conclusión

15 Estos resultados apoyan en gran medida la eficacia de 2 dosis de una vacuna monovalente de HRV que contiene RIX4414, en la protección de niños jóvenes contra cualquier gastroenteritis por Rotavirus y gastroenteritis por Rotavirus grave provocadas por la cepa G1 y protección cruzada contra otros tipos G de RV, a saber G2, G3, G4 y G9.

20 **Ejemplo 12 - Dos dosis de la vacuna de Rotavirus atenuado humano RIX4414 muestran protección heterotípica en Latinoamérica y Europa**

La eficacia de una vacuna de Rotavirus (RV) humano G1P[8] atenuado, oral de dos dosis, vivo que contenía la cepa RIX 4414 se analizó en ensayos clínicos de fase II/III en niños finlandeses y latino americanos. La vacuna de Rotavirus RIX 4414 comprende como el componente de Rotavirus la cepa humana G1 atenuada depositada como ECACC depósito 99081301.

5 **12.1. Procedimientos**

Parte de los resultados del Ejemplo 12 se ha presentado ya en los Ejemplos 10 y 11. Se reunieron los datos de los estudios de fase II, uno en Finlandia y uno en Latinoamérica (Brasil, México y Venezuela) (Ejemplos 10 y 11) y a partir de un estudio de fase III en 11 países de Latinoamérica (Ejemplo 13) usando la misma metodología y criterios de eficacia. En total, 20081 niños sanos (cohorte para eficacia) vacunados con 2 dosis de vacuna RIX 4414 o placebo a los 2 y 4 meses de edad se siguieron hasta un año de edad para evaluar la gastroenteritis (GE) grave con una puntuación en la escala de gravedad Vesikari (Ruuska T y col., Scand. J. Infect. Dis. 1990, 22, 259 - 267)  $\geq$  11. Muestras de GE se ensayaron para evaluar Rotavirus (por ELISA) y se determinó el tipo por RT-PCR.

Un análisis meta se llevó a cabo en los tres estudios mencionados. La eficacia reunida para GE por RV grave (definida como puntuación de gravedad de Vesikari  $\geq$  11) se calculó a partir de 2 semanas después de la dosis 2 hasta 1 año de edad (ajuste para el efecto de estudio usando la aproximación de Mantel- Haenszel).

15 **12.2. Resultados**

En la cohorte para determinar la eficacia se detectaron 5 episodios graves de GE por RV de tipo G2P[4] con una puntuación de Vesikari  $\geq$  11 en el grupo de vacuna y 13 episodios en el grupo de placebo. La eficacia de la vacuna contra el tipo G2P[4] era 67,2 % (IC del 95 %: 14,8; 87,1), que muestra que además de proteger contra cepas homotípicas (G1P[8], G3P[8] y G4P[8]), la vacuna RIX4414 protege contra GE por Rotavirus grave provocada por la cepa de G2P[4] no- P[8] no-G1 heterotípica.

La eficacia específica del tipo a través de los diferentes estudios se proporciona a continuación (Tabla 22).

**Tabla 22**

Cepa	Número de casos de RV graves		% de eficacia de vacuna * (VE) (IC del 95 %)
	N vacunas (N = 10646)	N Placebo (N = 9435)	
G1	17	52	83,7 (70,0; 91,2)
G2P[4]	5	13	67,2 (14,8; 87,1)
G3	2	8	82,7 (5,9; 96,8)
G9	15	34	79,5 (59,2; 89,7)
*VE ajustado para el efecto de estudio usando aproximación de Mantel- Haenszel			

25 Solamente 3 casos G4 se produjeron en los 3 ensayos, 1 en los receptores de vacuna y 2 en los receptores de placebo.

**12.3. Conclusión**

30 Este análisis muestra que, además de proporcionar, un alto nivel de protección contra las cepas de Rotavirus G1 homólogas (que tienen dos proteínas de cápside externas (VP4 y VP7) y una proteína de cápside interna (VP6) antigénicamente similar a la vacuna), la vacuna RIX 4414 es también altamente protectora contra otras cepas que tienen o bien un tipo G diferente (por ejemplo, G3, G9), un tipo P diferente (por ejemplo, P[4]), o tanto tipo G como tipo P diferentes, como se ilustra por la eficacia contra G2P[4].

**Ejemplo 13 – Análisis meta que muestra que dos dosis de la vacuna de Rotavirus atenuado humano RIX 4414 muestran protección heterotípica**

35 A medida que más datos se hicieron disponibles de Singapur y de un estudio europeo (Ejemplo 15), se llevó a cabo un análisis meta adicional para incluir estos estudios además de los estudios mencionados en el Ejemplo 12.

**13.1. Procedimientos**

Tres estudios de fase II (Finlandia y Latinoamérica y Singapur) y dos de fase III (Latinoamérica y Europa) se incluyeron en el metaanálisis. Se administraron dos dosis orales de acuerdo con el programa de 0,1 a 2 meses a niños sanos que tenían 6 -14 semanas de edad a la Dosis 1. En todos los estudios, se definió GE por RV grave como una puntuación  $\geq 11$  en la escala de Vesikari de 20 puntos. Se analizaron muestras de diarrea para determinar la presencia de RV por ELISA y se determinó el tipo mediante el procedimiento basado en RT-PCR. La eficacia contra cualquier GE por RV se evaluó en los tres estudios de fase II y el estudio de Europa de fase III solamente como en el estudio de Latinoamérica de fase III, solamente se registraron GE por RV grave.

VE y su IC del 95 % se estimó como una tasa 1 de la GE por RV con relación al placebo usando la relación de tasas de Poisson exacta estratificada por estudio (Proc StatXact4 for SAS Users, 1999, cytel software corporation, exact Confidence Interval for common relative risk, p 298)

**13.2. Resultados**

En un total de 8.221 niños vacunados con dos dosis de RIX4414 o placebo, se detectaron 4 episodios de cualquier GE por RV de G2P[4] en el grupo de RIX4414 (N = 5.783) y 9 episodios en el placebo (N = 2.438), indicando una VE de 81,0 % (IC del 95 %: 31,6; 95,8) contra GE por RV de cualquier gravedad debido a la cepa G2P[4].

En un total de 26.088 niños sanos vacunados con dos dosis de RIX4414 o placebo, se detectaron 6 episodios de GE por RV grave debido al tipo G2P[4] en el grupo RIX4414 (N = 14.792) y 15 episodios en el placebo (N = 11.296), indicando una VE de 71,4 % (IC del 95 %: 20,1; 91,1) contra GE por RV grave debido a la cepa G2P[4]. Los resultados se reseñan en la tabla 23.

**Tabla 23 - Número de sujetos que presentan cualquier episodio o grave de GE por RV provocado por el tipo de RV G2P[4] y el porcentaje de eficacia de vacuna durante el primer período de eficacia - (análisis meta), cohorte para eficacia**

**Tabla 23**

Grupos	Cualquier GE por RV * (excluida Latinoamérica)				GE por RV grave (puntuación $\geq 11$ en la escala de Vesikari) (5 estudios)				
	N	n	%	Eficacia de vacuna	N	n	%	Eficacia de vacuna	
Cepa de RV				% VE IC del 95 %				% VE IC del 95 %	
<b>G2P[4]</b>									
Vacuna de VRH	5783	4	0,07	<b>81,0</b> 31,6 - 95,8	14792	6	0,04	<b>71,4</b> 20,1 - 91,1	
Placebo	2438	9	0,37		11296	15	0,13		

N = número de sujetos incluido en cada grupo;  
n/% = número/porcentaje de sujetos que presentan al menos un episodio de GE de G2P[4] por RV especificado en cada grupo;  
% VE = eficacia de vacuna observada,  
IC del 95 % = Intervalos de confianza al 95 %  
\* Dos de 13 G2 no eran del tipo P

**13.3. Conclusión:**

Este metaanálisis sobre la eficacia de vacuna contra el tipo de RV G2P[4] muestra una eficacia de vacuna de 81,0 % (IC del 95 %: 31,6 %; 95,8 %) contra cualquier GE por RV debida al tipo G2P[4] y una eficacia de vacuna de 71,4 % (IC del 95 %: 20,1 %; 91,1 %) contra GE por RV grave debida al tipo G2P[4].

**Ejemplo 14 - Eficacia de vacuna de Rotavirus atenuado humano Rotarix™ en un ensayo de fase III de múltiples países**

**14.1. Procedimientos**

20.169 niños sanos de 11 países de Latinoamérica recibieron dos dosis orales de vacuna de HRV (10.159) o placebo (10.010) a aproximadamente 2 y 4 meses de edad. Se ensayaron muestras de deposiciones para determinar Rotavirus (RV) por ELISA y se determinó el tipo por RT-PCR usando cebadores adecuados y sondas específicas del tipo. La definición de caso clínico para captura de episodios de gastroenteritis grave era un episodio de diarrea (pase de tres o más deposiciones acuosas o más sueltas de lo normal en 24 horas) con o sin vómitos que requirieron hospitalización durante toda la noche y/o terapia de rehidratación equivalente al plan B de OMS (terapia de rehidratación oral) o plan C de la OMS (terapia de rehidratación intravenosa) en una instalación médica tal como un hospital, clínica o centro de cuidado de salud rural supervisado ([http://www.who.int/child-adolescent-health/New\\_Publications/CHILDHEALTH/textrev4.htm](http://www.who.int/child-adolescent-health/New_Publications/CHILDHEALTH/textrev4.htm)). La gravedad de la enfermedad se clasificó usando la escala de Vesikari de 20 puntos; la GE por RV grave se definió como una puntuación >11. La puntuación de Vesikari se modificó: ya que la deshidratación no se registró en el CRDe, se aplicó la siguiente regla: un sujeto que tenía un episodio de GE grave se consideró que estaba deshidratado entre 1 y 5 % si este sujeto recibía rehidratación oral. Un sujeto se consideró que estaba deshidratado > 6 % si se hospitalizaba al sujeto y/o recibía rehidratación intravenosa (IV).

**14.2. Eficacia de la vacuna**

Eficacia de la vacuna contra gastroenteritis por Rotavirus grave (Tabla 24)

La cohorte para eficacia constaba de 9.009 sujetos vacunados con vacuna de y 8.858 sujetos que recibían un receptor de placebo. Habían 12 niños con gastroenteritis por Rotavirus grave de acuerdo con la definición clínica en la vacuna y 77 en el grupo placebo (2,0 vs. 13,3 niños con ≥1 episodio por 1.000 niños-años, respectivamente; p < 0,001, Prueba exacta de Fisher de dos colas), dando como resultado una eficacia de vacuna del 84,7 % contra gastroenteritis por Rotavirus grave a partir de 15 días después de la dosis 2 hasta un año de edad (mostrado en la tabla 24). Resultados similares se obtuvieron con la cohorte vacunada total (eficacia de vacuna de 81,1 %; IC del 95 % 68,5 - 89,3; p < 0,001, Prueba exacta de Fisher de dos colas) desde la dosis 1 hasta un año de edad. Se requirió hospitalización durante al menos una noche en 9 niños en el grupo de la vacuna y 59 en el de placebo (1,5 vs. 10,2 hospitalizaciones 1.000 niños-años, respectivamente), para una eficacia de vacuna contra la hospitalización de gastroenteritis por Rotavirus grave de 85 % (p < 0,001, Prueba exacta de Fisher de dos colas) (Tabla 24).

