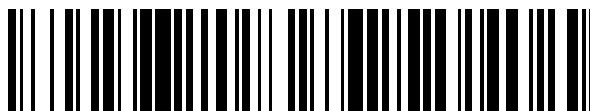


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 394**

51 Int. Cl.:

A61K 39/15 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2004** **E 10176849 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016** **EP 2272532**

54 Título: **Vacuna de rotavirus**

30 Prioridad:

02.09.2003 US 499430 P
01.07.2004 GB 0414787

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2016

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 2 566 394 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

Campo de la invención

5 La invención se refiere al uso de una población de rotavirus atenuados de un serotipo de rotavirus en la prevención de las enfermedades asociadas con la infección por rotavirus de otros serotipos de rotavirus. En particular, la invención se refiere al uso de una población de rotavirus atenuados del serotipo G1 en la prevención de enfermedad asociada con la infección por rotavirus de serotipos que no son G1.

Antecedentes

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

15 Los rotavirus se han reconocido como una de las causas más importantes de la diarrea grave en bebés y niños pequeños (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 el rotavirus es responsable de más de un millón de muertes anualmente. La enfermedad inducida por el rotavirus afecta más generalmente a niños de entre 6 y 24 meses de edad y el pico de prevalencia de la enfermedad generalmente ocurre durante los meses más fríos en climas templados y durante el año en las áreas tropicales. Los rotavirus se transmiten generalmente de persona a persona por ruta oral-fecal con un período de incubación de desde aproximadamente 1 hasta
20 aproximadamente 3 días. A diferencia de la infección en el grupo de edad de 6 meses a 24 meses, los neonatos generalmente son asintomáticos o tienen solamente una enfermedad leve. En contraste con la enfermedad grave que se encuentra generalmente en los niños pequeños, la mayor parte de los adultos son protegidos como un resultado de una infección anterior por rotavirus, de modo que la mayor parte de las infecciones de los adultos son leves o asintomáticas (Offit, P.A. y col. Comp. Ther., 8 (8): páginas 21 a 26, 1982).

25 Los rotavirus son generalmente esféricos y su nombre se deriva de su estructura distintiva de la cápside exterior e interior o de doble cobertura. Generalmente, la estructura de la cápside de doble cobertura de un rotavirus rodea una cobertura de proteína interna o núcleo que contiene el genoma. El genoma de un rotavirus está compuesto de 11 segmentos de ARN bicatenario que codifica al menos 11 proteínas virales diferentes. Dos de estas proteínas virales denominadas como VP4 y VP7 están dispuestas en el exterior de la estructura de la cápside de doble cobertura. La
30 cápside interior del rotavirus presenta una proteína, que es la proteína del rotavirus denominada VP6. La importancia relativa de estas tres proteínas particulares del rotavirus en promover la respuesta inmune que sigue a la infección por el rotavirus todavía no está clara. Sin embargo, la proteína VP6 determina el antígeno de grupo y de subgrupo y las proteínas VP4 y VP7 son las determinantes de la especificidad del serotipo.

35 Hasta la fecha, se han identificado al menos 14 serotipos G del rotavirus y 11 serotipos P del rotavirus (Linhares A.C. & Bresse J.S., Pan. Am. J. Publ. Health 2000, 9, 305-330). Entre estos, han sido identificados entre los rotavirus humanos 10 serotipos G y 6 serotipos P.

40 La proteína VP7 es una glucoproteína de PM 38.000 (PM 34.000 cuando no está glucosilada) que es el producto de la traducción del segmento genómico 7, 8 o 9, dependiendo de la cepa. Esta proteína estimula la formación de un anticuerpo neutralizante después de la infección por rotavirus. La proteína VP4 es una proteína no glucosilada de un PM de aproximadamente 88.000 que es el producto traduccional del segmento genómico 4. Esta proteína también estimula el anticuerpo neutralizante tras la infección por rotavirus.

Dado que las proteínas VP4 y VP7 son las proteínas virales contra las que están dirigidos los anticuerpos neutralizantes, se cree que son candidatos principales para el desarrollo de vacunas para el rotavirus, proporcionando protección contra la enfermedad por rotavirus.

45 Se sabe que la infección natural por el rotavirus durante la infancia temprana promueve la inmunidad protectora. Por lo tanto es altamente deseable una vacuna de rotavirus vivo atenuado. Preferentemente esta debería ser una vacuna oral, ya que esta es la vía natural de la infección del virus.

50 El desarrollo temprano de la vacuna para evitar las infecciones por el rotavirus comenzó en la década de los 70 después del descubrimiento del virus. Inicialmente, se estudiaron cepas atenuadas de animales y seres humanos y tuvieron resultados mezclados o decepcionantes. Los esfuerzos más recientes se han centrado en genomas reordenados humano-animal que han sido más exitosos.

55 Se ha descrito por Ward una cepa de rotavirus conocida como 89-12; véase el documento US 5474773 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 la enfermedad natural por rotavirus en 1988. De acuerdo con el documento US 5.474.773 el rotavirus humano HRV 89-12 se adaptó después para cultivo mediante 2 pases en células de riñón de

mono verde africano (AGMK) y 4 pases en células MA-104, tal como se describe por Ward en J. Clin. Microbiol., 19, 748-753, 1984. Se purificó después en placa 3 veces en células MA-104 (hasta el pase 9) y se cultivó después de 2 pases adicionales en estas células. Se hizo un pase adicional (pase 12) para su depósito en la ATCC con el número de referencia ATCC VR 2272. La cepa depositada se conoce como 89-12C2.

5 El artículo de 1998 en Vaccine por Bernstein y col. es al que nos referimos más adelante como el artículo de Vaccine (1998). El artículo describe la seguridad e inmunogenicidad de un candidato de vacuna de rotavirus humanos vivos administrados oralmente. Esta vacuna se obtuvo de la cepa 89-12 atenuada mediante pase sin purificación en placa 26 veces en células AGMK primarias y luego otras 7 veces en una línea celular AGMK establecida (33 pases en total).

10 En lo sucesivo, el material anteriormente mencionado que se ha pasado en serie 26 veces se citará como P26 y el material que se ha pasado en serie 33 veces se citará como P33. En general, el rotavirus derivado pasando 89-12 n veces se citará como Pn.

En los ejemplos que siguen el material P33 se pasó 5 veces adicionales en células Vero. Esto se cita como P38.

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

20 Se ha encontrado que la población P26 descrita en la bibliografía comprende una mezcla de variantes. Esto se ha establecido por caracterización genética según se describe más adelante en el presente documento (véanse los ejemplos). Por lo tanto P26 no es una población confiablemente consistente para pases adicionales, en particular para la producción de lotes de vacuna. De manera similar, P33 comprende una mezcla de variantes y no es confiablemente consistente para la producción de lotes de vacunas.

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

25 Además se ha descubierto que cuando el material P33 se administra a niños, se replican y excretan dos variantes identificadas. De los 100 niños vacunados, solamente 2 mostraron signos de gastroenteritis debido a la infección por rotavirus, mientras que se infectó el 20 % de un grupo de placebo. Estos descubrimientos sugieren que las variantes identificadas están asociadas con protección de la enfermedad del rotavirus.

30 El documento WO 0112797 desvela un procedimiento de separación de las variantes de rotavirus y una vacuna de rotavirus atenuado vivo mejorada derivada de una cepa de rotavirus humano clonada (homogénea). También se desvela una población de rotavirus atenuada (aislado), caracterizada por que comprende una sola variante o sustancialmente una sola variante, definida dicha variante por la secuencia de nucleótidos que codifican al menos una de las proteínas principales del virus denominadas VP4 y VP7. La eficacia protectora de dicha vacuna de rotavirus humano atenuado oral contra la cepa heteróloga G9 se ha reportado en niños de América Latina (Pérez y col., 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC 2002), 27-30 de septiembre 2002, San Diego).

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es la secuencia de nucleótidos que codifican la proteína VP4 de P43.

La figura 2 es la secuencia de nucleótidos que codifican la proteína VP7 de P43.

Descripción detallada de la invención

La invención, en su sentido más amplio, es como se detalla en las reivindicaciones independientes.

45 En un aspecto de la invención, se proporciona un uso de una cepa de rotavirus humano atenuada de un serotipo G1 en la preparación de una composición para inducir una respuesta inmune contra infección por rotavirus del G1 y al menos dos de los serotipos de rotavirus no G1 seleccionados del grupo que consiste en: serotipos G2, G3, G4 y G9, en los que la cepa de rotavirus atenuada es una variante de rotavirus individual, o sustancialmente una variante de rotavirus individual, que tiene un gen VP4 que comprende, en la secuencia de nucleótidos al menos uno de los siguientes: una adenina (A) en las posiciones 788 y 802 y una timina (T) en posición 501 a partir del codón de inicio; y/o en la que el gen VP7 comprende, en la secuencia de nucleótidos al menos uno de los siguientes: una timina (T) en la posición 605 y una adenina (A) en la posición 897 a partir del codón de inicio.

50 En la presente divulgación, los inventores han determinado que una población de rotavirus atenuada caracterizada por que comprende una sola variante o sustancialmente una sola variante, dicha variante definida por una secuencia de nucleótidos que codifican al menos una de las proteínas víricas principales denominada como VP4 y VP7, puede utilizarse como vacuna para proporcionar una protección cruzada contra la enfermedad ocasionada por la infección por rotavirus de un serotipo diferente al utilizado en la vacuna.

En particular, la divulgación describe que una población de rotavirus G1, [por ejemplo como la depositada en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales (ECACC), Laboratorio de Investigación y Producción de Vacunas, Servicio de Laboratorio de Salud Pública, Centro de Microbiología e Investigación Aplicada, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 OJG, Reino Unido, el 13 de agosto de 1999 con el número de depósito 99081301, según los términos del Tratado de Budapest], se puede utilizar para evitar la enfermedad causada tanto por el serotipo G1 como por al menos un serotipo de rotavirus no G1, tal como los serotipos del rotavirus G2, G3, G4 y G9.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención se refiere al uso de una población de rotavirus atenuada de un serotipo del rotavirus en la prevención de la enfermedad asociada con la infección por rotavirus de otros serotipos de rotavirus, en el que el serotipo se define por referencia a una secuencia de la proteína G del rotavirus.

En un aspecto, la divulgación describe una población de rotavirus caracterizada porque comprende una sola variante o sustancialmente una sola variante, definida dicha variante por una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una de las proteínas víricas principales denominada como VP4 y VP7.

En un aspecto, la divulgación describe una población de rotavirus para su uso para proporcionar un efecto de protección cruzada que comprende proteínas víricas VP4 y/o VP7 del depósito 99081301 de ECACC.

En particular, puede usarse una población de rotavirus atenuados de G1 compuesta de una sola variante de rotavirus, o de sustancialmente una sola variante de rotavirus, que tiene un gen VP4 que comprende, en la secuencia de nucleótidos, al menos uno de los siguientes: una adenina (A) en las posiciones 788 y 802 y una timina (T) en la posición 501 desde el codón de inicio; y/o 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 inicio, [por ejemplo la depositada en la Colección Europea de Cultivos de Células de Animales (ECACC), Laboratorio de Producción e Investigación de Vacunas, Servicio de Laboratorio de Salud Pública, Centro de Microbiología e Investigación Aplicada, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 OJG, Reino Unido en el 13 de agosto de 1999, con el número de depósito 99081301, según los términos del Tratado de Budapest], para prevenir la enfermedad causada por G1 y al menos dos, más preferentemente al menos tres, lo más preferentemente al menos cuatro serotipos de rotavirus no de G1 seleccionados del grupo que consiste en: G2, G3, G4 y G9.

En particular, de acuerdo con la presente divulgación, se ha descrito el uso de una cepa de rotavirus atenuada a partir de un serotipo G1 en la elaboración de una composición de vacuna para la inducción de una respuesta inmune contra un rotavirus que no es G1 o G9. Además se desvela una respuesta inmune inducida contra dos o más serotipos de rotavirus, no siendo estos serotipos G1 o G9. Típicamente cualquier serotipo distinto de G1 o G9 está seleccionado de la lista que consiste en: G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G10, G11, G12, G13 y G14. Se prefiere tener protección heterotípica contra al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, más preferentemente al menos cinco o más de estos serotipos diferentes a aquel de la composición de vacuna. Lo más preferentemente se induce una respuesta inmune contra todos de los siguientes serotipos no G1: G2, G3, G4 y G9.

La divulgación también se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta inmune contra la infección por rotavirus a partir de un serotipo de rotavirus, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto una composición que comprende una vacuna de rotavirus atenuado a partir de un serotipo diferente.

En un aspecto, la divulgación describe un procedimiento de inducción de una respuesta inmune contra el serotipo no G9 de rotavirus, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto una composición que comprende una vacuna de serotipo de rotavirus G1 que comprende una variante individual o sustancialmente una variante individual según se define en el presente documento.

La población de rotavirus dentro de la composición de la vacuna para su uso de acuerdo con la invención puede ser de especificidad G1P1A P[8]. La divulgación en esto es una población de rotavirus que comprende las proteínas víricas VP4 y/o VP7 del depósito 99081301 de ECACC que son adecuadas para provocar una respuesta inmune y típicamente, proporcionan un efecto protector cruzado. De acuerdo con una realización, la vacuna de rotavirus para su uso de acuerdo con la invención es como se define en las reivindicaciones y procedente del depósito 99081301 de ECACC.

En otro aspecto, la divulgación excluye el uso de la cepa de rotavirus correspondiente a ECACC 99081301, en un procedimiento o uso como se indica anteriormente para inducir una respuesta inmune al serotipo G9 solo, aunque generalmente no está excluido el uso de dicha cepa G1 para la inducción de las respuestas inmunes contra G9 en combinación con la inducción de respuestas inmunes contra otros serotipos G.

