

(12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 44557 B1**
- (51) Cl. internationale : **A61K 39/12; A61K 39/15;
A61K 39/12; A61K 39/15**
- (43) Date de publication : **30.11.2021**
-
- (21) N° Dépôt : **44557**
- (22) Date de Dépôt : **12.06.2017**
- (30) Données de Priorité : **15.06.2016 IN 201641020675**
- (86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT: **PCT/IN2017/050237 12.06.2017**
- (71) Demandeur(s) : **BHARAT BIOTECH INTERNATIONAL LIMITED, Genome Valley, Turkapally, Shameerpet, Hyderabad 500078 (IN)**
- (72) Inventeur(s) : **VADREVU, Krishna Mohan ; PRASAD, Sai Devarajulu ; ELLA, Krishna Murthy**
- (74) Mandataire : **MOROCCO INTELLECTUAL PROPERTY SERVICES**
-
- (54) Titre : **VACCIN CONTRE LE ROTAVIRUS SANS TAMPON, STABLE EN MILIEU ACIDE, ET D'UN FAIBLE VOLUME DE DOSE À ADMINISTRER**
- (57) Abrégé : L'invention concerne un vaccin contre le rotavirus sans tampon, stable en milieu acide, et d'un faible volume de dose à administrer. Le vaccin est disponible sous la forme de doses d'un volume inférieur à 1 mL par dose destinées à être administrées par voie orale, et ne contient pas de tampon. Le vaccin ne nécessite pas d'administration, avant ou après l'administration par voie orale du vaccin au patient, d'anti-acide qui viserait à neutraliser l'acidité gastrique. Le vaccin montre une diminution de la ch

الوصف المختصر

يكشف الاختراع الحالى عن لقاح لفيروس الروتا ذو حجم جرعة منخفض مستقر حمضياً وخالى من المحلول المنظم. يكون اللقاح متاحاً بحجم جرعة أقل من 1 مللى لكل جرعة للتناول عبر الفم ويكون بدون أى محلول منظم . لا يتطلب اللقاح أيضاً قبل أو بعد التناول أى مضاد للحموضة 5 فى وقت إعطاء اللقاح عبر الفم للشخص لمعادلة حمض المعدة. يمثل اللقاح هبوطاً اعتبارياً فى عيار اللقاح عند درجة حموضة 2-4 لمدة زمنية تبلغ 30 دقيقة. يكون اللقاح مستقراً عند -20 درجة مئوية لمدة 60 شهر على الأقل .

لقاح لفيروس روتا ذو حجم جرعة منخفض مستقر حمضياً

و خالي من المحلول المنظم

خلفية الاختراع

يتعلق هذا الاختراع بمجال تصنيع لقاح فيروس روتا . و يتعلق هذا الاختراع ، على وجه الخصوص ، بمجال من اللقاحات المتعلقة بفيروس روتا الذي يكون غير خالي من المادة المنظمة أو لا يتطلب أي مضاد للحموضة من هذه التركيبات ، أثناء أو ما بعد إعطاء لقاح الفيروس . و يتعلق هذا الاختراع أيضا بمجال مقدار حجم الجرعة لكل وحدة لقاح ، و خاصة اللقاحات الفيروسيّة .

خلفية الاختراع

من المعروف جيدا أن الفيروسات روتا هي السبب الرئيسي لالتهاب معوي معدى الحاد في الأطفال و في الأطفال على الصعيد العالمي . تحسينات في النظافة الصحية ، وجودة المياه ، و

10 الصرف الصحي التي قد تتحكم بصفة عامة في العديد من البكتريا المضادة للبكتيريا و الطفيليات التي تكون المسؤولة عن التسبب في وجود أنواع أخرى من الإسهال لا تمنع بشكل مناسب انتشار فيروس روتا . بالتالي ، فإن التطعيم هو الاستراتيجية الوحيدة القادرة على تقليل حجم المرض الناتج عن المرض بأمراض الفيروسات في البلدان النامية المتخلفة والنامية في جميع أنحاء العالم . و يكون