**Tabla 24 - Eficacia de vacunas contra gastroenteritis grave por Rotavirus, gastroenteritis grave de tipos G de Rotavirus específica y gastroenteritis graves de todas las causas, durante el período desde dos semanas después de la dosis 2 hasta un año de edad**

	grupo de vacuna (N = 9.009)		Grupo de placebo (N = 8.858)		RR	Eficacia de vacuna (IC del 95 %) y valores p
	n	relación 1000 niños - año	n	relación 1000 niños - año		
<b>Gastroenteritis por Rotavirus grave de acuerdo con la definición de caso clínico*</b>						
<b>Gastroenteritis por Rotavirus</b>						
Grave	12	2,0	77	13,3	0,153	84,7 (71,7; 92,4) <0,001
Hospitalización	9	1,5	59	10,2	0,150	85,0 (69,6; 93,5) <0,001
<b>Gastroenteritis por todas las causas</b>						

	grupo de vacuna (N = 9.009)		Grupo de placebo (N = 8.858)		RR	Eficacia de vacuna (IC del 95 %) y valores p
	n	relación 1000 niños - año	n	relación 1000 niños - año		
Grave	183	30,9	300	51,7	0,600	40,0 (27,7; 50,4) <0,001
Hospitalización	145	24,5	246	42,4	0,580	42,0 (28,6; 53,1) <0,001
<b>Gastroenteritis específica de tipo</b>						
G1P[8]#	3 <sup>a</sup>	0,5	36 <sup>b</sup>	6,2	0,082	91,8 (74,1; 98,4) <0,001
G3P[8], G4P[8], G9P[8]	4 <sup>c</sup>	0,66	31 <sup>d</sup>	5,3	0,126	87,3 (64,1;96,7) <0,001
G2P[4]	6	1,0	10 <sup>e</sup>	1,7	0,590	41,0 (-79,2; 82,4) 0,328
<b>Gastroenteritis grave por Rotavirus con una puntuación ≥ 11 en la escala de Vesikari</b>						
Grupo de vacuna (N= 9.009)	Grupo de placebo (N= 8.858)		RR		Eficacia de la vacuna (IC del 95 %) y valores p	
n	Proporción 1.000 lactantes-año		n	Proporción 1.000 lactantes-año		
<b>Gastroenteritis específica de tipo</b>						
G1P[8]#	3	0,5	32	5,5	0,092	90,8 (70,5;98,2) <0,001
G3P[8], G4P[8], G9P[8]	4	0,66	30	5,2	0,130	86,9 (62,8;96,6) <0,001
G2P[4]	5	0,8	9	1,5	0,546	45,4 (-81,5;85,6) 0,298

Leyenda para la tabla 24:

Se contaron participantes con episodios con más de un tipo aislado G en cada una de las categorías de tipo de Rotavirus detectado.

n = número de niños que presentan al menos un episodio especificado

RR = Riesgo Relativo = relación de la tasa de incidencia de sujetos que presentan al menos un episodio en el grupo de vacuna sobre la tasa de incidencia de sujetos que presentan al menos un episodio en el grupo de placebo.

CI = intervalo de confianza

5 La relación 1000-niños año es el número de niños que presentan con  $\geq 1$  episodio especificado por niño -año

\* Definición de caso de acuerdo con el protocolo de estudio: un episodio de diarrea (pase de tres o más deposiciones acuosas o más sueltas de lo normal en un día) con o sin vómitos que requiriera hospitalización durante toda la noche y/o terapia de rehidratación equivalente al plan B de OMS (terapia de rehidratación oral) o plan C de OMS (terapia de rehidratación intravenosa) en una instalación médica tal como un hospital, clínica o centro de cuidado de salud rural supervisado

# Todos los tipos G1 aislados eran de Rotavirus de tipo salvaje; G1P[8] y G9P[8] se aislaron de un niño

<sup>a</sup> El tipo G1P[8] solo se aisló de 2 niños; G1P[8] y G9P[8] se aislaron de un niño

<sup>b</sup> el tipo G1P[8] solo se aisló de 34 niños; G1P[8] y G9P[8] se aislaron de un niño; los tipos G1, G2, G9 se aislaron de un niño

15 <sup>c</sup> el tipo G3P[8] solo se aisló de un niño, el tipo G4P[8] solo de 1 niño; y G9P[8] solo de un niño; G1P[8] y G9P[8] se aislaron de un niño

<sup>d</sup> el tipo G3P[8] solo se aisló de 8 niños, el tipo G4P[8] solo de 2 niños; y G9P[8] solo de 19 niños; G1P[8] y G9P[8] se aislaron de un niño; y G1P[8] y G2P[4] y G9P[8] de 1 niño;

<sup>e</sup> G2P[4] solo se aisló de 9 niños y G1P[8], G2P[4] y G9P[8] se aislaron de un niño;

20 los valores de p = Prueba exacta de Fisher de dos colas (nivel de significación de  $\alpha = 0,05$ )

#### Eficacia de la vacuna de acuerdo con la puntuación de Vesikari

Once de 12 niños con episodios de Rotavirus graves en el grupo de vacuna y 71 de 77 en el grupo de placebo tenían una puntuación de Vesikari  $\geq 11$ , dando como resultado una eficacia de vacuna de 84,7 % ( $P < 0,001$ , Prueba exacta de Fisher de dos colas). Para un incremento de la gravedad de la enfermedad con puntuaciones entre 11 y 20, la eficacia de la vacuna se incrementaba más, alcanzando 100 % contra gastroenteritis por Rotavirus más grave. Un total de 16 episodios de gastroenteritis por Rotavirus grave con una puntuación de Vesikari  $\geq 11$  se reseñaron entre la dosis 1 hasta la dosis 2, seis en el grupo de vacuna y 10 en el placebo.

#### Eficacia de la vacuna de acuerdo con la puntuación de Vesikari por tipo de Rotavirus

La eficacia de vacuna específica del tipo contra las cepas de tipo salvaje se muestra en la tabla 24. La eficacia de la vacuna contra episodios de Rotavirus graves con una puntuación de Vesikari  $\geq 11$  provocados por cepas de tipo G1P[8], homólogas a la cepa de vacuna, era 91,8 % ( $P < 0,001$ , Prueba exacta de Fisher de dos colas). La eficacia de la vacuna contra las cepas que comparten el antígeno P[8] (G3P[8], G4P[8] y G9P[8]) era 86,9 % ( $P < 0,001$ , Prueba exacta de Fisher de dos colas). El tipo de Rotavirus G2P[4], que no comparte ni el antígeno G ni el P con la cepa de vacuna se detectó en cinco episodios en el grupo de la vacuna y nueve en el de placebo, dando como resultado una eficacia de 45 por ciento ( $P = 0,298$ , Prueba exacta de Fisher de dos colas). Debido al pequeño número de episodios de G2 observados en este estudio, se realizó un análisis meta de 5 estudios (Ejemplo 13) y la tendencia observada en este estudio llegaba a tener un valor significativo cuando los resultados de los 5 estudios se reunían (Ejemplo 13)

#### Eficacia de vacuna sobre la carga de enfermedad de diarrea

40 Niños con gastroenteritis de cualquier causa que requiere hospitalización y/o rehidratación de acuerdo con el plan B/C de OMS tenían una tasa de incidencia de 30,9/1.000 niños-años en el grupo de la vacuna comparado con 51,7 en el placebo, para una reducción global de 40 % ( $P < 0,001$ , Prueba exacta de Fisher de dos colas) en episodios de diarrea grave de toda causa entre receptores de vacunas. Del mismo modo, la hospitalización por diarrea de cualquier etiología se reducía significativamente en un 42 % ( $P < 0,001$ , Prueba exacta de Fisher de dos colas)

45 (Tabla 24, todas GE de todas las causas).

### 14.3. Resumen de resultados

La eficacia de vacuna contra gastroenteritis por Rotavirus grave (RV GE) y contra la hospitalización asociada a Rotavirus era 85 % ( $P < 0,001$ , Prueba exacta de Fisher de dos colas), alcanzando 100 % en una población que tiene RV GE con una puntuación de Vesikari  $\geq 19$ . La eficacia contra G1P[8] y cepas que comparten solamente el epítipo P[8] con HRV era 92 % (IC del 95 % 74,98) y 87 % (IC del 95 % 64,97) respectivamente ( $P < 0,001$ , Prueba exacta de Fisher de dos colas). Hospitalización por diarrea de toda causa se redujo en un 42 % (IC del 95 % 29,53;

P<0,001, Prueba exacta de Fisher de dos colas).

**Ejemplo 15 - Eficacia de vacuna de Rotavirus atenuado humano Rotarix™ en seis países europeos**

**15.1. Procedimientos**

5 3.994 niños en seis países europeos se distribuyeron al azar para recibir vacuna de HRV (Rotavirus humano) Rotarix™ 10<sup>6,5</sup> CCID<sub>50</sub> (véase la composición) o placebo cuando se coadministra con vacunaciones para la infancia de rutina. El primer período de seguimiento de la eficacia comenzaba desde dos semanas después de la dosis 2 y terminaba junio - julio de 2005. Un total de 3874 sujetos eran parte de la cohorte de eficacia del primer año.

*Composición de vacuna:* (Tabla 25)

Vacuna	Formulación
Vacuna de HRV de GSK Biologicals	La cepa de RIX4414 derivada de la cepa de vacuna de HRV 89-12  Dosis infecciosa de cultivo celular mediana 10 <sup>6,5</sup> (CCID <sub>50</sub> )  Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) 3,7 mg  Sacarosa 9 mg  Dextrano 18 mg  Sorbitol 13,5 mg  Aminoácidos 9 mg
Diluyente de GSK Biologicals	Carbonato de calcio 80 mg  Xantano 3,25 mg  Agua para inyección c.s. para 1,3 ml

10

**15.2. Eficacia de la vacuna**

15 La vacuna de HRV era altamente eficaz en la protección contra RV GE durante el primer período de eficacia. La eficacia de la vacuna era 87,1 % (IC del 95 %: 79,6 %; 92,1 %) contra cualquier episodio de RV GE y 95,8 % (IC del 95 %: 89,6 %; 98,7 %) contra episodios de RV GE graves. Para un incremento de la gravedad de la enfermedad (puntuaciones de Vesikari entre 11 y 20), la eficacia de la vacuna se incrementaba más, alcanzando un 100 % en una población que tiene RV GE con una puntuación de Vesikari ≥ 17 puntos. La eficacia de la vacuna contra la hospitalización por RV GE era 100 % (IC del 95 %: 81,8 %; 100 %) y contra episodios RV GE que requerían atención médica era 91,8 % (IC del 95 %: 84,0 %; 96,3 %) (Tablas 26 y 27).