La divulgación se refiere a las cepas de rotavirus G1P8 en procedimientos o usos según se describen anteriormente.

Preferentemente la vacuna es para su administración en un régimen de 2 dosis.

En una realización, la vacuna para su uso de acuerdo con la invención proporciona protección cruzada contra la gastroenteritis. De acuerdo con esto, en otro aspecto se proporciona un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que la composición es hasta el 60 % protectora en una población de individuos vacunados contra la

- diarrea causada por la infección de rotavirus de al menos dos serotipos no G1. En otro aspecto, se proporciona un uso de acuerdo con la invención, en el que la composición es hasta el 81 % protectora contra la gastroenteritis causada por infección de rotavirus de al menos dos serotipos no G1. En un aspecto adicional más, se proporciona un uso de acuerdo con la presente invención en el que la composición comprende una cepa de rotavirus G1 que es hasta el 83 % protectora en una población de individuos vacunados contra la gastroenteritis grave causada por infección de rotavirus de al menos dos serotipos no G1.
- Preferentemente el índice de protección contra la diarrea y/o la gastroenteritis y/o la gastroenteritis grave logrado en una población de individuos vacunados infectados por un rotavirus de un tipo diferente al del rotavirus atenuado presente en la composición, es de entre el 10 % y el 90 %, más preferentemente entre el 20 % y el 80 %, lo más preferentemente al menos el 50 %.
- La vacuna de rotavirus para su uso de acuerdo con la invención para proporcionar protección cruzada tiene las siguientes características preferidas:
- Preferentemente la población de rotavirus para su uso de acuerdo con la presente invención es una variante clonada según se define en las reivindicaciones.
- Por una población que comprende una sola variante, o sustancialmente una sola variante, se entiende una población de rotavirus que no contiene más del 10 % y preferentemente menos del 5 % y lo más preferentemente menos del 1 % de una variante o variantes diferentes. Las poblaciones de virus pueden purificarse hasta la homogeneidad o la homogeneidad sustancial pasándolas en tipos celulares adecuados o realizando una serie de una o más etapas de clonación.
- Una ventaja de la invención es que una población que comprende una sola variante es más adecuada para la formulación de un lote de vacuna consistente. Las variantes particulares definidas por las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas virales principales pueden asociarse también con una eficacia mejorada en la prevención de la infección por rotavirus.
- En un aspecto preferido, la única variante o la variante sustancialmente única en la población de rotavirus para su uso de acuerdo con la invención es una variante en la que el gen VP4 comprende una secuencia de nucleótidos que comprende al menos uno de lo siguiente: una base de adenina (A) en la posición 788, una base de adenina (A) en la posición 802 una base de adenina (A) en la posición 802 y una base de timina (T) en la posición 501 a partir del codón de inicio.
- En un aspecto adicional, la variante única o la variante sustancialmente única en la población de rotavirus para su uso de acuerdo con la invención es una variante en la que el gen VP7 comprende una secuencia de nucleótidos que comprende al menos uno de lo siguiente: 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 inicio. Preferentemente, en la posición 897 hay una adenina (A).
- En un aspecto preferido la variante única en la población de rotavirus para su 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 inicio en la secuencia génica de VP4.
- En otro aspecto preferido, la variante única en la población de rotavirus para su uso de acuerdo con la invención tiene una timina (T) en la posición 605 y una adenina/guanina (A/G) en la posición 897 a partir del codón de inicio en la secuencia de VP7. Lo más preferentemente, en la secuencia de VR7 hay una adenina (A) en la posición 897.
- En un aspecto, la variante única en la población de rotavirus para su uso de acuerdo con la invención tiene una adenina (A) en las posiciones 788 y 802 y una timina (T) en la posición 501 desde el codón de inicio en la secuencia de VP7 y una timina (T) en la posición 605 y una guanina (G) en la posición 897 desde el codón de inicio en la secuencia de VP7.
- En otro aspecto, la divulgación describe una variante única que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína VP4 en la que la secuencia de nucleótidos es como se muestra en la figura 1, y/o una secuencia de nucleótidos que codifican una proteína VP7 en la que la secuencia de nucleótidos es como se muestra en la figura 2.
- Las poblaciones de rotavirus para su uso en la presente invención se pueden obtener por un procedimiento que comprende:
- pasar una preparación de rotavirus en un tipo celular adecuado;
opcionalmente seleccionar un cultivo homogéneo utilizando las etapas de:
- dilución limitante; o
 - aislamiento en placa individual; y

revisar la presencia de una variante sustancialmente única llevando a cabo una determinación de secuencia de una región adecuada de la secuencia del gen VP4 y/o VP7.

Preferentemente la población se deriva de las cepas P33 o P26 según se describe anteriormente.

- 5 La determinación de secuencia se puede llevar a cabo de manera adecuada mediante una técnica de hibridación cuantitativa o semi-cuantitativa, tal como hibridación de transferencia por ranura o hibridación en placa.

Preferentemente la variante seleccionada en una variante que se replica y excreta cuando la preparación de rotavirus de partida se administra a un sujeto humano, en particular a un niño.

La población del virus clonado resultante que resulta del procedimiento descrito anteriormente puede amplificarse mediante pase adicional en una línea celular adecuada.

- 10 Los tipos celulares adecuados para pasar la población de rotavirus en el procedimiento anterior incluyen las células de riñón del mono verde africano (AGMK), que pueden ser líneas celulares establecidas o células AGMK primarias. Las líneas celulares AGMK adecuadas incluyen por ejemplo, células Vero (ATCC CCL-81), DBS-FRHL-2 (ATCC CL-160), BSC-1 (ECACC 85011422) y CV-1 (ATCC CCL-70). También son adecuadas las líneas celulares MA-104 (macaco de la India) y MRC-5 (ser humano ATCC CCL-171). Las células Vero se prefieren particularmente para
15 propósitos de amplificación. El pase en las células Vero da un rendimiento alto del virus.

Las técnicas para revisar si existe una sola variante en una población de virus resultante del procedimiento anterior y para determinar la naturaleza de esa sola variante implican secuenciación estándar o procedimientos de hibridación conocidos en la técnica y que se describen más adelante.

- 20 En un aspecto, la divulgación describe un procedimiento para preparar una población de rotavirus adecuada para su uso de acuerdo con la invención, usando un rotavirus que tiene las características de la cepa 89-12 o de un derivado de la misma que ha sido sometido a pases.

Una población de una sola variante para su uso de acuerdo con la invención es P43, que se obtuvo a partir de P33 (un rotavirus humano aislado pasado 33 veces en cultivo en tipos celulares apropiados) por una serie de etapas de clonación de dilución final seguidas por pase del material clonado en células Vero para su amplificación.

- 25 Se depositó una población de P43 en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales (ECACC), Laboratorio de Producción e Investigación de Vacunas, Servicio de Laboratorio de Salud Pública, Centro de Microbiología e Investigación Aplicada, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 OJG, Reino Unido, el 13 de agosto de 1999 con el número de depósito 99081301, según los términos del Tratado de Budapest.

- 30 Aunque esta disponibilidad pública indicada es el procedimiento más simple para obtener el rotavirus humano P43, se pueden producir rotavirus similares y funcionalmente sustancialmente idénticos mediante estos u otros procedimientos a la vista de las enseñanzas de la presente divulgación. Dichos rotavirus funcionalmente sustancialmente idénticos se considera que son biológicamente equivalentes al rotavirus humano P43 descrito en el presente documento y por lo tanto su uso de acuerdo con la invención está dentro del ámbito general de la presente invención. Por lo tanto se entenderá que la divulgación comprende poblaciones de rotavirus que tienen las
35 características de la variante P43 como se describe en el presente documento.

También se entenderá que la divulgación abarca materiales derivados de la variante P43 ECACC 99081301 depositada sometiéndola a procesamiento adicional tal como propagándola por pases adicionales, clonación o por otros procedimientos usando el virus vivo o modificando P43 de cualquier modo incluyendo técnicas de ingeniería genética o técnicas de reagrupamiento de genoma. Dichas etapas y técnicas se conocen bien en la técnica.

- 40 Los materiales derivados del P43 depositado que se describen en la divulgación incluyen el material proteico y genético. Son de particular interés los rotavirus de genoma reagrupado que comprenden al menos un antígeno o al menos un segmento de P43, por ejemplo los genomas reagrupados que comprenden una cepa virulenta del rotavirus en la que uno o parte de uno de los 11 segmentos del genoma se han reemplazado por el segmento del genoma o parte del mismo de P43. Específicamente, puede tener propiedades útiles un genoma reagrupado en el
45 que el segmento o segmento parcial que codifica NSP4 es un segmento o segmento parcial de P43. Se conocen bien los rotavirus de genoma reagrupado y las técnicas para prepararlos (Foster, R. H. y Wagstaff, A. J. Tetravalent Rotavirus Vaccine, a review. ADIS drug evaluation, BioDrugs, 9 (2), 155-178, 1998).

- Los materiales de interés particular son la progenie de P43 y los derivados inmunológicamente activos de P43. Derivados inmunológicamente activos quiere decir materiales obtenidos de o con el virus P43, particularmente
50 antígenos del virus que tienen la capacidad de provocar una respuesta inmune que es reactiva contra el rotavirus cuando se inyecta en un animal hospedador.

En la adaptación del rotavirus a una línea celular adecuada, por ejemplo, células Vero, puede ser necesario tratar al virus para eliminar cualquier contaminante potencial, tal como cualquier agente adventicio que pueda estar presente y que de otro modo pueda provocar contaminación. En el caso de virus adventicios sensibles al éter, esto puede

hacerse mediante tratamiento con éter, tal como se describe más adelante en el presente documento. La presente divulgación también se refiere a la inclusión de dicho tratamiento con éter como una etapa opcional en el procedimiento general para obtener un rotavirus vivo atenuado o una vacuna formulada con el mismo.

- 5 La cepa del rotavirus protectora cruzada para su uso de acuerdo con la presente invención, puede combinarse con otras cepas de rotavirus para proporcionar una protección adicional o una protección cruzada contra la infección o enfermedad por rotavirus.

- 10 Por lo tanto, también están dentro del alcance de la divulgación los usos de mezclas de P43 con otras variantes del rotavirus, por ejemplo, otras variantes clonadas, o con otros virus, en particular otros virus atenuados. Dichas mezclas son útiles en las vacunas para su uso de acuerdo con la presente invención que se describen más adelante en el presente documento.

La presente divulgación también describe vacuna de rotavirus vivo atenuado con capacidad para proporcionar protección cruzada, que comprende una población de sustancialmente una sola variante, mezclada con un adyuvante adecuado o con un vehículo farmacéutico.

- 15 En el presente documentos se desvela una vacuna de rotavirus que es una vacuna de rotavirus monovalente que contiene una sola cepa de rotavirus.

La presente divulgación describe una vacuna de rotavirus vivo particularmente ventajosa en la que el rotavirus vivo atenuado es un rotavirus humano y no causa intususcepción.

- 20 Los vehículos farmacéuticos adecuados para su uso con la cepa de rotavirus atenuada usada de acuerdo con la invención incluyen aquellos conocidos en la técnica como adecuados para la administración oral, especialmente a niños. Dichos vehículos incluyen y no están limitados a carbohidratos, polialcoholes, aminoácidos, hidróxido de aluminio, hidróxido de magnesio, hidroxiapatita, talco, óxido de titanio, hidróxido de hierro, estearato de magnesio, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina, gelatina, peptona vegetal, xantano, carragenano, goma arábiga; β -ciclodextrina.

- 25 La divulgación también proporciona un procedimiento para preparar una vacuna de rotavirus, por ejemplo, mediante la criodesecación del virus en presencia de estabilizantes adecuados o mezclando el virus con un adyuvante o vehículo farmacéutico adecuado.

- 30 También puede ser ventajoso formular el virus para su uso de acuerdo con la invención en vehículos basados en lípidos tales como virosomas o liposomas, en emulsiones de aceite en agua o con partículas portadoras. Como alternativa o además se pueden incluir en la formulación inmunoestimulantes tales como los conocidos en la técnica para las vacunas orales. Dichos inmunoestimulantes incluyen toxinas bacterianas, particularmente la toxina colérica (CT) en la forma de holotoxina (molécula completa) o solamente la cadena B (CTB) y la enterotoxina lábil al calor de *E. coli* (LT). Las LT mutadas (mLT), que tienen menos probabilidades de convertirse en su forma activa que la LT natural, se describen en los documentos WO 96/06627, WO 93/13202 y US 5.182.109.

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

- 40 Una discusión general de los vehículos y adyuvantes para la inmunización oral se puede encontrar en el documento Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach, editado por Powell y Newman, Plenum Press, Nueva York, 1995.

- 45 La divulgación también proporciona un procedimiento para vacunar a sujetos humanos, especialmente a niños, mediante la administración a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una composición de vacuna para su uso de acuerdo con la invención. Preferentemente, la vacuna viva atenuada se formula para administración oral.

- 50 En un aspecto, la divulgación describe una cepa de rotavirus atenuado para su uso de acuerdo con la invención formulada con un antiácido para minimizar la inactivación de la vacuna por ácido en el estómago. Los componentes antiácidos 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 usar en la invención incluyen Mylanta (marca comercial) que contiene hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio. Estos son insolubles en agua y se dan en suspensión.

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

También son adecuados como antiácidos en la vacuna para utilizar de acuerdo con la invención antiácidos orgánicos, tales como sales de carboxilato de ácidos orgánicos. Un antiácido preferido en la composición de vacuna para su uso de acuerdo con la invención contiene una sal carboxilato de ácido orgánico, preferentemente una sal de ácido cítrico tal como citrato de sodio o citrato de potasio.