15 التطعيم أكثر أهمية بالنسبة للبلدان التي تفتقر إلى الدعم الاقتصادي المطلوب و البنية التحتية لمعالجة إصابات الفيروسات في المرضى المصابين . و حتى الوقت الحاضر ، يوجد ما لا يقل عن أربع لقاح لمكافحة الفيروسات في العالم ، الأولى بين تلك Rotashield® التي توفرها شركة Wyeth Holdings في عام 1999 . كان هذا عبارة عن لقاح فيروس روتا رباعي التكافؤ حي عن طريق الفم ، ناتج باستخدام فيروس روتا لقرود روسيس ، 3 فيروسات بشرية - من قرد معاد تصنيفها تم

20 الترخيص به في الولايات المتحدة الأمريكية . و مع ذلك ، فقد سحب من السوق بعد 14 شهرا نظرا لارتباطه بتأثيراته الضارة على الانغلاق .

Rotashield® تركيبه تحتوي على السكروز ، أحادي صوديوم جلوتامات ، بوتاسيوم احادي فوسفات ، بوتاسيوم ثنائي فوسفات ، مصل الدم الجنين و كبريتات نيومييسين في وسط امفوتريسين .

نشرة براءات الاختراع المناظرة على تركيبات اللقاح فيروس روتا WO2000006196A2 تدرس

25 تراكيب لقاح قد تحتوي على مواد مساعدة مقبولة صيدليا على النحو المطلوب للحصول على الظروف الفسيولوجية ، مثل الأس الهيدروجيني و عوامل ضبط و تنظيم التخزين و ما شابه ذلك ، على سبيل

المثال ، خلات الصوديوم ، لاكتات صوديوم ، كلوريد صوديوم ، كلوريد بوتاسيوم ، كلوريد كالسيوم ، سوربيتان احادي لورات ، ثالث - ايثانول اوليات ، سيترات - بيكربونات او ما شابه . و عندما يتم إعطاء التركيبة عن طريق الفم ، يمكن أيضا أن يكون من الضروري لتوفير محلول منظم فردي للجسم لمعادلة حامض المعدة جزئيا و حماية فيروس روتا المعاد تصنيفه أثناء المرور الى الأمعاء .
5 تتضمن المحاليل العازلة الملائمة لهذا الاستعمال تشمل بيكربونات الصوديوم ، سيترات بيكربونات أو ما شابه ذلك .

RotaTeq® ، الذي هو لقاح بشري - بقرى خماسى التكافؤ (WC3) معاد تصنيفه حتى موهن فمي المصنع بواسطة Merck & Co. يشتمل على سلالة مصابة بقرية لفيروس روتا WC3 ، P7[5]G6 تتضمن 5 مضادة للتصنيف 4 منها مع جين VP4 P1A[8] من G1 ، G2 ، G3 او G4 و 1 معاد تصنيف مع جين من سلالة فيروس روتا البشرية الاصلية مع الباقي من الجينات من فيروس روتا بقرى اصلى WC3 . تركيبة اللقاح (ما يقابلها من منشورات البراءات لميرك WO1998/13065 ، WO2001/08495 و WO2002/011540) تحتوى على بعض المثبتات فى وسط مستتب نسيجي مع وجود منظمات في التركيبة نفسها ، المحلول المنظم يكون سيترات صوديوم و فوسفات صوديوم . و تستخدم كربوكسيلات عناصر الحماية المحمية و تعمل كمحلول منظم لعمل مستضد فيروس روتا على مقاومة حموضة المعدة أثناء إعطاء مستضد للفيروس لمعدة الطفل .
10
15