**Tabla 26 - Porcentaje de personas que presentan cualquier RV GE y RV GE grave, porcentaje de sujetos hospitalizados debido a episodios RV GE, y eficacia de vacuna durante el primer período de eficacia - cohorte para eficacia**

Grupos	N	Cualquier RV GE					RV GE grave (puntuación ≥11 en la escala Vesikari)				
		Sujetos			Eficacia de vacuna		Sujetos			Eficacia de vacuna	
		n	%	valor de P	% VE	IC del 95 %	n	%	valor de P	% VE	IC del 95 %
10 <sup>6,5</sup> CCID <sub>50</sub>	2572	24	0,9	<0,001	87,1	79,6-92,1	5	0,2	<0,001	95,8	89,6-98,7
Placebo	1302	94	7,2	-	-	-	60	4,6	-	-	-
RV GE hospitalizado											
	N	Sujetos			Eficacia de vacuna						
		n	%	valor de P	% VE	IC del 95 %					
<b>Estudio</b>											
10 <sup>6,5</sup> CCID <sub>50</sub>	2572	0	0,0	<0,001	<b>100</b>	81,8-100					
Placebo	1302	12	0,9	-	-	-					

N = número de sujetos incluido en cada grupo;  
 N% = número/porcentaje de sujetos que presentan al menos un episodio RV GE especificado en cada grupo  
 valor de P = Prueba exacta de Fisher de dos colas (nivel de significación de  $\alpha = 0,05$ )  
 % VE = eficacia de vacuna observada  
 IC del 95 % = intervalos de confianza de 95 %  
 una puntuación  $\geq 11$  sobre la escala de Vesikari de 20 puntos se definió como grave

**5 Tabla 27 - Porcentaje de sujetos que presentan episodios RV GE que requieren atención médica y eficacia de vacuna durante el primer período de eficacia - cohorte para eficacia**

Grupos	N	RV GE que requiere atención médica				
		n	%	Eficacia de vacuna		Valor de P
				% VE	IC del 95 %	
10 <sup>6,5</sup> CCID <sub>50</sub>	2572	10	0,4	91,8	84,0-96,3	<0,001
Placebo	1302	62	4,8	-	-	-

N = número de sujetos incluido en cada grupo;  
 N/% = número/porcentaje de sujetos que presentan al menos un episodio RV GE que requiere atención médica en cada grupo;  
 valor de P = Prueba exacta de Fisher de dos colas (nivel de significación de  $\alpha = 0,05$ )  
 % VE = eficacia de vacuna observada, IC del 95 % = intervalos de confianza de 95 %

La vacuna de HRV era altamente protectora contra cualquier RV GE y RV GE grave provocado por las cepas G1P[8], G3P[8], G4P[8] y G9P[8] (Tabla 28).

10 La protección contra el tipo G2P[4] de RV que no comparte ninguno de los antígenos de cápsida exterior de la vacuna de HRV era inferior en este estudio, sin embargo los resultados de un análisis meta teniendo en cuenta los estudios de eficacia de fase II y III mostraron una eficacia protectora significativa contra cualquier GE y GE grave debida a G2P[4] (véase el Ejemplo 13).

**Tabla 28 - Porcentaje de sujetos que presenta cualquier episodio RV GE o episodio RV GE grave eficacia de vacuna por serotipo durante el primer periodo de eficacia - cohorte para eficacia**

Grupos	N	Cualquier RV GE			RV GE grave (puntuación $\geq 11$ en la escala de Vesikari)		
		n	%	Eficacia de vacuna % VE 95% CI	n	%	Eficacia de vacuna % VE 95% CI
<b>Cepa de RV</b>							
<b>G1 P[8] tipo salvaje</b>	2572	4	0,2	<b>95,6</b>	2	0,1	<b>96,4</b>
10 <sup>6,5</sup> CCID <sub>50</sub>	1302	46†	3,5	87,9-98,8	28†	2,2	85,7-99,6
Placebo				<0,001			<0,001
<b>G2 P[4]</b>	2572	3	0,1	<b>62,0</b>	1	0,0	<b>74,7</b>
10 <sup>6,5</sup> CCID <sub>50</sub>	1302	4	0,3	-124,4-94,4	2	0,2	-386,2-99,6
Placebo				0,234			0,263
<b>G3 P[8]</b>	2572	1	0,0	<b>89,9</b>	0	0,0	<b>100</b>
10 <sup>6,5</sup> CCID <sub>50</sub>	1302	5	0,4	9,5-99,8	5	0,4	44,8-100
Placebo				0,018			0,004
<b>G4 P[8]</b>	2572	3	0,1	<b>88,3</b>	0	0,0	<b>100</b>
10 <sup>6,5</sup> CCID <sub>50</sub>	1302	13†	1,0	57,5-97,9	7†	0,5	64,9-100
Placebo				<0,001			<0,001
<b>G9 P[8]</b>	2572	13	0,5	<b>75,6</b>	2	0,1	<b>94,7</b>
10 <sup>6,5</sup> CCID <sub>50</sub>	1302	27	2,1	51,1-88,5	19	1,5	77,9-99,4
Placebo				<0,001			<0,001
<b>Reunidos no G1 P[8] (G2, G3, G4, G9)</b>	2572	20	0,8	<b>79,3</b>	3	0,1	<b>95,4</b>
10 <sup>6,5</sup> CCID <sub>50</sub>	1302	49	3,8	64,6-88,4	33	2,5	85,3-99,1
Placebo				<0,001			<0,001

N = número de sujetos incluido en cada grupo;

n/% = número/porcentaje de sujetos que presentan al menos un episodio de RV GE en cada grupo;

valor de P = ensayo exacto de Fisher de dos colas (nivel de significación de  $\alpha = 0,05$ )

% VE = eficacia de vacuna observada,

95%CI = intervalos de confianza de 95%

una puntuación  $\geq 11$  sobre la escala de Vesikari de 20 puntos se definió como grave

† Un sujeto del grupo de placebo contado en las categorías G1 y G4 ya que se aislaron ambos serotipos

### 15.3. Sumario de resultados

5 Dos dosis orales de la vacuna de HRV Rotarix™, coadministrada con vacunaciones para infancia, eran altamente eficaces durante el primer período de eficacia comparado con el placebo en la protección de niños contra cualquier RV GE provocado por los tipos de RV de tipo salvaje G1P[8] y por no- G1P[8] de RV, la eficacia de vacuna era 95,6 % (IC del 95 %: 87,9 %; 98,8 %) y 79,3 % (IC del 95 %: 64,6 %; 88,4 %) respectivamente. La eficacia contra RV GE grave provocada por los tipos de RV de tipo salvaje G1P[8] y por no- G1P[8] de RV es 96,4 % (IC del 95 %: 85,7 %; 99,6 %) y 95,4 % (IC del 95 %: 85,3 %; 99,1 %) respectivamente.

10 Estos resultados son muy de apoyo hacia la conclusión de que la vacuna de HRV proporciona una amplia cobertura contra las cepas de RV circulantes (véase la tabla 28: G1P[8], G2 P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8]). Se realizó específicamente un análisis meta sobre la eficacia de la vacuna contra G2 P[4], por favor referirse al Ejemplo 13.

### Conclusiones generales

15 La vacuna de Rotavirus RIX4414 probaba que era altamente protectora contra episodios de gastroenteritis por Rotavirus medido mediante una definición clínica para centrar la captura del caso en hospitalización y rehidratación, así como mediante la escala validada de Vesikari que incluye resultados de morbilidad cuantificables relacionados con diarrea, vómitos, fiebre, deshidratación y hospitalización. Dos dosis orales de vacuna de HRV eran altamente eficaces en la protección de niños contra cualquier RVGE y RVGE grave y hospitalización debida a múltiples cepas de Rotavirus circulantes.

20 Se demostró un alto nivel de protección contra Rotavirus G1P[8] homólogos, que tienen dos proteínas de cápside externas (VP4 y VP7) y una proteína de cápside interna (VP6) antigénicamente similar a la vacuna de HRV. También protege contra cepas que comparten solamente el genotipo P[8] (antígeno VP4) y el antígeno VP6. La protección contra cepas de Rotavirus que no comparten ninguno de los antígenos de la cápside externos de la vacuna de HRV también se demostró en un análisis meta que incluye los resultados de tres estudios de fase II de Finlandia, Singapur y Latinoamérica (todos usando metodología y criterios de eficacia idénticos) y 2 estudios de fase III de Latinoamérica y Europa, y que se reseñan en el Ejemplo 13, la eficacia de vacuna contra el tipo G2P[4] de cualquier gravedad era 81 % (IC del 95 %: 31,6 - 95,8) y eficacia de vacuna contra GE grave debida al tipo G2P[4] era 71,4 % (IC del 95 % 20,1 - 91,1) indicando que la vacuna también protege contra cepas que no comparten proteínas idénticas de G o P con la cepa de la vacuna.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> GlaxoSmithKline Biologicals s.a.