- 5 Un antiácido particularmente preferido que puede ser utilizado en la composición de vacuna para su uso de acuerdo con la presente invención es la sal inorgánica insoluble, carbonato de calcio (CaCO_3). El carbonato de calcio es capaz de asociarse con el rotavirus y la actividad del rotavirus se mantiene durante la asociación con el carbonato de calcio.

- 10 Para evitar la sedimentación del carbonato de calcio durante la etapa de llenado, los agentes viscosos están presentes preferentemente en la formulación.

- Los agentes viscosos posibles que pueden utilizarse incluyen excipientes seudoplásticos. Una solución seudoplástica se define como una solución que tiene viscosidad más alta en reposo comparada con su viscosidad en agitación. Los excipientes de este tipo son polímeros naturales tales como goma arábica, goma de adraganto, agar-agar, alginatos, pectinas y polímeros semi-sintéticos, por ejemplo: carboximetilcelulosa (Tyloses C®), metilcelulosa (Methocels A®, Viscotrans MC®, Tylose MH® y MB®), hidroxipropilcelulosa (Klucels®) e hidroxipropilmetilcelulosa (Methocels E® y K®, Viscontrans MPHC®). En general, esos excipientes seudoplásticos se utilizan junto con agentes tixotrópicos. Los agentes viscosos alternativos que pueden usarse son excipientes seudoplásticos con baja capacidad de flujo. Esos polímeros, a una concentración suficiente, dan lugar a una disposición de fluido estructural que resulta en una solución de viscosidad alta que tiene capacidad de flujo baja en reposo. Necesita dársele una cierta cantidad de energía al sistema para permitir que fluya y se transfiera. Son necesarias energías externas (agitación) para destruir temporalmente la disposición de fluido estructural con el objeto de obtener una solución fluida.

Los ejemplos de tales polímeros son Carbopols® y la goma xantana.

- 25 Los excipientes tixotrópicos llegan a ser una estructura de gel en reposo mientras que en agitación forman una solución fluida. Los ejemplos de agentes tixotrópicos son Veegum® (silicato de magnesio-aluminio) y Avicel RC® (aproximadamente celulosa microcristalina al 89 % y carboximetilcelulosa de Na al 11 %).

La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la presente invención comprende preferentemente un agente viscoso seleccionado de goma xantana o almidón.

- 30 Por lo tanto, la composición de vacuna para su uso de acuerdo con la presente invención se puede formular con una combinación de carbonato de calcio y goma xantana.

Otros componentes de una composición para su uso de acuerdo con 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 agentes aromatizantes (particularmente para una vacuna oral) y agentes bacteriostáticos.

- 35 Se contemplan presentaciones diferentes de la composición de vacuna para su uso de acuerdo con la presente invención.

En un aspecto, la divulgación describe una vacuna para su uso de acuerdo con la invención que se administra como una formulación líquida. Preferentemente la formulación líquida se reconstituye antes de la administración a partir de al menos los dos componentes siguientes:

- 40 i) componente vírico
ii) componente líquido

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

- 45 Antes de la reconstitución, el virus puede estar en una forma seca o en una forma líquida. Preferentemente el componente vírico se liofiliza. El virus liofilizado es más estable que el virus en una solución acuosa. El virus liofilizado puede reconstituirse adecuadamente utilizando una composición antiácida líquida para producir una formulación de vacuna líquida. Como alternativa el virus liofilizado puede reconstituirse con agua o solución acuosa, en cuyo caso la composición de virus liofilizado preferentemente contiene un componente antiácido.

- 50 La formulación de vacuna para su uso de acuerdo con la invención puede comprender un componente vírico formulado con carbonato de calcio y goma xantana en un compartimento o recipiente y este se reconstituye con agua o solución acuosa presente en el segundo compartimento o recipiente.

En otro aspecto de la divulgación, la composición de vacuna para su uso de acuerdo con la invención es una

formulación sólida, preferentemente una torta liofilizada que es adecuada para su disolución inmediata cuando se coloca en la boca. Las formulaciones liofilizadas pueden proporcionarse de manera conveniente en forma de comprimidos en un paquete blíster farmacéutico.

5 En otro aspecto la divulgación describe una vacuna de rotavirus para su uso de acuerdo con la invención en forma de un comprimido de disolución rápida para administración oral.

En otro aspecto la divulgación describe una composición para su uso de acuerdo con la invención 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.

10 El comprimido de disolución rápida de acuerdo con la invención se puede disolver en la boca del sujeto lo suficientemente rápido como para evitar que se trague el comprimido sin disolver. Esta estrategia es particularmente ventajosa para vacunas pediátricas de rotavirus.

El virus para su uso de acuerdo con la invención es un rotavirus humano atenuado vivo que se puede formular con un antiácido inorgánico tal como carbonato de calcio y un agente viscoso tal como goma xantana.

15 En un aspecto adicional, la presente invención describe una formulación liofilizada en la que el componente del virus es cualquier cepa de rotavirus que se formula con carbonato de calcio y goma xantana.

20 Las vacunas para su uso de acuerdo con la invención pueden formularse y administrarse mediante técnicas conocidas, usando una cantidad adecuada del virus vivo para producir protección efectiva contra la infección por rotavirus sin los efectos secundarios adversos significativos de las vacunas típicas. Una cantidad adecuada de virus vivo estará generalmente entre 10^4 y 10^7 unidades de formación de foco (uff) por dosis. Una dosis típica de vacuna puede comprender 10^5 - 10^6 uff por dosis y se puede dar en varias dosis a lo largo de un período de tiempo, por ejemplo en dos dosis dadas con un intervalo de dos meses. Sin embargo se pueden obtener beneficios teniendo más de 2 dosis, por ejemplo un régimen de dosis de 3 o 4, particularmente en los países en desarrollo. El intervalo entre las dosis puede ser más o menos de dos meses de duración. Una cantidad óptima del virus vivo para una sola dosis o para un régimen de dosis múltiples y una temporización óptima para las dosis, pueden determinarse mediante estudios estándar que implican la observación de los títulos de anticuerpos y otras respuestas en los sujetos.

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

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

35 El intervalo de títulos de neutralización de todos los sueros probados es similar para P33, P38 y P43. El análisis estadístico no muestra ninguna diferencia significativa en los títulos de neutralización generales contra todos los tres virus. Esto sugiere que los epítomos de neutralización conformacionales y no conformacionales de P33, P38 y P43 se reconocen igualmente bien por los sueros anti-P33 de los niños vacunados con P33. Esta observación sugiere indirectamente que los epítomos de neutralización desvelados en este ensayo *in vitro* no se alteraron entre P33, P38 y P43.

40 El intervalo de títulos de neutralización del P89-12C2 sin embargo difiere de manera importante de P33, P38 y P43. Esta observación sugiere que los epítomos de neutralización conformacionales y no conformacionales de P33, P38 y P43 no son igualmente bien reconocidos por el suero anti-P33 de los niños vacunados con P33. Esta observación sugiere indirectamente que los epítomos de neutralización desvelados en este ensayo *in vitro* se alteraron entre 89-12C2 y P33, P38 y P43.

La presente divulgación también describe:

45 1. El uso de una cepa de rotavirus atenuada de un serotipo G1 en la fabricación de una composición de vacuna para la inducción de una respuesta inmune contra un rotavirus que no es G1 o G9, en el que la cepa de rotavirus atenuado es una sola variante de rotavirus o sustancialmente una sola variante de rotavirus que tiene un gen VP4 que comprende, en la secuencia de nucleótidos, al menos uno de los siguientes: una adenina (A) en las posiciones 788 y 802 y una timina (T) en la posición 501 desde el codón de inicio; y/o 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 inicio.

50 2. El uso de acuerdo con 1 en el que la respuesta inmune se induce adicionalmente contra la infección por rotavirus por un serotipo G9 y/o un serotipo G1.

3. El uso de acuerdo con 1 o 2 en el que la respuesta inmune se induce contra dos o más serotipos de rotavirus,

no siendo estos serotipos G1 o G9.

4. El uso según se reivindica en cualquiera de 1 a 3, en el que el serotipo distinto de los serotipos G1 o G9 se selecciona de la lista que consiste en: G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G10, G11, G12, G13 y G14.

5 5. El uso de acuerdo con cualquiera de 1 a 4, en el que se induce una respuesta inmune contra todos los siguientes serotipos no G1: G2, G3, G4 y G9, lo que constituye una realización de la invención.

6. El uso de acuerdo con cualquiera de 1 a 5, 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 de adenina (A) en la posición 788, una base de adenina (A) en la posición 802 y una base de timina (T) en la posición 501 desde el codón de inicio.

10 7. El uso de acuerdo con 6, en el que el gen VP4 comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una base de adenina (A) en las posiciones 788 y 802 y una base de timina (T) en la posición 501 desde el codón de inicio.

15 8. El uso de acuerdo con cualquiera de 1 a 5, 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 inicio.

9. El uso de acuerdo con 8, 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 inicio.

20 10. El uso de acuerdo con cualquiera de 1 a 9, 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 inicio; 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 inicio.

11. El uso de acuerdo con cualquiera de 1 a 10, en el que la composición es capaz de proteger frente a la gastroenteritis y/o la diarrea causada por la infección por un rotavirus de un tipo diferente al serotipo G1 del rotavirus atenuado presente en la composición.

25 12. El uso de acuerdo con 11, en el que la composición es protectora hasta un 83 % en una población de individuos vacunados contra la gastroenteritis grave causada por infección de rotavirus de al menos dos serotipos, siendo estos serotipos diferentes del serotipo G1 del rotavirus atenuado presente en la composición.

13. El uso de acuerdo con 12, en el que la gastroenteritis grave está causada por la infección por un rotavirus de al menos cuatro serotipos no G1.

30 14. El uso de acuerdo con 13, en el que los serotipos no G1 son los serotipos G2, G3, G4 y G9.

15. El uso de acuerdo con cualquiera de 1 a 14, en el que la cepa de rotavirus es el depósito 99081301 de ECACC, o puede obtenerse o derivarse a partir del depósito 99081301 de ECACC.

16. El uso de acuerdo con cualquiera de 1 a 15, en el que la vacuna se usa en un régimen de 2 dosis.

Los siguientes ejemplos, no limitativos, ilustran la invención.

35 Ejemplos

Los ejemplos 1-9 son ejemplos de la técnica anterior.

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

Secuenciación de los genes VP4 y VP7 a partir de lotes de países diferentes.

40 Se llevó a cabo la secuenciación de los genes VP4 y VP7 del pase P26 (células primarias AGMK), el pase P33 (establecido en la línea celular AGMK (opuesta a la primaria)), el pase P41 y el pase P43. La extracción de ARN total se transcribió de forma inversa y se amplificó por PCR en un tubo/una etapa.

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

45 La secuencia del pase P26 difiere de la secuencia del pase P33 por 3 bases (en las posiciones de 501, 788 y 802 pb a partir del codón de inicio) en VP4 y por tres bases en VP7 (108, 605 y 897 pb a partir del codón de inicio).

Las exploraciones de la secuencia del pase P26 de VP4 y VP7 muestran en las posiciones la presencia de la secuencia del pase P33 como un fondo. Así se puede ver que el pase P26 es una mezcla de al menos 2 variantes.

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

El pase P38 (derivado del paso 33) se pasó 5 veces en células Vero y presentó el mismo conjunto de secuencias de VP4 y VP7 que el pase P33 (línea celular AGMK). Así no hubo un cambio mayor en las poblaciones entre P33 y P38.

TABLA 1: oligonucleótidos utilizados para RT-PCR y secuenciación.

	nombre	secuencia	posición
VP7	Rota 1	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	-49 a -22
	Rota 1bis	GGT TAG CTC CTT TTA ATG TAT GGT A	-16 a 10
	Rota 2bis	GGT CAC ATC GAA CAA TTC TAA TCT AAG	1014-988
	Rota 7	CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G	266-287
	Rota 12	TGT TGA TTT TTC TGT CGA TCC AC	372-394
	Rota 46	GGT TGC TGA GAA TGA GAA ATT AGC TAT AGT GG	651-682
	Rota 18	CCA CTA TAG CTA ATT TCT CAT TCT CAG CAA CC	682-651
VP4	Rota 5	TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A	2-23
	Rota 6	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	878-859
	Rota 5bis	TGG CTT CAC TCA TTT ATA GAC A	2-23
	Rota 6bis	ATT TCA GAC CAT TTA TAA CCT AG	878-856
	Rota 25	GGA GTA GTA TAT GAA AGT ACA AAT AAT AG	268-296
	Rota 26	CTA TTA TTT GTA CTT TCA TAT ACT ACT CC	296-268
	Rota 27bis Rota 28	TCG ATA CAG TAT AAG AGA GCA CAA G	721-745
	Rota 31	TTC ATT AAC TTG TGC TCT CTT ATA CTG	753-727
	Rota 32	GTA TAT GTA GAC TAT TGG GAT G	1048-1070
	Rota 45	CAT CCC AAT AGT CTA CAT ATA C	1070-1048
	Rota 53	TGT AAC TCC GGC AAA ATG CAA CG	1205-1227
	Rota 54	CGT TGC ATT TTG CCG GAG TTA CA	1227-1205
	Rota 55	GTA AGA CAA GAT TTA GAG CGC CA	1465-1487
	Rota 40	TGG CGC TCT AAA TCT TGT CTT AC	1487-1465
	Rota 39	CTT GAT GCT GAT GAA GCA GCA TCT G	1703-1727
	Rota 33	CAG ATG CTG CTT CAT CAG CAT CAA G	1727-1703
	Rota 34	CGA TCA TAT CGA ATA TTA AAG GAT G	2008-2032
	Rota 29bis	CAT CCT TTA ATA TTC GAT ATG ATC G	2032-2008
		AGC GTT CAC ACA ATT TAC ATT GTA G	2335-2311

TABLA 2: oligonucleótidos utilizados en la hibridación

	nombre	secuencia	posición
VP7	Rota 41	AGT ATT TTA TAC TAT AGT AGA TTA TAT TAA TC	882-913
	Rota 42	AGT ATT TTA TAC TAT GGT AGA TTA TAT TAA TC	882-913
VP4	Rota 15	ATC CCC ATT ATA CTG CAT TCC TTT C	807-783
	Rota 16	ATC CCT ATT ATA CTG CAT TTC TTT C	807-783
	Rota 35	ATC CCC ATT ATA CTG CAT TTC TTT C	807-783
	Rota 36	ATC CCT ATT ATA CTG CAT TCC TTT C	807-783
Las bases mostradas en negrita en la Tabla 2 son los sitios de variación específica de secuencia en VP4 y VP7			

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

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 al nivel del lote de producción, el nucleótido de la posición VP7 897 pb es G, más que 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 que corresponden tanto al clon seleccionado P43 como el clon en el que hay una G en VP7 a 897 pb con respecto al codón de inicio, se excretaron en las deposiciones de los 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 mayor y la segunda es la base que aparece en una población menor. Las poblaciones de las variantes mayor y menor se juzgan por la fuerza de la señal en la secuenciación.