علاوة على ذلك ، فإن Rotarix® يكون لقاح أحادى التكافؤ يشتمل على سلالة ممتدة من فيروس روتا بشرية السلالة RX4414 المشتقة من السلالة 12-89 . Rotarix® (الناتج من GlaxoSmithKline Biologicals) هو اللقاح الحي الذي يحتوي على سلالة فيروس روتا بشرية موهنة احادية التكافؤ G1 ، P[8] . يتم توفير اللقاح فى صورة مسحوق مجفد مختلط مع مثبتات ، لكي يتم إعادة تكوينها مع مادة مخففة من محلول منظم معتمد على كربونات الكالسيوم و ذلك قبل إعطاء اللقاح إلى الأشخاص .
20

تم تحضير البصمة Rotarix باعادة تكوين المكون الفعال المجفد (سلالة RX4414 + سواغ) مع 1 مليلتر من محلول منظم كربونات الكالسيوم (GSK) CaCO₃ الموجود في السرنجة المعبأة مسبقا . و بعد حقن المحلول المنظم في القارورة المحتوية على اللقاح المجفد ، يتم رج القارورة جيدا لإعادة تعليق اللقاح . بعد ذلك سحب الحجم الكامل من المنتج المعلق الى المحقن نفسه ، الإبرة
25

الخاصة بالمحقن (أو جهاز النقل) تم استبعادها ، و تم إعطاء المنتج بسرعة كجرعة فم واحدة .
 بدلا من ذلك ، سوف تتبع إعادة تشكيل اللقاح الصناعي المجفد الكامل نفس الإجراءات ، باستخدام
 الرش الفمي المملوء بالمحلول المنظم و مكيف النقل بدلا من السرنجة و الإبرة . و يجب أن يظهر
 اللقاح المعاد تكوينه باللون الأبيض مثل اللبن في المظهر . و يجب فحص بصريا للجسيمات الدقيقة
 و / أو اختفاء اللون ، و عدم إعطائه في حالة وجود هذه الظروف . يتم الإعطاء لـ Rotarix 5
 عن طريق الفم . يجب أن يوضع الطفل في موضع مستند ، و يجب إعطاء كامل محتوى الرش
 الشفهي الذي يحتوي على اللقاح المعاد تشكيله على داخل الخد . و لا يتم إعطاء Rotarix عن
 طريق الحقن .

لذلك، من الواضح انه ، على سبيل المثال ، إعادة تكوين المحلول المنظم للمادة المخففة
 تحتوي على العديد من الخطوات ، مباشرة من ضمان أن يتم عمل اللقاح على النحو الملائم بهدف
 إعطاء اللقاح . و من المؤكد أن كل هذه العوامل تؤدي إلى انخفاض في امتثال اللقاح بمعدل الحماية
 الجزئية من الإصابة بفيروس روتا بدلا من الحصول على حماية كاملة .

البراءات المناظرة من GSK على تركيبات لقاح الفيروسات روتا ، الطلبات الدولية
 WO2001/012797 ، WO2005/02133 ، WO2006/087205 التي تشتمل على سلالة
 فيروس روتا حية موهنة P43 مع تحولات محددة أيضا مع وجود مادة منظمة مضادة للحموضة
 لإعادة التشكيل . السلالة المذكورة من بروتين فيروس روتا (VP4 و VP7) قادرة على حث
 استجابة مناعية على الأقل 4 غير سلالات فيروس روتا G1 و على الأقل واحدة من الانواع
 المصلية الأخرى G2 إلى G14 .

مركبات لقاح فيروس روتا الدوائية التي تم الحصول عليها في براءات اخرى باستخدام
 مثبتات و محاليل منظمة من Bharat Biotech International Limited مع سلالة هندية بدون
 اعراض 116E المعزولة من الطفل البشري تم وصفها ايضا . تتطلب هذه العملية إعطاء منفصل
 لمحلول منظم مضاد للحموضة لمتلقي اللقاح قبل استقبال اللقاح لزيادة الأس الهيدروجيني للمعدة ،
 حيث يكون المحلول المنظم المضاد للحمض المذكور عبارة عن محلول منظم من سيترات الفوسفات ،
 من أجل معادلة حموضة المعدة في وقت إعطاء مستضد الفيروس روتا . اشهار براءة الاختراع الدولي
 WO2013160913 يشتمل على تركيبات لقاح الفيروسات روتا تشتمل على مستضادات فيروس روتا
 و مواد تثبيت و بعض توليفات المحاليل المنظمة الجديدة . و تجمع المحاليل المنظمة في الاختراع