<120> Vacuna

<130> VB61582

5 <160> 42

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 2350

<212> ADN

10 <213> Rotavirus xxx

<400> 1

```

atggcttcac tcatttatag acaacttctc actaattcat attcagtaga tttacatgat 60
gaaatagagc aaattggatc agaaaaaact cagaatgtaa ctataaatcc ggggccattt 120
gcacagacta gatatgctcc agtcaattgg gatcatggag agataaatga ttcgactaca 180
gtagaaccaa ttttagatgg tccttatcag ccaactacat ttactccacc taatgattat 240
tggatactta ttaattcaaa tacaaatgga gtagtatatg aaagtacaaa taatagtgac 300
ttttggactg cagtcgttgc tattgaaccg cacgtcaacc cagtagatag acaatatatg 360
atattgggtg aaagcaagca atttaatgtg agtaacgatt caaataaatg gaagttttta 420
gaaatgttta gaagcagtag tcaaaatgaa ttttataata gacgtacatt aacttctgat 480
accagacttg taggaatatt taaatatggt ggaagagtat ggacatttca tggtgaaaca 540
ccgagagcta ctactgacag ttcaagtact gcaaatttaa ataatatatc aattacaatt 600
cattcagaat tttacattat tccaaggtcc caggaatcta aatgtaatga atatattaat 660
aatggctctg caccaattca aaactactaga aatgtagttc cattgccatt atcatctaga 720
tcgatacagt ataagagagc acaagttaat gaagacatta tagtttcaaa aacttcatta 780
tggaaagaaa tgcagtataa tagggatatt ataattagat ttaaatttgg taatagtatt 840
gtaaagatgg gaggactagg ttataaatgg tctgaaatat catataaggc agcaaattat 900
caatataatt acttacgtga cgggtaacaa gtaaccgcac acaccacttg ttcagtaaat 960
ggagtgaaca attttagcta taatggaggg tttctaccca ctgattttgg tatttcaagg 1020
tatgaagtta ttaaagagaa ttcttatgta tatgtagact attgggatga tcaaaagca 1080
tttagaaata tggatatatg tagatcatta gcagctaatt taaattcagt gaaatgtaca 1140
ggtggaagtt attatttccag tataccagta ggtgcattggc cagtaatgaa tgggtggcgct 1200
gtttcgttgc attttgcgg agttacatta tccacgcaat ttactgattt tgtatcatta 1260
aattcactac gatttagatt tagtttgaca gttgatgaac cacctttctc aatactgaga 1320
acacgtacag tgaatttgta tggattacca gccgctaadc caaataatgg aaatgaatac 1380
tacgaaatat caggaagggt ttcactcatt tcttttagttc caactaatga tgattatcag 1440
actccaatta tgaattcagt gacggtaaga caagatttag agcgccaact tactgattta 1500
cgagaagaat ttaactcatt gtcacaagaa atagctatgg cacaattgat tgatttagca 1560
ctgttgctc tagatatggt ttccatgttt tcaggaatta aaagtacaat tgatttaact 1620
aaatcaatgg cgactagtgt aatgaagaaa tttagaaaat caaatttagc tacatcaatt 1680
tcagaaatga ctaattcatt gtcagatgct gcttcatcag catcaagaaa cgtttctatt 1740
agatcgaatt tatctgcatg ttcaaattgg actaatgttt caaatgatgt gtcaaacgta 1800
actaattcat tgaacgatat ttcaacacaa acatctacaa ttagtaagaa acttagatta 1860
aaagaaatga ttactcaaac tgaaggaatg agctttgacg acatttcagc agctgtacta 1920
aaaacaaaaa tagatattgt tactcaaatt ggaaaaata ctttacctga tatagttaca 1980
gaagcatctg agaaatttat tccaaaacga tcatatcgaa tattaagga tgatgaagta 2040
atggaaatta atactgaagg aaaattcttt gcatacaaaa ttaatacatt tgatgaagtg 2100
ccattcgatg taaataaatt cgctgaacta gtaacagatt ctccagttat atcagcgata 2160
atcgatttta agacattgaa aaatttaaat gataattatg gaatcactcg tacagaagcg 2220

ttaaatttaa ttaaactgaa tccaaatatg ttacgtaatt tcattaatca aaataatcca 2280
attataagga atagaattga acagttaata ctacaatgta aattgtgaga acgctattga 2340
ggatgtgacc                                     2350

```

<210> 2

<211> 2359

ES 2 534 637 T3

<212> ADN

<213> Rotavirus

<400> 2

```

ggctataaaa tggcttcgct catttataga caacttctca ctaattcata ttcagtagat 60
ttacatgatg aaatagagca aattggatca gaaaaaactc agaatgtaac tataaatccg 120
ggcaccattg cacagactag atatgctcca gtcaattggg atcatggaga gataaatgat 180
tcgactacag tagaaccaat tttagatggg ccttatcagc caactacatt tactccacct 240
aatgattatt ggatacttat taattcaaat acaaatggag tagtatatga aagtacaaat 300
aatagtgact tttggactgc agtcgcttgc attgaaccgc acgtcaaccg agtagataga 360
caatatatga tatttgggtga aagcaagcaa tttaatgtga gtaacgattc aaataaatgg 420
aagtttttag aaatgtttag aagcagtagt caaaatgaat tttataatag acgtacatta 480
acttctgata ccgacttgt aggaatattt aaatatgggt gaagagtatg gacatttcat 540
ggtgaaacac cgagagctac tactgacagt tcaagtactg caaatttaa taatatatca 600
attacaattc attcagaatt ttacattatt ccaagggtccc aggaatctaa atgtaatgaa 660
tatattaata atggctctgcc accaattcaa aatactagaa atgtagttcc attgccatta 720
tcatctagat cgatacagta taagagagca caagttaatg aagacattat agtttcaaaa 780
acttcattat ggaaagaaat gcagtataat agggatatta taattagatt taaatttggg 840
aatagtattg taaagatggg aggactaggt tataaatggg ctgaaatatc atataaggca 900
gcaaattatc aatataatta cttacgtgac ggtgaacaag taaccgcaca caccattgt 960
tcagtaaatg gagtgaacaa ttttagctat aatggagggt ttctaccac tgatttggg 1020
atltcaagg atgaagttat taaagagaat tcttatgtat atgtagacta ttgggatgat 1080
tcaaagcat ttagaaatat ggtatatgtt agatcattag cagctaattt aaattcagtg 1140
aatgtacag gtggaagtta ttatttcagt ataccagtag gtgcatggcc agtaatgat 1200
ggtggcgctg tttcgttgca ttttgccgga gttacattat ccacgcaatt tactgatttt 1260
gtatcattaa attcactacg atttagattt agtttgacag ttgatgaacc accttctca 1320
atactgagaa cacgtacagt gaatttgtat ggattaccag ccgctaacc aaataatgga 1380
aatgaatact acgaaatc aggaaggttt tcaactcatt ctttagttcc aactaatgat 1440
gattatcaga ctccaattat gaattcagtg acggtaagac aagatttaga gcgccaactt 1500
actgatttac gagaagaatt taactcattg tcaacaagaa tagctatggc acaattgatt 1560
gatttagcac tgttcctct agatatgttt tccatgtttt caggaattaa aagtacaatt 1620
gatttaacta aatcaatggc gactagtgt aatgaagaa tttagaaaatc aaaattagct 1680
acatcaattt cagaaatgac taattcattg tcagatgctg cttcatcagc atcaagaaac 1740
gttctatta gatcgaattt atctgcgatt tcaaatggga ctaatgtttc aaatgatgtg 1800
tcaaacgtaa ctaattcatt gaacgatatt tcaacacaaa catctacaat tagtaagaaa 1860
cttagattaa aagaaatgat tactcaaact gaaggaatga gctttgacga catttcagca 1920
gctgtactaa aaacaaaaat agatatgtct actcaaattg gaaaaaatac tttacctgat 1980
atagttacag aagcatctga gaaatttatt ccaaacgat catatcgaat attaaaggat 2040
gatgaagtaa tggaaattaa tactgaagga aaattccttg catacaaat taatacattt 2100
gatgaagtgc cattcgatgt aaataaattc gctgaactag taacagattc tccagttata 2160
tcagcgataa tcgattttaa gacattgaaa aatttaaattg ataattatgg aatcactcgt 2220
acagaagcgt taaatttaat taaatcgaat ccaaatatgt tacgtaattt cattaatcaa 2280
aataatccaa ttataaggaa tagaattgaa cagttaatac tacaatgtaa atttgtgaaa 2340
cgctattgag gatgtgacc

```

<210> 3

<211> 1009

<212> ADN

<213> Rotavirus

<400> 3

ES 2 534 637 T3

```

atgatggtc ttgaatatac cacaattcta atctttctga tatcaattat tctactcaac 60
tatatattaa aatcagtaac tcgaataatg gactacatta tatatagatc tttggtgatt 120
tatgtagcat tatttgcctt gacaagagct cagaattatg ggcttaactt accaataaca 180
ggatcaatgg acactgtata cgctaactct actcaagaag gaatatttct aacatccaca 240
ttatgtttgt attatccaac tgaagcaagt actcaaatta atgatgggta atggaaagac 300
tcattgtcac aaatgtttct cacaaaaggt tggccaacag gatcagtcta ttttaagag 360
tattcaagta ttggtgatt ttctgtcgat ccacaattat attgtgatta taacttagta 420
ctaagaaat atgatcaaaa tcttgaatta gatatgtcag agttagctga tttaatattg 480
aatgaatggg tatgtaatcc aatggatata acattatatt attatcaaca atcgggagaa 540
tcaaataagt ggatatcaat gggatcatca tgtactgtga aagtgtgtcc actgaatacg 600
caaatgttag gaataggttg tcaaacaaca aatgtagact cgtttgaaat ggttgctgag 660
aatgagaaat tagctatagt ggatgtcgtt gatgggataa atcataaaat aaatttgaca 720
actacgacat gtactattcg aaattgtaag aagttaggtc caagagagaa tgtagctgta 780
atacaagttg gtggctctaa tgtattagac ataacagcag atccaacgac taatccaca 840
actgagagtg gatgtgaggt gaattggaaa aaatgggtggc aagtatttta tactatagta 900
gattatatta accaaatcgt gcaggtaatg tccaaaagat caagatcatt aaattctgca 960
gctttttatt atagagtata gatatatctt agattagatc gatgtgacc 1009

```

<210> 4

<211> 1046

<212> ADN

5 <213> Rotavirus

<400> 4

```

ggctttaaaa gagagaatth cegtctggct aacggttagc tccttttaat gtatggatt 60
gaatatacca caattctaatt ctttctgata tcaattattc tactcaacta tatattaaaa 120
tcagttaactc gaataatgga ctacattata tatagatctt tgttgattta tgtagcatta 180
tttgcttga caagagctca gaattatggg cttaacttac caataacagg atcaatggac 240
actgtatacg ctaactctac tcaagaagga atatttctaa catccacatt atgtttgtat 300
tatccaactg aagcaagtac tcaaattaat gatgggtgaat ggaaagactc attgtcacia 360
atgtttctca caaaagggtg gccaacagga tcagtctatt ttaaagagta ttcaagtatt 420
gttgattttt ctgtcgatcc acaattatat tgtgattata acttagtact aatgaaatat 480
gatcaaaatc ttgaattaga tatgtcagag tttagctgatt taatattgaa tgaatggtta 540
tgtaatccaa tggatataac attatattat tatcaacaat cgggagaatc aaataagttg 600
atatcaatgg gatcatcatg tactgtgaaa gtgtgtccac tgaatacgca aatgtagga 660
ataggttgtc aaacaacaaa tgtagactcg tttgaaatgg ttgctgagaa tgagaaatta 720
gctatagtgg atgtcgttga tgggataaat cataaaataa atttgacaac tacgacatgt 780
actattcgaa attgtaagaa gttaggtcca agagagaatg tagctgtaat acaagttggt 840
ggctctaattg tattagacat aacagcagat ccaacgacta atccacaac tgagagaatg 900
atgagagtga attggaaaaa atgggtggcaa gtattttata ctatagtaga ttatattaac 960
caaatcgtgc aggtaatgtc caaaagatca agatcattaa attctgcagc tttttattat 1020
agagtataga tatatcttag attaga 1046