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

La tabla 3.2 muestra los cambios de aminoácidos resultantes de 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
Pases						
P26	-	+	+	+	nd	nd
P33	-	+	-	-	++	+
P38	-	+	-	-	+	++
P43	-	+	-	-	+	-

10 Hibridación de transferencia por ranuras

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

Para el fragmento de PCR de VP7 del material P33, la posición 897 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

Aislando los componentes de P33 como una población de virus homogénea, se llevaron a cabo tres diluciones de punto final del P33/AGMK en células Vero y el virus resultante se utilizó infectando las células Vero.

5 Los pocillos positivos se seleccionaron utilizando dos criterios: proliferación demostrada por el número más grande de focos detectados en los pocillos y los pocillos positivos más aislados en las placas, como se hace clásicamente. Después de 3 pasos de dilución final en placas de micro-titulación de 96 pocillos se amplificaron sucesivamente 10 pocillos positivos en células Vero y se evaluaron por su producción.

10 En base al rendimiento, se desarrollaron tres clones al nivel de paso de lote de producción. El reconocimiento inmunológico por los anticuerpos policlonales fue similar ambos tanto entre los tres clones como entre los clones y el P33. La homogeneidad de los clones se evaluó mediante la hibridación de transferencia por ranuras. La selección final de un solo clon estuvo basada en la producción y la secuencia.

El clon seleccionado se amplificó mediante pasos sucesivos en células Vero generando una semilla Maestra, una semilla de Trabajo y finalmente lotes de producción.

15 El clon seleccionado se caracterizó genéticamente en diferentes niveles de pasos por secuenciación de VP4 y VP7 (identidad) y por hibridación específica de transferencia por ranuras del VP4 y el VP7 (homogeneidad) de los materiales amplificados por PCR. La secuencia de los genes VP4 y VP7 del material P43 se dan en las figuras 1 y 2 respectivamente y son idénticas a la del P41. La homogeneidad del clon seleccionado se evaluó mediante una hibridación selectiva usando muestras de oligonucleótidos que discriminan los cambios de nucleótidos en las regiones VP4 y/o VP7 para cada variante identificada durante la elaboración de secuencia primaria de P26/AGMK (ver Tabla 4).

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

Estos resultados confirmaron que P43 es una población homogénea.

Ejemplo 3: remoción del virus adventicio potencial

25 Se agregó éter a P33 (cultivado en AGMK) a una concentración final del 20 % durante 1 hora. Luego se hizo burbujear el éter con N₂ durante 35 minutos. No se observó impacto alguno en el título de la semilla de P33.

Ejemplo 4: formulación de la vacuna viva atenuada

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

30 **1. Virus liofilizado**

Se utilizan técnicas estándar preparando las dosis de virus. Se descongela y diluye gran cantidad de virus purificado congelado con composición de medio apropiado, en este caso, medio Eagle modificado de Dulbecco, hasta una concentración vírica estándar deseada, en este caso 10^{6.2} uff/ml. El virus diluido se diluyó adicionalmente después con estabilizador de liofilización (4 % de sacarosa, 8 % de dextrano, 6 % de sorbitol, 4 % de aminoácidos) hasta un título viral objetivo, en este caso 10^{5.6} uff/dosis. Se transfieren asépticamente alícuotas de 0,5 ml de composición viral estabilizada a frascos de 3 ml. Cada frasco se cierra después parcialmente con una tapa de caucho, la muestra se seca por congelación al vacío, el frasco se cierra entonces completamente y se le acoda una tapa de aluminio en el lugar alrededor del frasco manteniendo el tapón en su lugar.

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

40 **(a) Reconstituyente de citrato**

El citrato de sodio se disuelve en agua, se esteriliza mediante filtración y se transfiere asépticamente en envases de reconstituyente en cantidades de 1,5 ml a una concentración de 544 mg de Na₃Citrate · 2H₂O por dosis de 1,5 ml. Los envases del reconstituyente pueden ser por ejemplo frascos de 3 ml, o frascos de 4 ml, o jeringas de 2 ml, o cápsulas suaves de plástico que se pueden exprimir para administración oral. Como una alternativa para mantener los componentes estériles en condiciones estériles, el contenedor final puede autoclavarse.

(b) Reconstituyente Al(OH)₃

50 Una suspensión de hidróxido de aluminio aséptica (Mylanta –marca comercial) se diluye asépticamente en agua estéril, transferida asépticamente a los contenedores de reconstituyente (por ejemplo, jeringas de 2 ml, o cápsulas de plástico suave que se pueden exprimir) en cantidades de 2 ml conteniendo cada una 48 mg de Al(OH)₃. Una alternativa para utilizar componentes estériles en condiciones estériles, es irradiar con γ la suspensión de hidróxido de aluminio (preferentemente en una fase diluida).

Se incluyeron ingredientes estándar evitando que la suspensión se asentara. Tales ingredientes estándar 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 estándar utilizados en alimentos y en aromatizantes.

5 2. Virus liofilizado con $\text{Al}(\text{OH})_3$ en formulación líquida

Se utilizaron técnicas estándar preparando dosis de virus. Se descongela y diluye gran cantidad de virus purificado congelado con composición de medio apropiado, en este caso medio Eagle modificado de Dulbecco, hasta una concentración viral estándar deseada, en este caso $10^{6.2}$ uff/ml. Se añadió suspensión de hidróxido de aluminio alcanzando una cantidad final de 48 mg/dosis y la composición del virus se diluye con estabilizador de liofilización (4 % de sacarosa, 8 % de dextrano, 6 % de sorbitol, 4 % de aminoácidos) hasta un título viral objetivo, en este caso $10^{5.6}$ uff/dosis. Se transfieren asépticamente alícuotas de 0,5 ml de composición viral estabilizada a frascos de 3 ml. Se lleva a cabo después la liofilización y el cierre de los frascos como se describe en la parte 1.

3. Virus liofilizado con $\text{Al}(\text{OH})_3$ para presentación de blíster

Se utilizan técnicas estándar para la preparación de dosis del virus. Se descongela y diluye gran cantidad de virus purificado congelado con composición de medio apropiado, en este caso medio Eagle modificado de Dulbecco, hasta una concentración vírica estándar deseada, en este caso $10^{6.2}$ uff/ml. Se agrega una suspensión de hidróxido de aluminio alcanzando una cantidad final de 48 mg/dosis y la composición del virus se diluye con estabilizador de liofilización que puede ser sacarosa, dextrano o 4 % de aminoácidos, o gelatina, o peptona vegetal, o xantana, hasta el título viral objetivo de $10^{5.6}$ uff/dosis. Se emplea una operación de llenado aseptica transfiriendo la dosis de 0,5 ml o preferentemente menos a las cavidades de blíster. La composición se liofiliza y las cavidades de las burbujas se sellan mediante sellado térmico.

Están incluidos ingredientes opcionales estándar evitando que la suspensión de hidróxido de aluminio se asiente. Dichos ingredientes estándar incluyen por ejemplo estearato de magnesio, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina y polímeros de silicona. También se pueden incluir saborizantes.

25 **Ejemplo 5: Titulación viral del rotavirus para varias formulaciones**

5.1: Comparación entre formulaciones basadas en lactosa y sacarosa:

Tabla 5

N.º de lote	Composición de la formulación	Título de virus antes de la liofilización	Título del virus después de la liofilización y 1 semana a 37°C
98G06/01	Lactosa: 2%; Dextrano: 4%; Sorbitol: 3%; Aminoácidos: 2%	$10^{5.22}$	$10^{4.67}$
98G06/03	Sacarosa: 2%; Dextrano: 4%; Sorbitol: 3%; Aminoácidos: 2%	$10^{5.28}$	$10^{4.92}$

El rotavirus P43 se formuló bien con sacarosa o bien con lactosa como se muestra en la tabla anterior.

30 El título del virus antes de la liofilización es el título viral en el líquido formulado terminado (que contiene sacarosa dextrano sorbitol aminoácidos) y sin la etapa de liofilización. Buenos resultados son aquellos en los que se logra una disminución de < 0,5 log en la etapa de liofilización y se logra disminución de < 0,5 log durante la "1 semana a 37 °C" (prueba de estabilidad acelerada). La precisión de la titulación vírica es de alrededor de + o - 0,2 log.

Los resultados indican que la sacarosa puede utilizarse en vez de lactosa.

35 **5.2: Efecto de arginina y reemplazo de sorbitol por maltitol:**

TABLA 6

N.º de lote	Composición de la formulación	Título del virus en el instante = cero después de la liofilización	Título del virus después de la liofilización y 1 semana a 37°C
98L16/01	Lactosa: 2%; Dextrano: 4%; Sorbitol: 3%; Aminoácidos: 2%	$10^{4,8}$	$10^{4,8}$
98L16/02	Lactosa: 2%; Dextrano: 4%; Sorbitol: 3%; Aminoácidos: 2%; Arginina: 3%	$10^{4,8}$	$10^{4,9}$
98L16/04	Lactosa: 2%; Dextrano: 4%; Maltitol: 3%; Aminoácidos: 2%; Arginina: 3%	$10^{4,7}$	10^5

Los resultados demuestran que la adición de arginina (que se sabe que mejora la estabilidad del virus durante la liofilización y que también proporciona un medio básico, con el objeto de compensar la acidez en el estómago) mantiene el título vírico.

El sorbitol tiende a disminuir la temperatura de transición vítrea de la torta liofilizada en gran medida. Esto puede superarse utilizando maltitol en vez de sorbitol como se muestra anteriormente y el título vírico todavía se mantiene.

5.3: Varias composiciones de formulación

Este experimento demuestra que son posibles un número de formulaciones.

Tabla 7

N.º de lote	Formulación de la composición	Título del virus antes de la liofilización	Título del virus después de la liofilización y 1 semana a 37°C
99C11/01	Sacarosa: 2%; Dextrano: 4%; Sorbitol: 3%; Aminoácidos: 2%	$10^{5,24}$	$10^{5,07}$
99C 11 /02	Sacarosa: 2%; Dextrano: 4%; Maltitol: 3%; Aminoácidos: 2%	$10^{5,09}$	$10^{4,92}$
99C11/04	Dextrano: 4%; Maltitol: 3%; Aminoácidos: 2%	$10^{4,89}$	$10^{5,06}$
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%	$10^{5,30}$	$10^{4,93}$

(continuación)

N.º de lote	Formulación de la composición	Título del virus antes de la liofilización	Título del virus después de la liofilización y 1 semana a 37°C
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%;	$10^{5,11}$	$10^{4,89}$
	Sorbitol: 1.5%;		

5.4: Asociación entre el rotavirus y el antiácido $\text{Al}(\text{OH})_3$

Tabla 8

Rotavirus	$\text{Al}(\text{OH})_3$	H_2O	Tiempo de contacto a temperatura ambiente	Centrifugación	Título de virus en sobrenadante en uff/ml	Título viral en sedimento en uff/ml
$10^{5,6}$ uff/ml	48 mg en 0,240ml	0,76 ml	30 min	8000rpm, 10 min	$10^{3,66}$	
$10^{5,6}$ uff/ml	0,48 mg en 0,240ml	0,76 ml	30 min	8000rpm, 10 min	$10^{4,41}$	
$10^{5,6}$ uff/ml		1 ml	30 min	8000rpm, 10 min	$10^{5,68}$	
Rotavirus en torta liofilizada	12 mg en 0,120ml	1,38 0ml	30 min	8000rpm, 10 min	Por debajo de la detección	$10^{4,7}$

5

Se utiliza el $\text{Al}(\text{OH})_3$ como un antiácido. Esto muestra que el rotavirus está asociado con la sal inorgánica insoluble $\text{Al}(\text{OH})_3$ desde que se centrifugó junto con el $\text{Al}(\text{OH})_3$ (disminución de la actividad viral en el sobrenadante).

5.5: Disolución del antiácido $\text{Al}(\text{OH})_3$ mediante citrato de sodio antes de la titulación vírica

Tabla 9

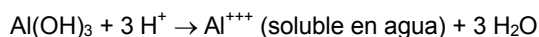
Muestras virales	Disolución	Condiciones	Títulos de virus uff/ml
99B10/06 formulación líquida antes de liofilización; $10^{5,43}$	1,5 ml de citrato de Na_3	24 h a temperatura ambiente	$10^{5,11}$
99B10/06: liofilizado $10^{5,43}$	1,5 ml de citrato de Na_3	24 h a temperatura ambiente	$10^{4,53}$

10

Cuando el rotavirus está asociado con el $\text{Al}(\text{OH})_3$, es posible liofilizar todo (incluyendo el $\text{Al}(\text{OH})_3$). Después de la liofilización, es posible recuperar el rotavirus disolviendo el $\text{Al}(\text{OH})_3$ en citrato de sodio. Esta etapa no daña el rotavirus y retiene su actividad después de esta etapa de disolución.