بشكل مسبق في تركيبات لقاح فيروس روتا لمعادلة الأس الهيدروجيني pH الحمضي العالي للمعدة بدون ، الاحتياج لإعطاء مستقل لمضاد حموضة قبل إعطاء اللقاح .
و هكذا ، فمن الواضح انه تم تطوير لقاحات مختلفة من فيروس روتا باستخدام سلالات مختلفة ، من الناحيتين البشرية و الحيوانية المعاد تصنيفها . و هناك بعض الاختلافات الهامة في خصائص هذه السلالات ، النموذجية منها ، كما هو مذكور أدناه .

5

لقاح فيروس روتا مع الحيوانية المعاد تصنيفها	لقاحات فيروس روتا مع السلالات البشرية
فيروسات الروتا الحيوانية هي سلالات موهنة بشكل طبيعي ، مما يقلل من التكاثر في البشر .	توفر العدوى الطبيعية الحماية من مرض فيروس الروتا تباعا .
تتطلب لقاحات الفيروس روتا مع سلالات حيوانية معاد تصنيفها عيارًا عاليًا جدًا من اللقاح حتى تتمكن من تحريض الاستجابة المناعية المطلوبة.	تمتلك الفيروسات البشرية قدرة عالية على التكاثر في العائل ، ومن ثم يتم توهينها بواسطة ممر متعدد الأنسجة في العديد من العوائل . بما أن هذه سلالات بشرية ، فإن مقياس اللقاح 10^4 FFU / 0,5 مليلتر تكفي لتحفيز المناعة المطلوبة ضد العدوى بالفيروس روتا في البشر .
توقع أن معادلة الأجسام المضادة في تجويف الأمعاء يكون مطلوب . المناعة المكتسبة ليست عالية مثل اللقاحات مع سلالات الإنسان .	يتم الحصول على مناعة واسعة من خلال مختلف آليات المستجيب المناعي.
يبني لقاح معاد تصنيفه ليشمل مستضدات فيروس الروتا البشري .	يتم الحصول على الحماية التعددية من خلال استجابة مناعية واسعة النطاق . هذا يعني أنه يوفر حماية متقاطعة عبر سلالات مختلفة .

الجدول 1 : الاختلافات بين لقاح السكر الانسولين البشري واللقاح الحيواني

الأساس المنطقي للاختراع الحالي

و بالتالي من المعروف أن فيروس روتا حساس للغاية بالنسبة للبيئات الحامضية (Estes, M., Graham, D., Smith, E. and Gerba, C. (1979). Rotavirus Stability and Inactivation. *Journal of General Virology*, 43(2), pp.403-409) . ثبات الفيروسات وتثبيت الفيروسات. عدد الفيروسات العامة، 43 (2)، (pp.403-49). و لقد تم التقرير أيضا بأن فيروس المعدي المعوي للاطفال يكون غير ثابت و هناك انهيار الغلاف الخارجي والسوسومات عند

10

تعرضه للبيئة ذات الـ pH الهيدروجيني أقل من 3 (Palmer, E., Martin, M. and Murphy, 3 (1977) .

تكوين و ثبات فيروس المعدي المعوي للاطفال : مقارنة مع فيروس روتا و فيروس اللسان الازرق . (Journal of General Virology, 35(3), pp.403-414) . تم التقرير ايضا ان عدة سلالات من فيروس روتا قد ثبتت في دقيقة عند التعرض للبيئة التي لها الـ pH الهيدروجيني 2 ، و تم الحصول على نتائج مماثلة مع العصير المعدي البشري ذو الرقم الهيدروجيني 1,8 (Weiss, C. and Clark, H. (1985) . تثبيط سريع للفيروسات روتا بواسطة التعرض لمحلول منظم حمضي أو العصارة المعوية الحمضية . (Journal of General Virology, 66(12), pp.2725-2730) . لقد تم التقرير أيضا بأن فيروس روتا البشري من النوع المصلى 1 يثبط بشكل كامل عند تعرضه للأس الهيدروجيني 2,5 (Meng, Z., Birch, C., Heath, R. and Gust, I. (1987) . الثبات الكيميائي الفيزيقي و التثبيط لفيروسات روتا في الإنسان و القردة . (Applied and Environmental Microbiology, 53(4), pp.727-730) .