```

<210> 5

<211> 775

10 <212> PRT

<213> Rotavirus

<400> 5

```

Met Ala Ser Leu Ile Tyr Arg Gln Leu Leu Thr Asn Ser Tyr Ser Val
 1           5           10           15
Asp Leu His Asp Glu Ile Glu Gln Ile Gly Ser Glu Lys Thr Gln Asn
 20           25
Val Thr Ile Asn Pro Gly Pro Phe Ala Gln Thr Arg Tyr Ala Pro Val
 35           40           45
Asn Trp Asp His Gly Glu Ile Asn Asp Ser Thr Thr Val Glu Pro Ile
 50           55           60

```

ES 2 534 637 T3

Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Thr Thr Phe Thr Pro Pro Asn Asp Tyr  
 65 70 75 80  
 Trp Ile Leu Ile Asn Ser Asn Thr Asn Gly Val Val Tyr Glu Ser Thr  
 85 90 95  
 Asn Asn Ser Asp Phe Trp Thr Ala Val Val Ala Ile Glu Pro His Val  
 100 105 110  
 Asn Pro Val Asp Arg Gln Tyr Met Ile Phe Gly Glu Ser Lys Gln Phe  
 115 120 125  
 Asn Val Ser Asn Asp Ser Asn Lys Trp Lys Phe Leu Glu Met Phe Arg  
 130 135 140  
 Ser Ser Ser Gln Asn Glu Phe Tyr Asn Arg Arg Thr Leu Thr Ser Asp  
 145 150 155 160  
 Thr Arg Leu Val Gly Ile Phe Lys Tyr Gly Gly Arg Val Trp Thr Phe  
 165 170 175  
 His Gly Glu Thr Pro Arg Ala Thr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Ala Asn  
 180 185 190  
 Leu Asn Asn Ile Ser Ile Thr Ile His Ser Glu Phe Tyr Ile Ile Pro  
 195 200 205  
 Arg Ser Gln Glu Ser Lys Cys Asn Glu Tyr Ile Asn Asn Gly Leu Pro  
 210 215 220  
 Pro Ile Gln Asn Thr Arg Asn Val Val Pro Leu Pro Leu Ser Ser Arg  
 225 230 235 240  
 Ser Ile Gln Tyr Lys Arg Ala Gln Val Asn Glu Asp Ile Ile Val Ser  
 245 250 255  
 Lys Thr Ser Leu Trp Lys Glu Met Gln Tyr Asn Arg Asp Ile Ile Ile  
 260 265 270  
 Arg Phe Lys Phe Gly Asn Ser Ile Val Lys Met Gly Gly Leu Gly Tyr  
 275 280 285  
 Lys Trp Ser Glu Ile Ser Tyr Lys Ala Ala Asn Tyr Gln Tyr Asn Tyr  
 290 295 300  
 Leu Arg Asp Gly Glu Gln Val Thr Ala His Thr Thr Cys Ser Val Asn  
 305 310 315 320  
 Gly Val Asn Asn Phe Ser Tyr Asn Gly Gly Phe Leu Pro Thr Asp Phe  
 325 330 335  
 Gly Ile Ser Arg Tyr Glu Val Ile Lys Glu Asn Ser Tyr Val Tyr Val  
 340 345 350  
 Asp Tyr Trp Asp Asp Ser Lys Ala Phe Arg Asn Met Val Tyr Val Arg  
 355 360 365  
 Ser Leu Ala Ala Asn Leu Asn Ser Val Lys Cys Thr Gly Gly Ser Tyr  
 370 375 380  
 Tyr Phe Ser Ile Pro Val Gly Ala Trp Pro Val Met Asn Gly Gly Ala  
 385 390 395 400  
 Val Ser Leu His Phe Ala Gly Val Thr Leu Ser Thr Gln Phe Thr Asp  
 405 410 415  
 Phe Val Ser Leu Asn Ser Leu Arg Phe Arg Phe Ser Leu Thr Val Asp  
 420 425 430  
 Glu Pro Pro Phe Ser Ile Leu Arg Thr Arg Thr Val Asn Leu Tyr Gly  
 435 440 445  
 Leu Pro Ala Ala Asn Pro Asn Asn Gly Asn Glu Tyr Tyr Glu Ile Ser  
 450 455 460  
 Gly Arg Phe Ser Leu Ile Ser Leu Val Pro Thr Asn Asp Asp Tyr Gln  
 465 470 475 480  
 Thr Pro Ile Met Asn Ser Val Thr Val Arg Gln Asp Leu Glu Arg Gln  
 485 490 495  
 Leu Thr Asp Leu Arg Glu Glu Phe Asn Ser Leu Ser Gln Glu Ile Ala  
 500 505 510  
 Met Ala Gln Leu Ile Asp Leu Ala Leu Leu Pro Leu Asp Met Phe Ser

ES 2 534 637 T3

```

          515                520                525
Met Phe Ser Gly Ile Lys Ser Thr Ile Asp Leu Thr Lys Ser Met Ala
   530                535                540
Thr Ser Val Met Lys Lys Phe Arg Lys Ser Lys Leu Ala Thr Ser Ile
545                550                555                560
Ser Glu Met Thr Asn Ser Leu Ser Asp Ala Ala Ser Ser Ala Ser Arg
          565                570                575
Asn Val Ser Ile Arg Ser Asn Leu Ser Ala Ile Ser Asn Trp Thr Asn
          580                585                590
Val Ser Asn Asp Val Ser Asn Val Thr Asn Ser Leu Asn Asp Ile Ser
          595                600                605
Thr Gln Thr Ser Thr Ile Ser Lys Lys Leu Arg Leu Lys Glu Met Ile
   610                615                620
Thr Gln Thr Glu Gly Met Ser Phe Asp Asp Ile Ser Ala Ala Val Leu
625                630                635                640
Lys Thr Lys Ile Asp Met Ser Thr Gln Ile Gly Lys Asn Thr Leu Pro
          645                650                655
Asp Ile Val Thr Glu Ala Ser Glu Lys Phe Ile Pro Lys Arg Ser Tyr
          660                665                670
Arg Ile Leu Lys Asp Asp Glu Val Met Glu Ile Asn Thr Glu Gly Lys
          675                680                685
Phe Phe Ala Tyr Lys Ile Asn Thr Phe Asp Glu Val Pro Phe Asp Val
   690                695                700
Asn Lys Phe Ala Glu Leu Val Thr Asp Ser Pro Val Ile Ser Ala Ile
705                710                715                720
Ile Asp Phe Lys Thr Leu Lys Asn Leu Asn Asp Asn Tyr Gly Ile Thr
          725                730                735
Arg Thr Glu Ala Leu Asn Leu Ile Lys Ser Asn Pro Asn Met Leu Arg
          740                745                750
Asn Phe Ile Asn Gln Asn Asn Pro Ile Ile Arg Asn Arg Ile Glu Gln
          755                760                765
Leu Ile Leu Gln Cys Lys Leu
   770                775

```

<210> 6

<211> 326

<212> PRT

<213> Rotavirus

<400> 6

```

Met Tyr Gly Ile Glu Tyr Thr Thr Ile Leu Ile Phe Leu Ile Ser Ile
  1                5                10                15
Ile Leu Leu Asn Tyr Ile Leu Lys Ser Val Thr Arg Ile Met Asp Tyr
   20                25                30
Ile Ile Tyr Arg Ser Leu Leu Ile Tyr Val Ala Leu Phe Ala Leu Thr
   35                40                45
Arg Ala Gln Asn Tyr Gly Leu Asn Leu Pro Ile Thr Gly Ser Met Asp
   50                55                60
Thr Val Tyr Ala Asn Ser Thr Gln Glu Gly Ile Phe Leu Thr Ser Thr
   65                70                75                80
Leu Cys Leu Tyr Tyr Pro Thr Glu Ala Ser Thr Gln Ile Asn Asp Gly
          85                90                95
Glu Trp Lys Asp Ser Leu Ser Gln Met Phe Leu Thr Lys Gly Trp Pro
          100                105                110
Thr Gly Ser Val Tyr Phe Lys Glu Tyr Ser Ser Ile Val Asp Phe Ser

```

ES 2 534 637 T3

		115					120					125			
Val	Asp	Pro	Gln	Leu	Tyr	Cys	Asp	Tyr	Asn	Leu	Val	Leu	Met	Lys	Tyr
	130					135					140				
Asp	Gln	Asn	Leu	Glu	Leu	Asp	Met	Ser	Glu	Leu	Ala	Asp	Leu	Ile	Leu
145					150					155					160
Asn	Glu	Trp	Leu	Cys	Asn	Pro	Met	Asp	Ile	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Gln
				165					170					175	
Gln	Ser	Gly	Glu	Ser	Asn	Lys	Trp	Ile	Ser	Met	Gly	Ser	Ser	Cys	Thr
			180					185					190		
Val	Lys	Val	Cys	Pro	Leu	Asn	Thr	Gln	Met	Leu	Gly	Ile	Gly	Cys	Gln
	195						200					205			
Thr	Thr	Asn	Val	Asp	Ser	Phe	Glu	Met	Val	Ala	Glu	Asn	Glu	Lys	Leu
	210					215					220				
Ala	Ile	Val	Asp	Val	Val	Asp	Gly	Ile	Asn	His	Lys	Ile	Asn	Leu	Thr
225					230					235					240
Thr	Thr	Thr	Cys	Thr	Ile	Arg	Asn	Cys	Lys	Lys	Leu	Gly	Pro	Arg	Glu
			245						250					255	
Asn	Val	Ala	Val	Ile	Gln	Val	Gly	Gly	Ser	Asn	Val	Leu	Asp	Ile	Thr
			260				265						270		
Ala	Asp	Pro	Thr	Thr	Asn	Pro	Gln	Thr	Glu	Arg	Met	Met	Arg	Val	Asn
	275					280						285			
Trp	Lys	Lys	Trp	Trp	Gln	Val	Phe	Tyr	Thr	Ile	Val	Asp	Tyr	Ile	Asn
	290				295						300				
Gln	Ile	Val	Gln	Val	Met	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Ser	Leu	Asn	Ser	Ala
305					310					315					320
Ala	Phe	Tyr	Tyr	Arg	Val										
				325											