5.6: Infectividad del rotavirus después de la liberación de la asociación de $\text{Al}(\text{OH})_3$ -rotavirus:

15 El mecanismo de liberación del virus (mediante disolución del vehículo), puede ocurrir muy bien *in vivo*. Indudablemente por debajo de un pH 6, el hidróxido de aluminio se convierte en completamente soluble y así, el rotavirus se liberará en el estómago.



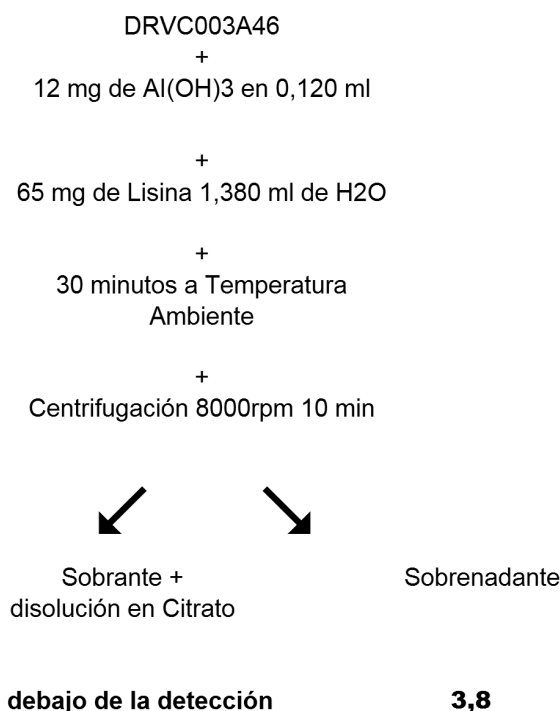
En el estómago, los iones de Al^{+++} no se absorben (J.J. Powel, R. Jugdaohsingh y R.P.H. Thompson, The regulation of mineral adsorption in the gastrointestinal track, Proceedings of the Nutrition Society (1999), 58, 147-153).

5 En el intestino, debido al aumento del pH, las formas insolubles del aluminio se precipitan (Al(OH)_3 o AlPO_4) y se eliminan por el medio natural.

Se desconoce si el precipitado de Al(OH)_3 (o AlPO_4) recientemente formado podrá volver a asociar con el rotavirus libre. Esto origina la pregunta de la infectividad de la asociación de Al(OH)_3 -rotavirus.

También es posible la liberación del rotavirus de la asociación de Al(OH)_3 -rotavirus por otros mecanismos. Por ejemplo, la lisina interfiere con la adsorción viral en el Al(OH)_3 .

10 Se sabe que otros aniones como borato, sulfato, carbonato y fosfato se adsorben específicamente en el hidróxido de aluminio, así, teóricamente, debería ser posible desplazar (mediante la competición por el sitio de adsorción) el rotavirus de la asociación de Al(OH)_3 -rotavirus.



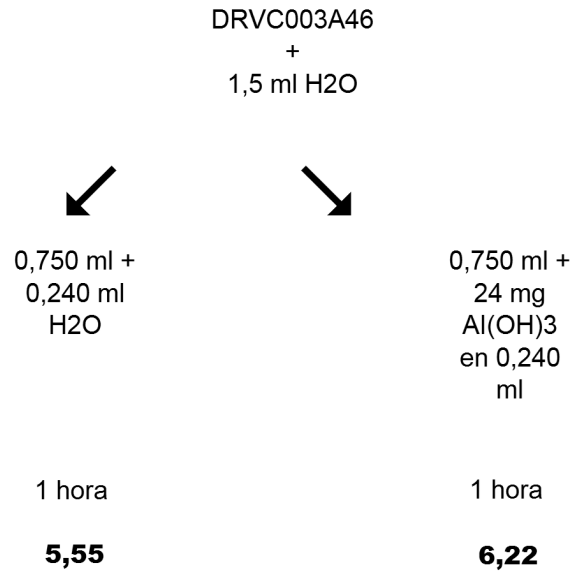
Así, el Rotavirus puede liberarse de la asociación de Al(OH)_3 -rotavirus y el rotavirus liberado permanece activo.

15 Esta liberación se puede hacer bien disolviendo el Al(OH)_3 (mediante HCl en el estómago o mediante $\text{Na}_3\text{Citrato}$ *in vitro*) o bien desplazando el rotavirus por medio de un aminoácido básico (lisina).

5.7: Infectividad de la asociación de Al(OH)_3 -rotavirus

Una sola dosis del rotavirus liofilizado se reconstituyó con agua y se dividió en dos partes. La primera parte, considerada como la referencia, recibió un volumen adicional de agua. La segunda parte recibió 24 mg de Al(OH)_3 suspendido en 0,240 ml de agua (titulaciones víricas preclínicas).

20



Cuando está presente el Al(OH)₃, el rotavirus está activo y el valor de titulación vírica es más alto comparado con la muestra de referencia.

Este experimento se repitió sin dividir la dosis liofilizada y agregando 12 mg de Al(OH)₃ o 24 mg de Al(OH)₃.

- 5 Aquí la muestra de referencia fue la reconstituida con un tampón de citrato-bicarbonato. Así, el título vírico es de nuevo más alto en presencia de Al(OH)₃.

DRVC003A46	DRVC003A46	DRVC003A46
+	+	+
11,5 ml de tampón de WL	12 mg de Al(OH) ₃ en 0,120 ml	24 mg de Al(OH) ₃ en 0,240 ml
	+	+
	1,380 ml de H ₂ O	1,260 ml de H ₂ O
5,34	6,24	6,05
5,32	5,95	6,26

Como en el ejemplo anterior, el rotavirus se asocia con las partículas de Al(OH)₃, dado que el virus puede descartarse por centrifugación. El DRVC003A46 es un rotavirus formulado liofilizado (sacarosa: 2 %; dextrano: 4 %, sorbitol: 3 %; aminoácidos: 2 %).

10

DRVC003A46 + 12 mg de Al(OH) ₃ en 0,120 ml + 1,380 ml de H ₂ O + Centrifugación 8000rpm 10 min		DRVC003A46 + 24 mg de Al(OH) ₃ en 0,240 ml + 1,260 ml de H ₂ O + Centrifugación 8000rpm 10 min	
Sobrante + 1,5 ml SDSAA 5,78 5,96	Sobrenadante <1,44 <1,44	Sobrante + 1,5 ml SDSAA 5,92 6,11	Sobrenadante <1,44 <1,44

SDSAA = 2 % de sacarosa, 4 % de dextrano, 3 % de sorbitol, 2 % de aminoácidos.

De acuerdo con la titulación vírica llevada a cabo en el sobrenadante, la cantidad de $\text{Al}(\text{OH})_3$ necesaria adsorbiendo rotavirus parece ser baja (iniciándose con la dosis liofilizada de 5,7 log) aumentando de escala la titulación vírica:

Tabla 10

Al(OH)₃	Tiempo de adsorción	Título en sobrenadante
12 mg	1 hora TA	2,7
24 mg	1 hora TA	3,4
48 mg	1 hora TA	3,4
72 mg	1 hora TA	2,0
96 mg	1 hora TA	Por debajo de la detección
12 mg	Toda la noche	2,7
24 mg	Toda la noche	Por debajo de la detección
48 mg	Toda la noche	2,5
12 mg	Inmediata	Por debajo de la detección
24 mg	Inmediata	2,0
48 mg	Inmediata	Por debajo de la detección

5

El tiempo necesario para adsorber rotavirus en $\text{Al}(\text{OH})_3$ 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 minutos y 24 horas. El "sobrante" se resuspendió en SDSAA antes de la titulación vírica:

Tabla 11

Tiempo	Sobrante	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

10

5.8: Uso de CaCO_3 como antiácido

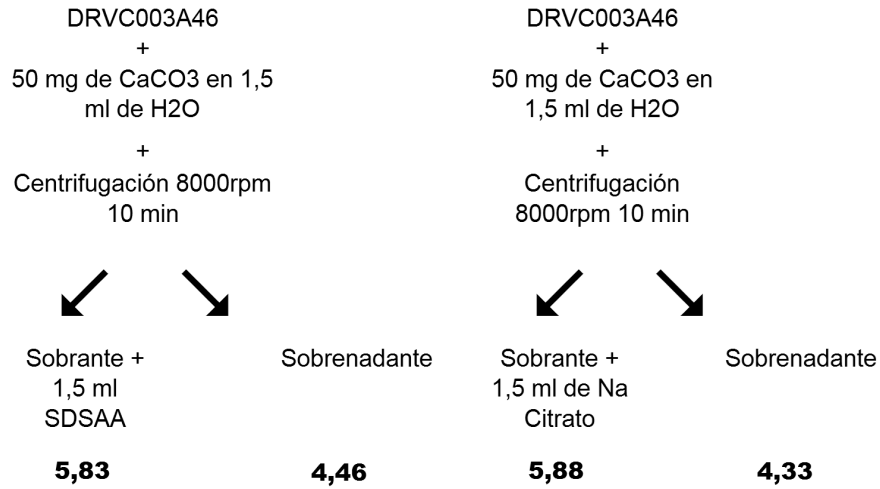
Con el objeto de evitar el aluminio en la vacuna, el antiácido $\text{Al}(\text{OH})_3$ se reemplazó por otra sal inorgánica insoluble: CaCO_3 (carbonato de calcio).

Los fenómenos observados con el CaCO_3 son paralelos a los que se describen para el $\text{Al}(\text{OH})_3$:

- 15
- Asociación del rotavirus con la sal inorgánica:
 - Mantenimiento de la actividad del rotavirus cuando se asocian con la sal inorgánica:
 - Posibilidad de liberación del rotavirus de la asociación por disolución de la base inorgánica por un ácido;
 - Posibilidad de la co-liofilización del antiácido y el rotavirus.

Asociación de CaCO_3 y rotavirus

- 20
- En un primer ensayo, el Rotavirus liofilizado (título vírico 5,7) se reconstituyó con una suspensión de CaCO_3 en agua (50 mg en 1,5 ml); y después se centrifugó y el título viral del sobrenadante se comparó con el gránulo.



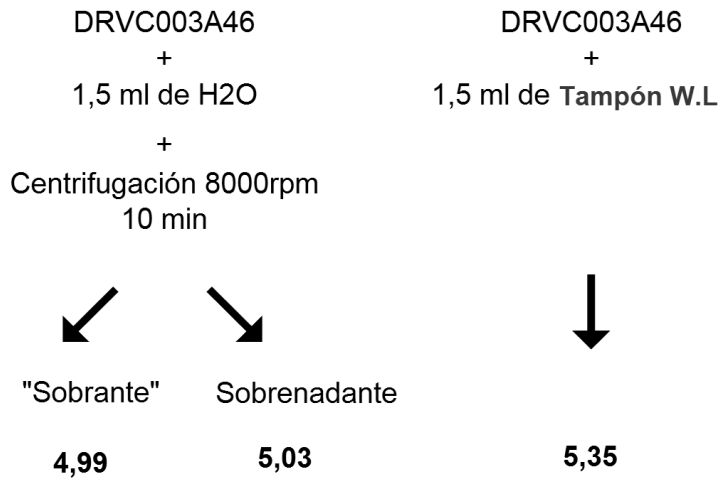
Esto indica que más del 90 % del rotavirus está asociado con el CaCO₃.

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

5 También, los títulos víricos son ligeramente más altos que aquellos obtenidos sin CaCO₃.

Cantidad de asociación de CaCO₃ y rotavirus

El rotavirus liofilizado se reconstituyó con una suspensión en agua de CaCO₃ (1,5 ml):



10 10 mg
50 mg
100 mg

y después se centrifugó y el título vírico del sobrenadante se comparó con el sobranante.

Tabla 12

CaCO ₃	Extemporáneo + Centrifugado.		1 Hora + Centrifugado	
	Sobranante	Sobrenadante	Sobranante	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

Por lo tanto, claramente, más CaCO_3 y más virus están asociados y se ha encontrado menos en el sobrenadante.

Sin embargo, la dosis completa no es recuperada completamente (esperada a un total de 5.3 al menos o hasta 5.8 como se obtuvo anteriormente "ver lo anterior")

Protección del CaCO_3 del rotavirus durante la titulación del antiácido de Baby Rossett-Rice

- 5 Utilizando 10 dosis de Rotavirus liofilizado (DRVC003A46) y 50 mg de CaCO_3 , se llevaron a cabo 2 títulos de titulación Baby Rossett-Rice:

En una titulación de Rossett-Rice clásica, el antiácido es mezclado con el Rotavirus y el HCl es vertido dentro de este medio.

- 10 En el baby Rossett-Rice "inverso", la situación es la contraria: el antiácido es vaciado en el conjunto de HCl, (como ocurre *in vivo*).

Tabla 13

Titulación Baby Rosset-Rice clásica			
Rota. liofilizado almacenado a:	Tampón	Título de virus teórico	Título de virus medido
4°C	60 mg de CaCO_3	5,3	4,6
-80°C	60 mg de CaCO_3	5,3	4,6
4°C	24 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$	5,4	<2,9
-80°C	24 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$	5,4	<2,9
Titulación Baby Rosset-Rice inversa			
Rota. liofilizado almacenado a	Tampón	Título de virus teórico	Título de virus medido
4°C	60 mg de CaCO_3	5,3	4,6
-80°C	60 mg de CaCO_3	5,3	4,6
4°C	24 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$	5,4	<2,9
-80°C	24 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$	5,4	<2,9

Por lo tanto, en este experimento *in vitro*, el carbonato de calcio puede proteger aproximadamente el 20% del Rotavirus de la presencia del HCl, mientras que el hidróxido de aluminio no puede hacerlo.