<210> 7

<211> 175

<212> PRT

<213> Rotavirus

<400> 7

Met	Asp	Lys	Leu	Ala	Asp	Leu	Asn	Tyr	Thr	Leu	Ser	Val	Ile	Thr	Leu
1				5					10					15	
Met	Asn	Asp	Thr	Leu	His	Ser	Ile	Ile	Gln	Asp	Pro	Gly	Met	Ala	Tyr
			20					25					30		
Phe	Ser	Tyr	Ile	Ala	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	Phe	Ile	Leu	His	Lys
				35				40					45		
Ala	Ser	Ile	Pro	Thr	Met	Lys	Ile	Ala	Leu	Lys	Thr	Ser	Lys	Cys	Ser
	50					55					60				
Tyr	Lys	Val	Ile	Lys	Tyr	Cys	Ile	Val	Thr	Ile	Ile	Asn	Thr	Leu	Leu
65					70					75				80	
Lys	Leu	Ala	Gly	Tyr	Lys	Glu	Gln	Val	Thr	Thr	Lys	Asp	Glu	Ile	Glu
				85					90					95	
Gln	Gln	Met	Asp	Arg	Ile	Val	Lys	Glu	Met	Arg	Arg	Gln	Leu	Asp	Met
			100					105					110		
Ile	Asp	Lys	Leu	Thr	Thr	Arg	Glu	Ile	Glu	Gln	Val	Glu	Leu	Leu	Lys
	115						120					125			
Arg	Ile	His	Asp	Asn	Leu	Ile	Thr	Arg	Pro	Val	Asp	Val	Ile	Asp	Met
	130					135					140				
Ser	Lys	Glu	Phe	Asn	Gln	Lys	Asn	Ile	Lys	Thr	Leu	Asp	Glu	Trp	Glu
145					150					155					160
Ser	Gly	Lys	Asn	Pro	Tyr	Glu	Pro	Ser	Glu	Val	Thr	Ala	Ser	Met	

165

170

175

ES 2 534 637 T3

<210> 8

<211> 750

<212> ADN

<213> Rotavirus

5 <400> 8

```

ggcttttaaa agttctgttc cgagagagcg cgtgcggaaa gatggataag cttgccgacc 60
tcaactacac attgagtgtg atcactttaa tgaatgacac attgcattct ataattcaag 120
atcctggaat ggcgtatfff tcatatattg catctgttct aacagtttta tcatattac 180
ataaagcttc aattccaacc atgaaaatag cattgaaaac atcaaaatgt tcatataaag 240
tgattaaata ttgtatagtc acgatcatta atactctttt aaaattggct ggatataaag 300
agcaggttac tacaaaagac gaaattgagc aacagatgga cagaattggt aaagagatga 360
gacgtcagct ggatagatt gataaattaa ctactcgtga aattgaacag gttgaattgc 420
ttaaactgat acatgacaac ctgataacta gaccagttga cgtcatagat atgtcgaagg 480
aattcaatca gaaaaacatc aaaacgctag atgaatggga gagtggaaaa aatccatatg 540
aaccgtcaga agtgactgca tccatgtgag aggttgagtt accgtcgtct gtcttcggaa 600
gcggcggaac tcttcaccgc aagccccatt agacctgatg attgactgag aagccacagt 660
caatcatatc gcgtgtggct cagccttaat cccgtttaac caatccagcg agtgttggac 720
gttaatggaa ggaatggtct tagtgtgacc 750

```

<210> 9

<211> 397

<212> PRT

10 <213> Rotavirus

<400> 9

```

Met Glu Val Leu Tyr Ser Leu Ser Lys Thr Leu Lys Asp Ala Arg Asp
 1          5          10          15
Lys Ile Val Glu Gly Thr Leu Tyr Ser Asn Val Ser Asp Leu Ile Gln
 20          25          30
Gln Phe Asn Gln Met Ile Val Thr Met Asn Gly Asn Asp Phe Gln Thr
 35          40          45
Gly Gly Ile Gly Asn Leu Pro Val Arg Asn Trp Thr Phe Asp Phe Gly
 50          55          60
Leu Leu Gly Thr Thr Leu Leu Asn Leu Asp Ala Asn Tyr Val Glu Asn
 65          70          75          80
Ala Arg Thr Thr Ile Glu Tyr Phe Ile Asp Phe Ile Asp Asn Val Cys
 85          90          95
Met Asp Glu Met Ala Arg Glu Ser Gln Arg Asn Gly Val Ser Pro Gln
100          105          110
Ser Glu Ala Leu Arg Lys Leu Ala Gly Ile Lys Phe Lys Arg Ile Asn
115          120          125
Phe Asp Asn Ser Ser Glu Tyr Ile Glu Asn Trp Asn Leu Gln Asn Arg
130          135          140
Arg Gln Arg Thr Gly Phe Val Phe His Lys Pro Asn Ile Phe Pro Tyr
145          150          155          160
Ser Ala Ser Phe Thr Leu Asn Arg Ser Gln Pro Met His Asp Asn Leu
165          170          175
Met Gly Thr Met Trp Leu Asn Ala Gly Ser Glu Ile Gln Val Ala Gly
180          185          190
Phe Asp Tyr Ser Cys Ala Ile Asn Ala Pro Ala Asn Ile Gln Gln Phe
195          200          205
Glu His Ile Val Gln Leu Arg Arg Ala Leu Thr Thr Ala Thr Ile Thr
210          215          220

```

ES 2 534 637 T3

Leu Leu Pro Asp Ala Glu Arg Phe Ser Phe Pro Arg Val Ile Asn Ser  
 225 230 235 240  
 Ala Asp Gly Ala Thr Thr Trp Phe Phe Asn Pro Val Ile Leu Arg Pro  
 245 250 255  
 Asn Asn Val Glu Val Glu Phe Leu Leu Asn Gly Gln Ile Ile Asn Thr  
 260 265 270  
 Tyr Gln Ala Arg Phe Gly Thr Ile Ile Ala Arg Asn Phe Asp Thr Ile  
 275 280 285  
 Arg Leu Leu Phe Gln Leu Met Arg Pro Pro Asn Met Thr Pro Ala Val  
 290 295 300  
 Asn Ala Leu Phe Pro Gln Ala Gln Pro Phe Gln His His Ala Thr Val  
 305 310 315 320  
 Gly Leu Thr Leu Arg Ile Glu Ser Ala Val Cys Glu Ser Val Leu Ala  
 325 330 335  
 Asp Ala Asn Glu Thr Leu Leu Ala Asn Val Thr Ala Val Arg Gln Glu  
 340 345 350  
 Tyr Ala Ile Pro Val Gly Pro Val Phe Pro Pro Gly Met Asn Trp Thr  
 355 360 365  
 Glu Leu Ile Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Arg Glu Asp Asn Leu Gln Arg  
 370 375 380  
 Val Phe Thr Val Ala Ser Ile Arg Ser Met Leu Ile Lys  
 385 390 395

<210> 10

<211> 1356

<212> ADN

5 <213> Rotavirus

<400> 10

ggctttaaaa cgaagtcttc gacatggagg ttctgtactc actgtcaaaa actcttaaag 60  
 atgctagga caaaattggt gaaggtacat tatattctaa cgttagcgat cttattcagc 120  
 aattcaatca aatgatagta actatgaatg gaaatgactt tcagactgga ggaattggta 180  
 atttacctgt tagaaattgg actttcgatt ttggcttatt aggtacaaca cttttgaact 240  
 tggatgctaa ttatggtgag aatgcaagaa ctacaattga atattttatt gactttattg 300  
 ataatgatg tatggatgaa atggcaagag aatctcaaag aaatggagta tcgccacaat 360  
 ctgaagcgtt aagaaagcta gcgggaatta aatttaagag aataaatttc gataattcat 420  
 cagaatacat agaaaattgg aacttacaata atagaagaca gcgcaccgga tttgtttttc 480  
 ataaacctaa cttttttcca tactcagctt catttactct aaatagatct caaccaatgc 540  
 atgataattt aatgggaacc atgtggctta atgctggatc agaaattcaa gtggctggat 600  
 ttgattactc atgcgccata aatgcaccag cgaacatata gcaatttgag catatcgttc 660  
 agcttaggag cgcaactgact acagctacta taactttatt acctgatgca gagagattta 720  
 gttttccaag agtaattaat tcagctgatg gcgcgactac atggttcttt aatccagtta 780  
 ttctaagacc aaacaatgta gaggtagaat ttttattgaa tggacaaatt attaatacat 840  
 atcaggctag atttgttact atcatcgcaa gaaatttga tacaattcgt ttattatttc 900  
 agttgatgag tccacctaata atgacaccag ctgttaatgc actatttcca caagcacaac 960  
 cttttcagca ccatgcaaca gttggactta cattacgtat tgaatctgag gtttgtgaat 1020  
 cagtgcctgc ggacgcgaat gaaactctgt tagcaaatgt gaccgcggtg cgtcaagaat 1080  
 atgccatacc agttggaccg gtatttccac caggcatgaa ttggactgaa ttgattacta 1140  
 actattcgcc atctagagaa gataaactgc aacgcgtttt cacggtagct tccattagaa 1200  
 gcatgttgat taagtgagga ccagactaaa catctggat ccaatcttag ttagcatgta 1260  
 gctacatcaa gtcattcaga ctcttcaagt aaggacatga tttcatgttc gctacgtaga 1320  
 gtaactgtct gaatgatgta gtgagaggat gtgacc 1356

<210> 11

<211> 28

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

5 <400> 11

ggcttataaa gagagaattt ccgtctgg 28

<210> 12

<211> 25

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

15 <400> 12

ggtagctcc ttttaatgta tggta 25

<210> 13

<211> 27

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

25 <400> 13

ggtcacatcg aacaattcta atctaag 27

<210> 14

<211> 22

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

35 <400> 14

caagtactca aatcaatgat gg 22

<210> 15

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

<400> 15

tgttgatttt tctgtcgatc cac 23

10 <210> 16

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

<400> 16

ggttgctgag aatgagaaat tagctatagt gg 32

20 <210> 17

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

<400> 17

ccactatagc taatttctca ttctcagcaa cc 32

30 <210> 18

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

<400> 18  
 tggcttcgcc atttataga ca 22  
 <210> 19  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de  
 nucleótidos de Rotavirus  
 10  
 <400> 19  
 atttcggacc atttataacc 20  
 <210> 20  
 <211> 22  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de  
 nucleótidos de Rotavirus  
 20  
 <400> 20  
 tggcttcact catttataga ca 22  
 <210> 21  
 <211> 23  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de  
 nucleótidos de Rotavirus  
 30  
 <400> 21  
 atttcagacc atttataacc tag 23  
 <210> 22  
 <211> 29  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

<400> 22

5 ggagtagtat atgaaagtac aaataatag 29

<210> 23

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

<400> 23

15 ctattatttg tacttcata tactactcc 29

<210> 24

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

<400> 24

25 tcgatacagt ataagagagc acaag 25

<210> 25

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

<400> 25

35 ttcattaact tggctctct tatactg 27

<210> 26

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de  
5 nucleótidos de Rotavirus

<400> 26  
gtatatgtag actattggga tg 22

<210> 27

10 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de  
15 nucleótidos de Rotavirus

<400> 27  
catccaata gtctacatat ac 22

<210> 28

<211> 23

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de  
nucleótidos de Rotavirus

25

<400> 28  
tgtaactccg gcaaatgca acg 23

<210> 29

<211> 23

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de  
nucleótidos de Rotavirus

35

<400> 29  
cgttgcatt tgccgagtt aca 23

<210> 30

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

<400> 30

10 gtaagacaag atttagagcg cca 23

<210> 31

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

<400> 31

20 tggcgctcta aatctgtct tac 23

<210> 32

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

<400> 32

30 cttgatgctg atgaagcagc atctg 25

<210> 33

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

## ES 2 534 637 T3

<400> 33  
cagatgctgc tcatcagca tcaag 25  
<210> 34  
5 <211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de  
10 nucleótidos de Rotavirus