- 15 **5.9: Liofilización de rotavirus en presencia de antiácido CaCO_3 :**

Tabla 14

N.º de lote	Composición	Título del virus en el instante = cero después de la liofilización	Título del virus después de la liofilización y 1 semana a 37°C
99K08/01	Sacarosa: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2% CaCO_3 : 50 mg	$10^{5,28}$	$10^{5,10}$
99K08/02	Sacarosa: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2% CaCO_3 : 60 mg	$10^{5,16}$	$10^{5,15}$

(continuación)

N.º de lote	Composición	Título del virus en el instante = cero después de la liofilización	Título del virus después de la liofilización y 1 semana a 37°C
00C24/01	Sacarosa: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2% CaCO ₃ : 60 mg Xantano: 0,3%	10 ^{5,07}	10 ^{4,69}
00C24/03	Sacarosa: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2% CaCO ₃ : 60 mg Xantano: 0,3%	10 ^{5,07}	10 ^{4,85}
00E09/25	Sacarosa: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3%	10 ^{5,03}	10 ^{4,91}
	Aminoácidos: 2% CaCO ₃ : 60 mg Xantano: 0,25%		
00E09/30	Sacarosa: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2% CaCO ₃ : 60 mg Xantano: 0,30%	10 ^{5,01}	10 ^{4,87}
00F26/06	Sacarosa: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2% CaCO ₃ : 60 mg Almidón: 2%	10 ^{4,50}	10 ^{4,70}

Esta es la liofilización “todo en uno” del rotavirus y el antiácido (CaCO₃) juntos en el mismo frasco. Evitando la sedimentación del CaCO₃ durante el paso de llenado, se necesitan agentes viscosos. Los ejemplos de tales agentes viscosos incluyen goma xantana y almidón. La actividad del rotavirus se mantiene incluso en presencia de goma xantana y almidón.

5.10 Comprimidos liofilizados para desintegración 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

N.º de lote	Formulación de la composición	Título del virus antes de la liofilización	Título del virus después de la liofilización y 1 semana a 37°C
99B 10/06	Sacarosa al 4% Glutamato de sodio al 3,7% Al(OH) ₃ 48mg	10 ^{5,11}	10 ^{4,53}
99C11/12	Maltitol al 3% Al(OH) 48mg Hidroxipropilmetilcelulosa: 1 %	10 ^{4,16}	10 ^{3,79}

(continuación)

N.º de lote	Formulación de la composición	Título del virus en el instante = cero después de la liofilización	Título del virus después de la liofilización y 1 semana a 37°C
00C24/05	Sacarosa: 2%	10 ^{5,02}	10 ^{4,54}
	Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2% CaCO ₃ : 60 mg Xantano: 0.3%		
00C24/06	Sacarosa: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2% CaCO ₃ : 60 mg Xantano: 0.3%	10 ^{4,86}	10 ^{4,56}
00F26/11	Sacarosa: 1 % Dextrano: 2% Sorbitol: 1.5% Aminoácidos: 1% CaCO ₃ : 60 mg Almidón: 2%	10 ^{4,70}	10 ^{4,40}
En el "concepto lyoc" se pueden utilizar tanto el xantano como el almidón (manteniendo las propiedades de disolución rápida de la torta liofilizada).			

Ejemplo 6: Uso de carbonato de calcio como antiácido para la composición de vacuna de rotavirus

5 Cuando se utiliza una suspensión de CaCO₃ en agua como el antiácido para el rotavirus hay un problema con que las partículas de carbonato de calcio sedimentan rápidamente cuando se colocan en agua ya que el valor de la densidad del polvo se aproxima a 2,6 y el tamaño de partícula promedio es de 30 µm. Esta sedimentación puede ralentizarse mediante:

- 1 incrementar la densidad del medio circundante
- 2 incrementar la viscosidad del medio circundante
- 10 3 reducir el tamaño de las partículas
- 4 mantener las partículas lejos entre ellas

6.1: Incrementar la densidad del medio circundante:

15 Cuando la suspensión de CaCO₃-agua (cuando se coloca en la jeringa) se coloca en la torta liofilizada (conteniendo 2 % de sacarosa, 4 % de dextrano, 3 % de sorbitol; 2 % de aminoácidos), la densidad del medio circundante se aumenta, pero la velocidad de sedimentación del CaCO₃ no es muy diferente a la de la suspensión de CaCO₃-agua.

6.2: Incrementar la viscosidad del medio circundante:**Excipientes seudoplásticos**

Una solución seudoplástica se define como una solución que tiene una viscosidad más alta en reposo comparada con su viscosidad en agitación.

20 Los excipientes usuales de este tipo son:

- polímeros naturales por ejemplo:
- goma arábica
 - goma de adraganto
 - agar-agar
 - 25 alginatos
 - pectinas

polímeros semi-sintéticos por ejemplo:

carboximetilcelulosa (Tyloses C®)

metilcelulosa (Methocels A®, Viscotrans MC®, Tylose MH® y MB®) hidroxipropilcelulosa (Klucels®)

hidroxipropilmetilcelulosa (Methocels E® y K®, Viscotrans MPHC®)

- 5 En general dichos excipientes pseudoplásticos se utilizan junto con agentes tixotrópicos.

Excipientes pseudoplásticos con una capacidad baja de flujo.

Dichos polímeros, en una concentración suficiente, originan una disposición del fluido estructural que da como resultado una solución de alta viscosidad que tiene poca capacidad de flujo en reposo. Se necesita proporcionar al sistema una cierta cantidad de energía permitiendo flujo y transferencia. Se necesitan energías externas (agitación)

- 10 destruyendo temporalmente la disposición del fluido estructural con el objeto de obtener una solución fluida.

Los ejemplos de dichos polímeros son Carbopols® y goma xantana.

Excipientes tixotrópicos

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

- 15 Ejemplos de los excipientes tixotrópicos son: Veegum ®(silicato de magnesio-aluminio) y Avicel RC® (celulosa microcristalina aproximadamente al 89 % y carboximetilcelulosa Na al 11 %).

6.3 Reducir el tamaño de las partículas

Una reducción en el tamaño de las partículas de CaCO_3 da como resultado una disminución en la capacidad antiácida del compuesto.

- 20 6.4 Mantener las partículas alejadas entre sí

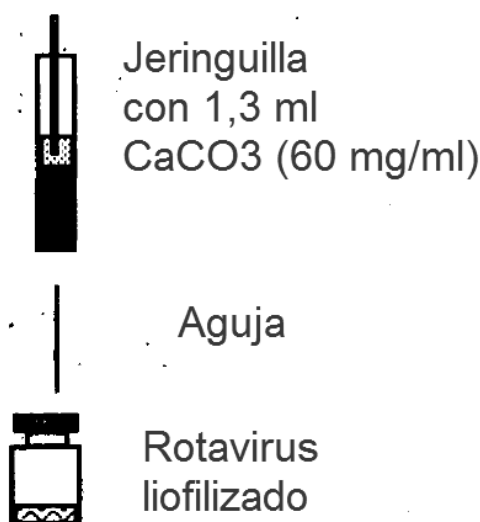
Este es el caso en Veegum® y Avicel® para los que las partículas insolubles más pequeñas (aproximadamente 1 μm) que las partículas de CaCO_3 se colocan entre las partículas de CaCO_3 con el objeto de evitar agregación.

Ejemplo 7: Diseño del producto

Los siguientes esquemas demuestran ejemplos de diseños de productos posibles.

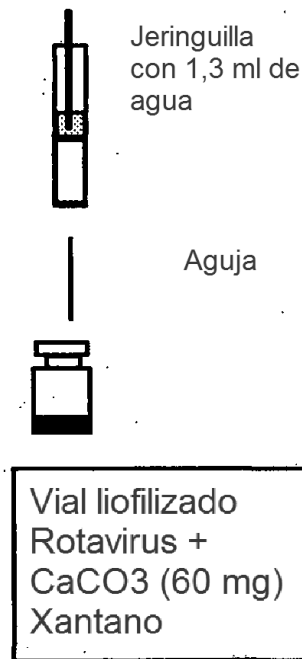
- 25 7.1 CaCO_3 en la jeringa

Teniendo ya lotes clínicos de rotavirus en frascos liofilizados, el antiácido puede colocarse en el fluido reconstituyente contenido en la jeringuilla.



- 30 En esta presentación del producto, la sedimentación de CaCO_3 debe estar bajo control, no solamente durante las etapas de carga, sino también durante la vida útil completa del producto (al menos dos años)

7.2 CaCO₃ en el frasco liofilizado



7.3 Liofilización en un blíster

En este caso el rotavirus, el CaCO₃ y la goma xantana se liofilizan juntos directamente en el blíster.



5

Ejemplo 8: Liofilización de diferentes cepas de rotavirus

Tabla 16

N.º de lote	Cepa de rotavirus	Formulación de la composición	Título del virus a t = cero después de la liofilización	Título del virus 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 ^{4,6}	10 ^{4,7}
00F26/02	G2 (DS-1)	Sacarosa: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2%	10 ^{4,4}	10 ^{4,4}
00F26/03	G3(P)	Sacarosa: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2%	10 ^{4,6}	10 ^{4,5}

(continuación)

N.º de lote	Cepa de rotavirus	Formulación de la composición	Título del virus a t = cero después de la liofilización	Título del virus después de la liofilización y 1 semana a 37°C
00F26/04	G4 (VA-70)	Sacarosa: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2%	10 ^{4,8}	10 ^{4,8}
00F26/05	G9 (W161)	Sacarosa: 2% Dextrano: 4% Sorbitol: 3% Aminoácidos: 2%	10 ^{4,6}	10 ^{4,5}

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

- 5 En este experimento se han liofilizado diferentes cepas de rotavirus.

Para todas, se han mantenido ambos títulos virales durante la liofilización y se ha mostrado estabilidad acelerada (una semana a 37 °C).

Ejemplo 9: Estudio de seguridad de fase I en adultos de una administración oral de la vacuna de rotavirus.

- 10 Se llevó a cabo un estudio de fase 1 evaluando la seguridad y la reactogenicidad de una sola dosis oral de 10^{6,0} de la vacuna de P43 en adultos sanos de una edad de 18 a 45 años.

El ensayo clínico fue de doble ciego y al azar. Se controló por placebo y fue autónomo. El estudio se realizó en un solo centro en Bélgica

Población en estudio

- 15 Un total de 33 sujetos, 11 en el grupo de placebo y 22 en el grupo de vacuna, se inscribieron y todos completaron el estudio. Todos los voluntarios eran caucasianos. Su edad promedio en el momento de la vacunación fue de 35,3 años, con un intervalo de 18 a 44 años. El ensayo comenzó en enero y siguió durante tan solo un mes.

Material

Vacuna

- 20 Se produjeron, purificaron, formularon y liofilizaron lotes clínicos de la vacuna de P43 de acuerdo con las Buenas Prácticas de Fabricación. Los lotes se liberaron por Control de Calidad y Aseguramiento de Calidad. Cada frasco de vacuna contenía los siguientes componentes:

Ingrediente Activo:

Cepa P43 Min. 10^{5,8} uff

Excipientes, estabilizadores:

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

Placebo

- 25 Se prepararon y fueron liberados los frascos de placebo. Cada frasco de placebo contenía los siguientes componentes:

Excipientes, estabilizadores:

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

Diluyente

Se utilizó agua para inyección como diluyente reconstituyendo la vacuna y el placebo.

5 *Administración*

Aproximadamente de 10 a 15 minutos antes de la administración de la vacuna o el placebo, a los sujetos de ambos grupos se les dieron 10 ml de Mylanta® oralmente. Mylanta® es un antiácido registrado. El antiácido aumenta el pH del estómago y evita la desactivación del rotavirus durante su paso a través del estómago.

10 Preparando la vacuna, se reconstituyeron dos frascos de P43 liofilizado conteniendo $10^{5,8}$ uff por frasco con 1.5 ml de agua diluyente para inyección. Esto logró un título vírico calculado de $10^{6,1}$ uff por dosis. La vacuna reconstituida se administró rápidamente como una sola dosis oral.

Preparando el placebo, se reconstituyeron dos frascos de placebo liofilizado con 1.5 ml de agua para inyección y se administraron oralmente como una sola dosis.

Seguridad y reactogenicidad

15 Se aplicaron los siguientes criterios de seguridad y reactogenicidad:

Los síntomas solicitados generales fueron fiebre, diarrea, vómito, náuseas, dolor abdominal y pérdida de apetito. Se registraron durante 8 días tras la administración.

Los síntomas no solicitados se registraron durante 30 días tras la administración.

Los efectos adversos serios se registraron durante el período de estudio completo.

20 Las muestras de diarrea van a ser recolectadas durante ocho días posteriores a la administración.

Los resultados fueron:

No se reportaron síntomas solicitados, no solicitados ni efectos adversos serios durante los períodos de observación respectivos.

Tampoco se reportaron casos de diarrea.

25 *Conclusiones*

Las vacunas de P43 de SB Biologicals fueron seguras en relación con el placebo cuando se administraron oralmente en una modalidad de doble ciego como una sola dosis a la dosis de $10^{6,1}$ uff a voluntarios adultos sanos de una edad de 18 a 44 años.

30 **Ejemplo 10: Eficacia de dos dosis de una vacuna de rotavirus monovalente humano, Rotarix™ en evitar gastroenteritis debida al rotavirus G1 y al rotavirus no G1 (G9)**

Se llevó a cabo un ensayo de fase II controlado por placebo, de doble ciego y al azar evaluando la eficacia protectora de una vacuna derivada de la cepa humana G1P 89-12 para la inmunización de niños.