<400> 34  
cgatcatatc gaatattaa ggatg 25  
<210> 35  
15 <211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de  
20 nucleótidos de Rotavirus

<400> 35  
catccttaa tattcgatat gatcg 25  
<210> 36  
25 <211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de  
30 nucleótidos de Rotavirus

<400> 36  
agcgttcaca caatttcat tgtag 25  
<210> 37  
35 <211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

5 <400> 37

agtattttat actatagtag attatattaa tc 32

<210> 38

<211> 32

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

15 <400> 38

agtattttat actatgtag attatattaa tc 32

<210> 39

<211> 25

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

25 <400> 39

atccccatta tactgcattc ctttc 25

<210> 40

<211> 25

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

35 <400> 40

atccctatta tactgcattt ctttc 25

<210> 41

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

<400> 41

atccccatta tactgcattt cttc 25

10 <210> 42

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótidos que comparten homología con secuencias de nucleótidos de Rotavirus

<400> 42

atccctatta tactgcattc cttc 25

20

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una cepa de Rotavirus atenuado de tipo G1P[8] en la fabricación de una composición para conferir protección contra la infección por rotavirus causada por una cepa de rotavirus de tipo G2P[4].
- 5 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición comprende un Rotavirus que tiene un gen VP4 que comprende, en la secuencia de nucleótidos, al menos uno de los siguientes: una base adenina (A) en la posición 788, una base adenina (A) en la posición 802 y una base timina (T) en la posición 501 desde el codón iniciación.
- 10 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el gen VP4 comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una base adenina (A) en las posiciones 788 y 802 y una base timina (T) en la posición 501 desde el codón de iniciación.
- 15 4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 en el que la composición comprende un Rotavirus que tiene un gen VP7 que comprende, en la secuencia de nucleótidos, al menos uno de los siguientes: una timina (T) en la posición 605, una adenina (A) en la posición 897 y una guanina (G) en la posición 897 desde el codón de iniciación.
- 20 5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4 en el que el gen VP7 comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una timina (T) en la posición 605 y una adenina (A) o una guanina (G) en la posición 897 desde el codón de iniciación.
- 25 6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la composición comprende un Rotavirus que tiene un gen VP4 que comprende, en la secuencia de nucleótidos, una adenina (A) en las posiciones 788 y 802 y una timina (T) en la posición 501 desde el codón de iniciación; y en el que el gen VP7 comprende, en la secuencia de nucleótidos, una timina (T) en la posición 605 y una adenina (A) en la posición 897 desde el codón de iniciación.
- 30 7. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la composición confiere además protección contra al menos uno de los serotipos no-G1 seleccionados del grupo que consiste en; G3, G4 y G9.
- 35 8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición comprende una cepa de rotavirus atenuado de G1P[8] que proporciona protección contra gastroenteritis grave inducida por rotavirus que tiene una puntuación igual o superior a 11 en la escala de Vesikari causada por infección de una cepa de rotavirus de un tipo G2P[4].
- 40 9. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la composición que comprende una cepa de Rotavirus atenuado de un tipo G1P[8] es al menos un 40 % protectora, en una población de individuos vacunados contra la diarrea provocada por una cepa de Rotavirus que es de tipo G2P[4].
- 45 10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la composición es al menos un 50 % protectora.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la composición es entre 40 % y 80 % protectora.
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la composición es entre 50 % y 70 % protectora.
13. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la composición es entre 40 % y 75 % protectora en una población de individuos vacunados contra la gastroenteritis grave que tienen una puntuación igual o superior a 11 en la escala de Vesikari causada por infección de Rotavirus con un serotipo G2P[4].
14. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la cepa de Rotavirus en dicha composición es ECACC depósito 99081301, o se puede obtener o derivar de ECACC depósito 99081301.
15. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la composición es administrada en un régimen de 2 dosis.
16. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la cepa de Rotavirus atenuado es formulada con un vehículo farmacéutico adecuado o con un tampón antiácido o ambos.
17. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que la composición es para conferir protección en un sujeto humano.

FIG. 1A secuencia VP4 de P43

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

FIG. 1B secuencia VP4 de P43 (RIX4414 VP4; 2359 pb)

```

1      ggctataaaaA TGGCTTCGCT CATTATAGA CAACTTCTCA CTAATTCATA TTCAGTAGAT
61     TTACATGATG AAATAGAGCA AATTGGATCA GAAAAAACTC AGAATGTAC TATAAATCCG
121    GGTCCATTTG CACAGACTAG ATATGCTCCA GTCAATTGGG ATCATGGAGA GATAAATGAT
181    TCGACTACAG TAGAACCAAT TTTAGATGGT CCTTATCAGC CAACTACATT TACTCCACCT
241    AATGATTATT GGATACTTAT TAATTCAAAT ACAAAATGGAG TAGTATATGA AAGTACAAAT
301    AATAGTGACT TTTGGACTCC AGTCGTTGCT ATTGAACCGC ACGTCAACCC AGTAGATAGA
361    CAATATATGA TATTTGGTGA AAGCAAGCAA TTTAATGTGA GTAACGATTC AAATAAATGG
421    AAGTTTTTATG AAATGTTTATG AAGCAGTAGT CAAAATGAAT TTTATAATAG ACGTACATTA
481    ACTTCTGATA CCAGACTTGT AGGAATATTT AAATATGGTG GAAGAGTATG GACATTTTCAT
541    GGTGAAACAC CGAGAGCTAC TACTGACAGT TCAAGTACTG CAAATTTAAA TAATATATCA
601    ATTACAATTC ATTCAGAATT TTACATTATT CCAAGGTCCC AGGAATCTAA ATGTAATGAA
661    TATATTAATA ATGGTCTGCC ACCAATTCAA AATACTAGAA ATGTAGTTCC AATGCCATTA
721    TCATCTAGAT CGATACAGTA TAAGAGAGCA CAAGTTAATG AAGACATTAT AGTTTCAAAA
781    ACTTCATTAT GGAAAGAAAT GCAGTATAAT AGGGATATTA TAATTAGATT TAAATTTGGT
841    AATAGTATTG TAAAGATGGG AGGACTAGGT TATAAATGGT CTGAAATATC ATATAAGGCA
901    GCAAATTATC AATATAATTA CTTACGTGAC GGTGAACAAG TAACCGCACA CACCACTTGT
961    TCAGTAAATG GAGTGAACAA TTTTAGCTAT AATGGAGGGT TTCTACCCAC TGATTTTGGT
1021   ATTTCAAGGT ATGAAGTTAT TAAAGAGAAT TCTTATGTAT ATGTAGACTA TTGGGATGAT
1081   TCAAAAGCAT TTAGAAATAT GGTATATGTT AGATCATTAG CAGCTAATTT AAATTCAGTG
1141   AAATGTACAG GTGGAAGTTA TTATTTTCAGT ATACCAGTAG GTGCATGGCC AGTAATGAAT
1201   GGTGGCGCTG TTTCTGTGCA TTTTGCCGGA GTTACATTAT CCACGCAATT TACTGATTTT
1261   GTATCATTAA ATTCACTACG ATTTAGATTT AGTTTGACAG TTGATGAACC ACCTTTCTCA
1321   ATACTGAGAA CACGTACAGT GAATTTGTAT GGATTACCAG CCGCTAATCC AAATAATGGA
1381   AATGAATACT ACGAAATATC AGGAAGGTTT TCACTCATT TTTAGTTCC AACTAATGAT
1441   GATTATCAGA CTCCAATTAT GAATTCAGTG ACGGTAAGAC AAGATTTAGA GCGCCAACTT
1501   ACTGATTTAC GAGAAGAATT TAACTCATTG TCACAAGAAA TAGCTATGGC ACAATTGATT
1561   GATTTAGCAC TGTTGCCTCT AGATATGTTT TCCATGTTTT CAGGAATTAA AAGTACAATT
1621   GATTTAACTA AATCAATGGC GACTAGTGTA ATGAAGAAAT TTAGAAAATC AAAATTAGCT
1681   ACATCAATTT CAGAAATGAC TAATTCATTG TCAGATGCTG CTTCATCAGC ATCAAGAAAC
1741   GTTTCTATTA GATCGAATTT ATCTGCGATT TCAAATTGGA CTAATGTTTC AAATGATGTG
1801   TCAAACGTAA CTAATTCATT GAACGATATT TCAACACAAA CATCTACAAT TAGTAAGAAA
1861   CTTAGATTAA AAGAAATGAT TACTCAAAC GAAGGAATGA GCTTTGACGA CATTTAGCA
1921   GCTGTACTAA AAACAAAAAT AGATATGTCT ACTCAAATTG GAAAAAATAC TTTACCTGAT
1981   ATAGTTACAG AAGCATCTGA GAAATTTATT CAAAACGAT CATATCGAAT ATTAAGGAT
2041   GATGAAGTAA TGGAAATTAA TACTGAAGGA AAATTCCTTG CATACAAAAT TAATACATTT
2101   GATGAAGTGC CATTCCGATG AAATAAATTC GCTGAACTAG TAACAGATTC TCCAGTTATA
2161   TCAGCCATAA TCGATTTTAA GACATTGAAA AATTTAAATG ATAATTATGG AATCACTCGT
2221   ACAGAAGCGT TAAATTTAAT TAAATCGAAT CCAAATATGT TACGTAATTT CATTAAATCAA
2281   AATAATCCAA TTATAAGGAA TAGAATTGAA CAGTTAATAC TACAATGTAA ATTGTGAgaa
2341   cgctattgag gatgtgacc

```

Fig. 2A secuencia VP7 de P43

```

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

Fig. 2B secuencia VP7 de P43 - (RIX4414 VP7; 1046 pb)

```

1      ggctttaaaa gagagaattt ccgctcggct aacggtagc tcctttaAT GTATGGTATT
61     GAATATACCA CAATTCTAAT CTTTCTGATA TCAATTATTC TACTCAACTA TATATTAAAA
121    TCAGTAACTC GAATAATGGA CTACATTATA TATAGATCTT TGTGATTTA TGTAGCATTa
181    TTTGCCTTGA CAAGAGCTCA GAATTATGGG CTTAACTTAC CAATAACAGG ATCAATGGAC
241    ACTGTATACG CTAACTCTAC TCAAGAAGGA ATATTTCTAA CATCCACATT ATGTTTGTAT
301    TATCCAAC TG AAGCAAGTAC TCAAATTAAT GATGGTGAAT GGAAAGACTC ATTGTCACAA
361    ATGTTTCTCA CAAAAGGTTG GCCAACAGGA TCAGTCTATT TAAAGAGTA TTCAAGTATT
421    GTTGATTTTT CTGTCGATCC ACAATTATAT TGTGATTATA ACTTAGTACT AATGAAATAT
481    GATCAAAATC TTGAATTAGA TATGTCAGAG TTAGCTGATT TAATATTGAA TGAATGGTTA
541    TGTAATCCAA TGGATATAAC ATTATATTAT TATCAACAAT CGGGAGAATC AAATAAGTGG
601    ATATCAATGG GATCATCATG TACTGTGAAA GTGTGTCCAC TGAATACGCA AATGTTAGGA
661    ATAGGTTGTC AAACAACAAA TGTAGACTCG TTTGAAATGG TTGCTGAGAA TGAGAAAATTA
721    GCTATAGTGG ATGTCGTTGA TGGGATAAAT CATAAAATAA ATTTGACAAC TACGACATGT
781    ACTATTCGAA ATTTGAAGAA GTTAGGTCCA AGAGAGAATG TAGCTGTAAT ACAAGTTGGT
841    GGCTCTAATG TATTAGACAT AACAGCAGAT CCAACGACTA ATCCACAAAC TGAGAGAATG
901    ATGAGAGTGA ATTGGAAAAA ATGGTGGCAA GTATTTTATA CTATAGTAGA TTATATTAAC
961    CAAATCGTGC AGGTAATGTC CAAAAGATCA AGATCATTAA ATTCTGCAGC TTTTATTAT
1021  AGAGTATAGa tatatcttag attaga
    
```

**Figura 3 - Secuencia de polipéptidos de P43 VP4. (RIX4414 VP4.pro; 775 aa)**

```

1   MASLIYRQLL TNSYSVDLHD EIEQIGSEKT QNVTINPGPF AQTRYAPVNW DHGEINDSTT
61  VEPILDGPYQ PTFFTPNDY WILINSNTNG VVYESTNNSD FWTAVVAIEP HVNPNVDRQYM
121 IFGESKQFNV SNDSNKWKFL EMFRSSSQNE FYNRRTLTSO TRLVGIFKYG GRVWTFHGET
181 PRATDSSST ANLNNISITI HSEFYIIPRS QESKCNEYIN NGLPPIQNTR NVVPLPLSSR
241 SIQYKRAQVN EDIIVSKTSL WKEMQYNRDI IIRFKFGNSI VKMGGLGYKW SEISYKAANY
301 QYNYLRDGEQ VTAHTTCSVN GVNNFSYNGG FLPTDFGISR YEVIKENSIV YVDYWDDSKA
361 FRNMVYVRSL AANLNSVKCT GGSYYFSIPV GAWPVMNGGA VSLHFAGVTL STQFTDFVSL
421 NSLRFRLFSLT VDEPPFSILR TRTVNLYGLP AANPNNGNEY YEISGRFSLI SLVPTNDDYQ
481 TPIMNSVTVR QDLERQLTDL REEFNLSLSE IAMAQLIDLA LLPLDMFSMF SGIKSTIDLT
541 KSMATSVMKK FRKSKLATS I SEMTNSLSDA ASSASRNVSI RSNLSAISNW TNVSNVDSNV
601 TNSLNDISTQ TSTISKLLRL KEMITQTEGM SFDDISAAVL KTKIDMSTQI GKNTLPDIVT
661 EASEKFIPKR SYRILKDDEV MEINTEGKFF AYKINTFDEV PFDVNKFAEL VTDSPVISAI
721 IDFKTLKLNLD DNYGITRTEA LNLIKSNPNM LRNFINQNNP IIRNRIEQLI LQCKL

```

**Figura 4 - Secuencia de polipéptidos de P43 VP7 (RIX4414 VP7.pro; 326 aa).**

```

1   MYGIEYTTIL IFLISIILLN YILKSVTRIM DYIYRSLLI YVALFALTRA QNYGLNLPIT
61  GSMDTVYANS TQEGIFLTST LCLYYPTAS TQINDGEWKD SLSQMFLTKG WPTGSVYFKE
121 YSSIVDFSVD PQLYCDYNLV LMKYDQNLLE DMSELADLIL NEWLCNPMDI TLYYYQQSGE
181 SNKWISMGSS CTVKVCPLNT QMLGIGCQTT NVDSFEMVAE NEKLAIVDVV DGINHKINLT
241 TTTCTIRNCK KLGPRENVAV IQVGGSNVLD ITADPTTNPQ TERMMRVNWK KWWQVFYTIIV
301 DYINQIVQVM SKRSRSLNSA AFYYRV

```

Figura 5 - Secuencia de polipéptidos de la proteína NSP4 de RIX4414 (175 aa).

```

1   MDKLADLNYT LSVITLMNDT LHSIIQDPGM AYFSYIASVL TVLFIHKAS IPTMKIALKT
61  SKCSYKVIKY CIVTIINTLL KLAGYKEQVT TKDEIEQQMD RIVKEMRRQL DMIDKLTTRE
121 IEQVELLKRI HDNLITRPVD VIDMSKEFNQ KNIKTLDEWE SGKNPYEPSE VTASM
    
```

Figura 6 - Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína NSP4 de RIX4414 (750 pb).

```

1   ggcttttaaa agttctgttc cgagagagcg cgtgcggaaa gatggataag ctgccgacc
61  TCAACTACAC ATTGAGTGTA ATCACTTTAA TGAATGACAC ATTGCATTCT ATAATTCAAG
121 ATCCTGGAAT GGCCTATTTT TCATATATTG CATCTGTTCT AACAGTTTTA TTCATATTAC
181 ATAAAGCTTC AATTCCAACC ATGAAAATAG CATTGAAAAC ATCAAAATGT TCATATAAAG
241 TGATTAAATA TTGTATAGTC ACGATCATTA ATACTCTTTT AAAATTGGCT GGATATAAAG
301 AGCAGGTAC TACAAAAGAC GAAATTGAGC AACAGATGGA CAGAATTGTT AAAGAGATGA
361 GACGTCAGCT GGATATGATT GATAAATTAA CTACTCGTGA AATTGAACAG GTTGAATTGC
421 TTAAACGTAT ACATGACAAC CTGATAACTA GACCAGTTGA CGTCATAGAT ATGTCCGAAGG
481 AATTCAATCA GAAAAACATC AAAACGCTAG ATGAATGGGA GAGTGGAAAA AATCCATATG
541 AACCGTCAGA AGTGACTGCA TCCATGTGAg aggttgagtt accgtcgtct gtcttcggaa
601 gcggcggaac tcttcaccgc aagccccatt agacctgatg attgactgag aagccacagt
661 caatcatatc gcgtgtggct cagccttaat cccgtttaac caatccagcg agtgttgacc
721 gttaatggaa ggaatggtct tagtgtgacc
    
```

Figura 7 - Secuencia de polipéptidos de la proteína VP6 de RIX4414 (397 aa).

```

1  MEVLYSLSKT LKDARDKIVE GTLYSNVSDL IQQFNQMIVT MNGNDFQGTG IGNLFPVRNWT
61  FDFGLLGTTL LNLDANYVEN ARTTIEYFID FIDNVCMDM ARESQRNGVS PQSEALRKLA
121 GIKFKRINFD NSSEYIENWN LQNRQRGTG VFHKPNIFPY SASFTLNRSQ PMHDNLMGTM
181 WLNAGSEIQV AGFDYSCAIN APANIQQFEH IVQLRRALTT ATITLLPDAE RFSFPRVINS
241 ADGATTWFFN PVILRPNNVE VEFLLNGQII NTYQARFGTI IARNFDTIRL LFQLMRPPNM
301 TPAVNALFPQ AQPFOHHATV GLTLRIESAV CESVLADANE TLLANVTAVR QEYAI PVGPGV
361 FPPGMNWTLE ITNYSPSRED NLQRVFTVAS IRSMLIK
    
```

Figura 8 - Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína VP6 de RIX4414 (1356 pb).

```

1  ggctttaaaa cgaagctcttc gacATGGAGG TTCTGTACTC ACTGTCAAAA ACTCTTAAAG
61  ATGCTAGGGA CAAAATTGTT GAAGGTACAT TATATTCTAA CGTTAGCGAT CTTATTTCAGC
121 AATTCAATCA AATGATAGTA ACTATGAATG GAAATGACTT TCAGACTGGA GGAATTGGTA
181 ATTTACCTGT TAGAAATTGG ACTTTCGATT TTGGTCTATT AGGTACAACA CTTTTGAACT
241 TGGATGCTAA TTATGTTGAG AATGCAAGAA CTACAATTGA ATATTTTATT GACTTTATTG
301 ATAATGTATG TATGGATGAA ATGGCAAGAG AATCTCAAAG AAATGGAGTA TCGCCACAAT
361 CTGAAGCGTT AAGAAAGCTA GCGGGAATTA AATTTAAGAG AATAAATTTT GATAATTCAT
421 CAGAATACAT AGAAAATTGG AACTTACAAA ATAGAAGACA GCGCACCGGA TTTGTTTTTC
481 ATAAACCTAA CTTTTTCCA TACTCAGCTT CATTACTCT AAATAGATCT CAACCAATGC
541 ATGATAATTT AATGGGAACC ATGTGGCTTA ATGCTGGATC AGAAATTC AA GTGGCTGGAT
601 TTGATTACTC ATGCGCCATA AATGCACCAG CGAACATACA GCAATTTGAG CATATCGTTC
661 AGCTTAGGCG CGCACTGACT ACAGCTACTA TAACTTTATT ACCTGATGCA GAGAGATTTA
721 GTTTTCCAAG AGTAATTAAT TCAGCTGATG GCGCGACTAC ATGGTTCTTT AATCCAGTTA
781 TTCTAAGACC AAACAATGTA GAGGTAGAAT TTTTATTGAA TGGACAAAT ATTAATACAT
841 ATCAGGCTAG ATTTGGTACT ATCATCGCAA GAAATTTTGA TACAATTCGT TTATTATTTT
901 AGTTGATGCG TCCACCTAAT ATGACACCAG CTGTTAATGC ACTATTTCCA CAAGCACAAC
961 CTTTTCAGCA CCATGCAACA GTTGGACTTA CATTACGTAT TGAATCTGCG GTTTGTGAAT
1021 CAGTGCTTGC GGACGCGAAT GAAACTCTGT TAGCAAATGT GACCGCGGTG CGTCAAGAAT
1081 ATGCCATAAC AGTTGGACCG GTATTTCCAC CAGGCATGAA TTGGACTGAA TTGATTACTA
1141 ACTATTGCGC ATCTAGAGAA GATAACTTGC AACGCGTTTT CACGGTAGCT TCCATTAGAA
1201 GCATGTTGAT TAAGTGAgga ccagactaaa catctggtat ccaatcttag ttagcatgta
1261 gctacatcaa gtcattcaga ctcttcaagt aaggacatga tttcatgttc gctacgtaga
1321 gtaactgtct gaatgatgta gtgagaggat gtgacc
    
```