Específicamente la vacuna utilizada se denominó Rotarix™ y comprende como el componente de rotavirus la cepa G1 humana atenuada depositada como depósito 99081301 de ECACC.

35 493 niños sanos recibieron dos dosis de Rotarix™ en una concentración vírica (10^6 uff) o en placebo (504) a una edad de 2 y 4 meses, concomitantemente con las vacunas de DTPw-HBV y de Hib, OPV se administró dos semanas aparte. Las muestras diarreicas se analizaron para la presencia del rotavirus (ELISA) y los serotipos se determinaron en muestras positivas (RT-PCR). Los episodios diarreicos comunicados a partir de dos semanas después de la
40 segunda dosis se consideraron para el análisis de la eficacia. La gravedad se determinó utilizando una escala de 20 puntos (Ruuska y Vesikari, 1990). Una puntuación ≥ 11 definió la enfermedad grave.

Resultados. Se realizó un análisis provisional de la eficacia en el grupo mencionado anteriormente y los serotipos aislados fueron G1 y G9, distribuidos casi uniformemente. La tasa global de ataque en el grupo de placebo varió del 4,8 % para el G1 al 3,6 % para el G9 durante un período de observación de 6 meses. Dos dosis de Rotarix™ a una
45 concentración de 10^6 uff protegieron contra todos los tipos de diarrea ocasionados por el G1 con eficacia del 83 % [IC del 95 %: 50,4-95,7] y eficacia del 92 % [IC del 95 %: 47,6-99,8] contra la gastroenteritis grave. Si la diarrea fue

ocasionada por el G9, la protección contra todos los tipos de diarrea fue del 60 % [IC del 95 %: 0,2-86,0] y del 81 % [IC del 95 %: 33,0-96,4] contra la gastroenteritis grave. Para cada uno de estos puntos finales de eficacia, hubo una disminución estadísticamente importante en los episodios diarreicos en el grupo de HRV en comparación con el grupo de placebo ($p < 0,05$, prueba exacta de Fisher bilateral).

- 5 **Conclusión.** Estos resultados respaldan altamente la eficacia de 2 dosis de una vacuna de HRV monovalente, Rotarix™, en proteger niños pequeños contra la cepa G1 homóloga y en proteger de forma cruzada contra la cepa G9.

Ejemplo 11: Eficacia de dos dosis de una vacuna de rotavirus monovalente humano: Rotarix™ administrada a tres concentraciones diferentes de virus en evitar gastroenteritis debida al rotavirus G1 y al rotavirus no G1 (G2, G3, G4, G9)

Un ensayo de fase II controlado por placebo, de doble ciego, al azar se llevó a cabo evaluando la eficacia protectora y la eficacia contra la hospitalización de una vacuna derivada de la cepa 89-12 de G1P humano para inmunización de niños.

Específicamente la vacuna utilizada se llamó Rotarix™ y comprende como el componente de rotavirus la cepa G1 humana atenuada depositada como depósito 99081301 de ECACC.

Niños sanos recibieron dos dosis de Rotarix™ a tres concentraciones diferentes del virus (468 recibieron $10^{4,7}$ uff, 460 recibieron $10^{5,2}$ uff; 464 recibieron $10^{5,8}$ uff) o placebo (454) a una edad de 2 y 4 meses, concomitantemente con las vacunas de DTPw-HBV y de Hib, OPV se administró dos semanas aparte. Las muestras diarreicas se analizaron para la presencia del rotavirus (ELISA) y los serotipos se determinaron en muestras positivas (RT-PCR). Los episodios diarreicos comunicados a partir de dos semanas después de la segunda dosis se consideraron para el análisis de la eficacia. La gravedad se determinó utilizando una escala de 20 puntos (Ruuska y Vesikari, 1990). Una puntuación ≥ 11 definió la enfermedad grave.

Resultados:

Los resultados se ilustran en las tablas siguientes. Los niños en los grupos de vacuna tuvieron significativamente menos episodios de gastroenteritis de rotavirus que los niños en el grupo de placebo ($p < 0.001$, prueba exacta de Fisher prueba exacta de Fisher bilateral). Dependiendo de la dosis, la eficacia protectora contra la gastroenteritis grave por rotavirus alcanzó el 86 % (IC del 95 %: 63 %-96 %) y el 70 % (IC del 95 %, 46 %-84 %) contra cualquier gastroenteritis por rotavirus. Para cada uno de estos puntos finales de eficacia, hubo una disminución estadísticamente importante en los episodios diarreicos en el grupo de HRV en comparación con el grupo de placebo ($p < 0,001$, prueba exacta de Fisher bilateral). Los serotipos múltiples de rotavirus (G1, G2, G3, G4 y G9) se identificaron a parir de las deposiciones de gastroenteritis (ELISA y RT-PCR) permitiendo calcular también la eficacia de la vacuna contra los serotipos no G1. Como se puede observar en la tabla 19 en particular, para los serotipos no G1 (G2, G3, G4 y G9) y dependiendo de la dosificación, la eficacia contra la gastroenteritis grave por rotavirus alcanzó el 83 % (IC del 95 %: 40 %-97 %), proporcionando una prueba del concepto de que la vacuna de rotavirus humana G1P1AP[8] basada en G1 monovalente promueve la protección cruzada contra las cepas heterotípicas (es decir, no G1).

Características de episodios de gastroenteritis por rotavirus comunicados durante el estudio

Tabla 17

	RIX4414 $10^{4,7}$ uff	RIX4414 $10^{5,2}$ uff	RIX4414 $10^{5,8}$ uff	Placebo
Cualquier gastroenteritis por rotavirus	21	22	15	51
n.º de episodios (porcentaje) con característica específica entre todos los episodios de gastroenteritis por rotavirus comunicados				
Puntuaciones de gravedad <7	4 (19)	8 (36)	2 (13)	5 (10)
7-10	5 (24)	4 (18)	8 (53)	12 (24)
≥ 11	12 (57)	10 (45)	5 (33)	34 (67)
Serotipos de rotavirus identificados				
G1silvestre	12 (57)	6 (27)	7 (47)	30 (59)
G2	0	0	1 (7)	3 (6)
G3	1 (5)	0	0	2 (4)
G4	0	0	1 (7)	0
G9	8 (38)	14 (64)	7 (47)	15 (29)
Canino	0	0	0	1(2)
No conocido	0	2 (9)	0	0

Eficacia protectora de dos dosis de vacuna de rotavirus humano RIX4414 contra la gastroenteritis por rotavirus

Tabla 18

	Cualquier gastroenteritis por rotavirus			Gastroenteritis grave por rotavirus		Hospitalización por gastroenteritis por rotavirus	
	N	n (%)	Eficacia (IC al 95%)	n (%)	Eficacia (IC al 95%)	n (%)	Eficacia (IC al 95%)
Grupos de vacuna conjuntados	1392	58 (4)*	61 (42-74)	27 (2)*	74 (56-85)	9 (0,6)*	79 (48-92)
RIX4414 10 ^{5,8} uff	464	15 (3)*	70 (46-84)	5 (1)*	86 (63-96)	3 (0,6)‡	79 (25-96)
RIX4414 10 ^{5,2} uff	460	22 (5)*	56 (25-75)	10 (2)*	71 (40-87)	1 (0,2)*	93 (54-100)
RIX4414 10 ^{4,7} uff	468	21 (4)*	58 (29-76)	12 (3)*	66 (32-84)	5 (1)†	65 (-2-90)
Placebo	454	49 (11)	-	34 (7)	-	14 (3)	-

*p<0,001 para cada comparación entre los grupos de vacuna y placebo para la prueba exacta de Fisher bilateral (nivel significativo de $\alpha = 0,05$)

†p=0,037 para la comparación entre los grupos de vacuna y placebo para la prueba exacta de Fisher bilateral (nivel significativo de $\alpha = 0,05$)

‡p=0,007 para la comparación entre los grupos de vacuna y placebo en la prueba exacta de Fisher bilateral (nivel significativo de $\alpha = 0,05$)

N = número de sujetos

n/% = número de sujetos que reportan al menos un episodio de gastroenteritis por rotavirus especificado

Se muestran intervalos de confianza exactos al 95 %

5 Eficacia protectora de dos dosis de la vacuna RIX4414 de rotavirus humano contra un serotipo específico para la gastroenteritis por rotavirus grave

Tabla 19

	N	n (%)	Eficacia (IC al 95%)	valor de p *
Rotavirus de tipo silvestre de G1				
Grupos de vacuna conjuntados	1392	13 (0,9)	74 (41- 88)	<0,001
RIX4414 10 ^{5,8} uff	464	2 (0,4)	88 (48-99)	<0,001
RIX4414 10 ^{5,2} uff	460	4 (0,9)	75 (24-94)	0,006
RIX4414 10 ^{4,7} uff	468	7 (1,5)	58 (-9-85)	0,057
Placebo	454	16 (4)	-	-
Rotavirus no G1 (principalmente G9 con tipos G2, G3 y G4)				
Grupos de vacuna conjuntados	1392	14 (1)	73 (42-88)	<0,001
RIX4414 10 ^{5,8} uff	464	3 (0,6)	83 (40-97)	0,001
RIX4414 10 ^{5,2} uff	460	6 (1)	65 (7-89)	0,020
RIX4414 10 ^{4,7} uff	468	5 (1)	71 (19-92)	0,009
Placebo	454	17 (4)	-	-

* Prueba exacta de Fisher bilateral (nivel significativo de $\alpha = 0,05$) usada para cada comparación entre los grupos de vacuna y de placebo.

N = número de sujetos

n/% = número de sujetos que reportan al menos un episodio de gastroenteritis por rotavirus especificado Se muestran intervalos de confianza exactos al 95 %

Conclusión:

- 10 Estos resultados respaldan altamente la eficacia de 2 dosis de una vacuna HRV monovalente, Rotarix™, en proteger a niños pequeños contra cualquier gastroenteritis y contra la gastroenteritis grave por rotavirus ocasionada por la cepa homóloga G1 y en protección cruzada amplia contra las cepas heterólogas, a saber G2, G3, G4 y G9.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> GlaxoSmithKline Biologicals sa	
	<120> Vacuna	
	<130> vu60489	
5	<160> 34	
	<170> FastSEQ para Windows, Versión 3.0	
	<210> 1	
	<211> 2350.	
	<212> ADN	
10	<213> Rotavirus	
	<400> 1	
	atggcttcac tcattttatag 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	
	tggaacttta ttaattcaaa tacaaatgga gtagtatatg aaagtacaaa taatagtac 300	
	ttttggactg cagtcgttgc tattgaaccg cacgtcaacc cagtagatag acaatatatg 360	
	atatttgggtg aaagcaagca atttaattgtg agtaacgatt caaataaatg gaagttttta 420	
	gaaatgttta gaagcagtag tcaaaatgaa ttttataata gacgtacatt aacttctgat 480	
	accgacttgg taggaatatt taaatatggg ggaagagtat ggacatttca tgggtgaaaca 540	
	ccgagagcta ctactgacag ttcaagtact gcaaatttaa ataatatatc aattacaatt 600	
	cattcagaat tttacattat tccaaggtcc caggaatcta aatgtaatga atatattaat 660	
	aatgggtctgc caccaattca aaatactaga aatgtagttc cattgccatt atcatctaga 720	
	tcgatacagt ataagagagc acaagttaat gaagacatta tagtttcaaa aacttcatta 780	
	tggaagaaa tgcagtataa tagggatatt ataattagat ttaaatgttg taatagtatt 840	
	gtaaagatgg gaggactagg ttataaatgg tctgaaatat catataaggc agcaaattat 900	
	caatataatt acttacgtga cgggtgaacaa gtaaccgcac acaccacttg ttcagtaaat 960	
	ggagtgaaca attttagcta taatggaggg tttctaccca ctgattttgg tatttcaagg 1020	
	tatgaagtta ttaaagagaa ttcttatgta tatgtagact attgggatga ttcaaaagca 1080	
	tttagaaata tggatatatg tagatcatta gcagctaatt taaattcagt gaaatgtaca 1140	
	ggtggaagtt attatttcag tataccagta caagatttag agcgccaact tactgattta 1200	
	gtttcgttgc attttgcgg agttacatta tccacgcaat ttactgattt tgtatcatta 1260	
	aattcactac gatttagatt tagtttgaca gttgatgaac cacctttctc aatactgaga 1320	
	acacgtacag tgaatttgta tggattacca gccgctaata caaataatgg aaatgaatac 1380	
	tacgaaatat caggaaggtt ttcactcatt tcttttagttc caactaatga tgattatcag 1440	
	actccaatta tgaattcagt gacggttaaga caagatttag agcgccaact tactgattta 1500	
	cgagaagaat ttaactcatt gtcacaagaa atagctatgg cacaattgat tgatttagca 1560	
	ctgttgccctc tagatatgtt ttccatgttt tcaggaatta aaagtacaaat tgattttaact 1620	
	aaatcaatgg cgactagtgt aatgaagaaa tttagaaaat caaaatttagc tacatcaatt 1680	
	tcagaaatga ctaattcatt gtcagatgct gcttcacatcag catcaagaaa cgtttctatt 1740	
	agatcgaatt tatctgcgat ttcaaattgg actaatgttt caaatgatgt gtcaaacgta 1800	
	actaattcat tgaacgatat ttcaacacaa acatctacaa ttagtaagaa acttagatta 1860	
	aaagaaatga ttactcaaac tgaaggaatg agctttgacg acatttcagc agctgtacta 1920	
	aaaacaaaaa tagatatgtc tactcaaatt ggaaaaaata ctttacctga tatagttaca 1980	
	gaagcatctg agaaatttat tccaaaacga tcatatcgaa tattaaagga 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	
15	<211> 1009	
	<212> ADN	
	<213> Rotavirus	
	<400> 2	

atgtatggtc ttgaatatac cacaattcta atctttctga tatcaattat tctactcaac 60
tatataattaa aatcagtaac tcgaataatg gactacatta tatatagatc tttgttgatt 120

tatgtagcat tatttgcctt gacaagagct cagaattatg ggcttaactt accaataaca 180
ggatcaatgg acactgtata cgctaactct actcaagaag gaatatttct aacatccaca 240
ttatgtttgt attatccaac tgaagcaagt actcaaatta atgatgggtga atggaaagac 300
tcattgtcac aaatgtttct cacaaaagggt tggccaacag gatcagtccta ttttaaagag 360
tattcaagta ttgttgattt ttctgtcgat ccacaattat attgtgatta taacttagta 420
ctaataaaa atgatcaaaa tcttgaatta gatatgtcag agttagctga tttaatattg 480
aatgaatggg tatgtaatcc aatggatata acattatatt attatcaaca atcgggagaa 540
tcaaataagt ggatatcaat gggatcatca tgtactgtga aagtgtgtcc actgaatacg 600
caaagtgttag gaatagggtt tcaaacaaca aatgtagact cgtttgaaat ggttgctgag 660
aatgagaaat tagctatagt ggatgtcggt gatgggataa atcataaaat aaatttgaca 720
actacgacat gtactattcg aaattgtaag aagttaggtc caagagagaa tgtagctgta 780
atacaagttg gtggctctaa tgtattagac ataacagcag atccaacgac taatccacaa 840
actgagagaa tgatgagagt gaattggaaa aaatgggtggc aagtatttta tactatagta 900
gattatatta accaaatcgt gcaggtaatg tccaaaagat caagatcatt aaattctgca 960
gctttttatt atagagtata gatatatctt agattagatc gatgtgacc 1009

5 <210>3
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Oligonucleótido
<400> 3
ggctttaaaa gagagaattt ccgtctgg 28
10 <210>4
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<400> 4
15 ggttagctcc ttttaatgta tggta 25
<210>5
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
20 <400> 5
ggtcacatcg aacaattcta atctaag 27
<210>6
<211> 22
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial
<400> 6
caagtactca aatcaatgat gg 22
<210>7
<211> 23
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<400> 7
tgttgatttt tctgtcgatc cac 23
<210>8
35 <211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<400> 8
ggttgctgag aatgagaaat tagctatagt gg 32
40 <210>9
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<400> 9
45 ccactatagc taatttctca ttctcagcaa cc 32
<210> 10
<211> 22

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 10
 5 tggcttcgcc attttataga ca 22
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 11
 10 atttcggacc atttataacc 20
 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 12
 15 tggcttcact catttataga ca 22
 <210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 13
 20 atttcagacc atttataacc tag 23
 <210> 14
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 14
 25 ggagtagtat atgaaagtac aaataatag 29
 <210> 15
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 15
 30 ctattatttg tacttcata tactactcc 29
 <210> 16
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 16
 40 tcgatacagt ataagagagc acaag 25
 <210> 17
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 17
 45 ttcattaact tggctctct tatakctg 27
 <210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 18
 50 gtatatgtag actattggga tg 22
 <210> 19
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 19
 55 catccaata gtctacatat ac 22
 <210> 20
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial sequence
 <400> 20
 65 tgtaactccg gcaaaatgca acg 23
 <210> 21
 <211> 23

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 21
 5 cgttgcatTT tgccggagtt aca 23
 <210> 22
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 22
 10 gtaagacaag atttagagcg cca 23
 <210> 23
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 23
 15 tggcgctcta aatcttgtct tac 23
 <210> 24
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> Artificial sequence
 <400> 24
 ctgtatgctg atgaagcagc atctg 25
 <210> 25
 <211> 25
 25 <212> ADN
 <213> Artificial sequence
 <400> 25
 cagatgctgc ttcacagca tcaag 25
 <210> 26
 30 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 26
 35 cgatcatatc gaatattaaa ggatg 25
 <210> 27
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 27
 40 catcctttaa tattcgatat gatcg 25
 <210> 28
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 28
 45 agcgttcaca caattacat tgtag 25
 <210> 29
 <211> 32
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <400> 29
 agtattttat actatagtag attatattaa tc 32
 <210> 30
 <211> 32
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 30
 agtattttat actatggtag attatattaa tc 32
 <210>31
 60 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 31
 65 atccccatta tactgcattc ctttc 25
 <210> 32
 <211> 25

5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 32
 atccctatta tactgcattt ctttc 25
 <210> 33
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <400> 33
 10 atccccatta tactgcattt ctttc 25
 <210> 34
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <400> 34
 atccctatta tactgcattc ctttc 25

REIVINDICACIONES

1. Uso de una cepa de rotavirus humano atenuado de un serotipo G1 en la preparación de una composición para inducir una respuesta inmune contra la infección por rotavirus G1 y de al menos dos de los serotipos de rotavirus no G1 seleccionados del grupo que consiste en: G2, G3, G4 y G9, en el que la cepa de rotavirus atenuado es una sola variante de rotavirus, o sustancialmente una sola variante de rotavirus que tiene un gen VP4 que comprende, en la secuencia de nucleótido, al menos uno de lo siguiente: una adenina (A) en las posiciones 788 y 802 y una timina (T) en la posición 501 desde el codón de inicio; y/o que tiene un gen VP7 que comprende, en la secuencia de nucleótidos, al menos uno de lo siguiente: 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 inicio.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición es capaz de inducir una respuesta inmune contra la infección por rotavirus G1 y de al menos tres de los serotipos de rotavirus no G1 seleccionados del grupo que consiste en: los serotipos G2, G3, G4 y G9.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la composición es capaz de inducir una respuesta inmune contra la infección por rotavirus del serotipo G1 y de los serotipos G2, G3, G4 y G9.
4. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en el que el gen VP4 comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una base de adenina (A) en las posiciones 788 y 802 y una base de timina (T) en la posición 501 desde el codón de inicio.
5. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 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 inicio.
6. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en el que la composición es al menos al 50 % protectora, en una población de individuos vacunados, contra la diarrea y/o la gastroenteritis y/o la gastroenteritis grave causada por la infección por un rotavirus de al menos dos serotipos no G1.
7. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en el que la composición es hasta el 60 % protectora, en una población de individuos vacunados, contra la diarrea causada por la infección por un rotavirus de al menos dos serotipos no G1.
8. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en el que la composición es hasta el 81 % protectora contra la gastroenteritis causada por la infección por un rotavirus de al menos dos serotipos no G1.
9. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en el que la composición es hasta el 83 % protectora, en una población de individuos vacunados, contra la gastroenteritis grave causada por la infección por rotavirus de al menos dos serotipos no G1 seleccionados del grupo que consiste en G2, G3, G4 y G9.
10. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 6, 8 y 9, en el que la gastroenteritis está causada por la infección por un rotavirus de al menos tres serotipos no G1 seleccionados del grupo que consiste en G2, G3, G4 y G9.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la gastroenteritis está causada por la infección por los serotipos G2, G3, G4 y G9.
12. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 11, en el que la composición es para su administración en un régimen de 2 dosis.
13. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12, en el que la cepa de rotavirus atenuada humana se formula con un vehículo farmacéuticamente aceptable o con un tampón antiácido o con ambos.

FIG. 1. Secuencia de VP4 de P43

ATGGCTTCAC	TCATTTATAG	ACAACTTCTC	ACTAATTCAT	ATTCAGTAGA	50
TTTACATGAT	GAAATAGAGC	AAATTGGATC	AGAAAAAACT	CAGAATGTAA	100
CTATAAATCC	GGGTCCATTT	GCACAGACTA	GATATGCTCC	AGTCAATTGG	150
GATCATGGAG	AGATAAATGA	TTCGACTACA	GTAGAACCAA	TTTTAGATGG	200
TCCTTATCAG	CCAACTACAT	TTACTCCACC	TAATGATTAT	TGGATACTTA	250
TTAATTCAAA	TACAAATGGA	GTAGTATATG	AAAGTACAAA	TAATAGTGAC	300
TTTTGGACTG	CAGTCGTTGC	TATTGAACCG	CACGTCAACC	CAGTAGATAG	350
ACAATATATG	ATATTTGGTG	AAAGCAAGCA	ATTTAATGTG	AGTAACGATT	400
CAAATAAATG	GAAGTTTTTA	GAAATGTTTA	GAAGCAGTAG	TCAAAATGAA	450
TTTTATAATA	GACGTACATT	AACTTCTGAT	ACCAGACTTG	TAGGAATATT	500
TAAATATGGT	GGAAGAGTAT	GGACATTTCA	TGGTGAAACA	CCGAGAGCTA	550
CTACTGACAG	TTCAAGTACT	GCAAATTTAA	ATAATATATC	AATTACAATT	600
CATTCAGAAAT	TTTACATTAT	TCCAAGGTCC	CAGGAATCTA	AATGTAATGA	650
ATATATTAAT	AATGGTCTGC	CACCAATTCA	AAATACTAGA	AATGTAGTTC	700
CATTGCCATT	ATCATCTAGA	TCGATACAGT	ATAAGAGAGC	ACAAGTTAAT	750
GAAGACATTA	TAGTTTCAAA	AACTTCATTA	TGGAAAGAAA	TGCAGTATAA	800
TAGGGATATT	ATAATTAGAT	TTAAATTTGG	TAATAGTATT	GTAAAGATGG	850
GAGGACTAGG	TTATAAATGG	TCTGAAATAT	CATATAAGGC	AGCAAATTAT	900
CAATATAAAT	ACTTACGTGA	CGGTGAACAA	GTAACCGCAC	ACACCACTTG	950
TTCACTAAAT	GGAGTGAACA	ATTTTAGCTA	TAATGGAGGG	TTTCTACCCA	1000
CTGATTTTGG	TATTTCAAGG	TATGAAGTTA	TTAAAGAGAA	TTCTTATGTA	1050
TATGTAGACT	ATTGGGATGA	TTCAAAAGCA	TTTAGAAATA	TGGTATATGT	1100
TAGATCATT	GCAGCTAATT	TAAATTCAGT	GAAATGTACA	GGTGGAAGTT	1150
ATTATTTTCA	TATACCAGTA	GGTGCATGGC	CAGTAATGAA	TGGTGGCGCT	1200
GTTTCGTTGC	ATTTTGCCGG	AGTTACATTA	TCCACGCAAT	TTACTGATTT	1250
TGTATCATT	AATTCACTAC	GATTTAGATT	TAGTTTGACA	GTTGATGAAC	1300
CACCTTTCTC	AATACTGAGA	ACACGTACAG	TGAATTTGTA	TGGATTACCA	1350
GCCGCTAATC	CAAATAATGG	AAATGAATAC	TACGAAATAT	CAGGAAGGTT	1400
TTCACTCATT	TCTTTAGTTC	CAACTAATGA	TGATTATCAG	ACTCCAATTA	1450
TGAATTCAGT	GACGGTAAGA	CAAGATTTAG	AGCGCCAAC	TACTGATTTA	1500
CGAGAAGAAT	TTAACTCATT	GTCACAAGAA	ATAGCTATGG	CACAATTGAT	1550
TGATTTAGCA	CTGTTGCCTC	TAGATATGTT	TTCCATGTTT	TCAGGAATTA	1600
AAAGTACAAT	TGATTTAACT	AAATCAATGG	CGACTAGTGT	AATGAAGAAA	1650
TTTAGAAAAAT	CAAAATTAGC	TACATCAATT	TCAGAAATGA	CTAATTCATT	1700
GTCAGATGCT	GCTTCATCAG	CATCAAGAAA	CGTTTCTATT	AGATCGAATT	1750
TATCTGCGAT	TTCAAATTGG	ACTAATGTTT	CAAATGATGT	GTCAAACGTA	1800
ACTAATTCAT	TGAACGATAT	TTCAACACAA	ACATCTACAA	TTAGTAAGAA	1850
ACTTAGATTA	AAAGAAATGA	TTACTCAAAC	TGAAGGAATG	AGCTTTGACG	1900
ACATTTTCAGC	AGCTGTACTA	AAAACAAAAA	TAGATATGTC	TACTCAAATT	1950
GGAAAAAATA	CTTTACCTGA	TATAGTTACA	GAAGCATCTG	AGAAATTTAT	2000
TCCAAAACGA	TCATATCGAA	TATTAAAGGA	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
TTACGTAATT	TCATTAATCA	AAATAATCCA	ATTATAAGGA	ATAGAATTGA	2300
ACAGTTAATA	CTACAATGTA	AATTGTGAGA	ACGCTATTGA	GGATGTGACC	2350

FIG. 2. Secuencia de 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	TTCTGTCGAT	CCACAATTAT	400
ATTGTGATTA	TAACTTAGTA	CTAATGAAAT	ATGATCAAAA	TCTTGAATTA	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
GTTTGCTGAG	AATGAGAAAT	TAGCTATAGT	GGATGTCGTT	GATGGGATAA	700
ATCATAAAAAT	AAATTTGACA	ACTACGACAT	GTACTATTCTG	AAATTGTAAG	750
AAGTTAGGTC	CAAGAGAGAA	TGTAGCTGTA	ATACAAGTTG	GTGGCTCTAA	800
TGTATTAGAC	ATAACAGCAG	ATCCAACGAC	TAATCCACAA	ACTGAGAGAA	850
TGATGAGAGT	GAATTGGAAA	AAATGGTGGC	AAGTATTTTA	TACTATAGTA	900
GATTATATTA	ACCAAATCGT	GCAGGTAATG	TCCAAAAGAT	CAAGATCATT	950
AAATTCTGCA	GCTTTTTTATT	ATAGAGTATA	GATATATCTT	AGATTAGATC	1000
GATGTGACC					