من المعروف أن فيروس روتا بصفة عامة ، غير ثابت بدرجة عالية عند تعرضه للبيئات الحمضية و يثبط بسرعة . معدلات التثبيط للخلايا الثلاث البقرية و عدة فيروسات روتا ذات المنشأ القردى تم تحديدها أثناء التعرض لمحاليا منظمة حمضية عند الـ pH 2 ، 3 أو 4 . ويتم تثبيط كل واحد من فيروس روتا عند الـ pH الهيدروجيني 2 ، 3 تشبه كثيرا المعدة اثناء الصوم العادي) بسرعة كبيرة ، حيث يتم تحديد نصف عمر للتخميد بحيث يكون 1 دقيقة أو أقل . و يثبط كل فيروس روتا بمعدل أبطأ بكثير عند الرقم الهيدروجيني 3 ؛ و يؤدي التثبيط عند الرقم الهيدروجيني 4 إلى الحد الأدنى . تم الكشف بعض الاختلافات في مقاومة الحامض بين سلالات فيروس روتا المختلفة . بالرغم من أن هذه التحديدات اجريت في درجة حرارة الغرفة (23 م⁰) ، و التجارب عند درجات الحرارة المختلفة تشير إلى معدل أسرع من السرعة للتثبيط الفيروسي بواسطة الحمض عند درجة حرارة الجسم العادية (37 م⁰) . دراسات فيروس روتا المعرض للعصير المعدي الطبيعي عند الرقم الهيدروجيني 1,8 أو 2,1 ، كشف عن معدل تثبيط فيروس روتا المشابه لذلك الملاحظ مع محلول جليسين منظم للأس الهيدروجيني pH المطابق . (Ref: Geigy Scientific Tables, volume 1, 1981, page 126) 25

ينشأ تثبيط فيروس روتا بين الـ pH 2 إلى 3 ولكن عند pH 4 يتم التثبيط دون الحد الأدنى . بالتالي ، تحتوي المعدة على بيئة حمض معدي عالية ، لقد كان من

الضروري إضافة منظمة الى تركيبات اللقاح فيروس روتا حتى اليوم ، و تساعد المحاليل المنظمة في الاحتفاظ بالأس الهيدروجيني pH الثابت لتراكيب لقاح الفيروسات روتا ، مما يمكن من توليد الحمض أو التخزين في تركيبات اللقاح . السعة المضادة للحمض (التي يطلق عليها أيضا قوة معادلة الحامض) من اللقاحات الفيروسية التي تم قياسها بواسطة تجارب Baby Rossett Rice في براءات GSK 5

يتم تحديد سعة معادلة الحمض لتركيبية معينة تعرف بأنها الوقت المقاس للحفاظ على قيمة الأس الهيدروجيني pH أعلى من 4 ويتم تقييمها بواسطة تجربة Baby Rossette Rice .

و يمكن القول بأن تجربة Baby Rossette Rice قد تم افتراضها لمحاكاة البيئة المعدي للمعدة البشرية . البراءة الأخيرة بواسطة GSK US8821891B2 تختص بتركيز المركبات الفوسفاتية المنخفض ، ومع تركيز متزايد من الكربوكسيلات التي يفضل أن تتراوح من 100 mM إلى M1 ، ويفضل من 400 mM إلى 700 mM في حجم الجرعة المنخفضة مثل 1,5 مل لكل جرعة بشرية من لقاح الفيروس روتا . تعمل الاديبيات كمنظم قادر على مقاومة حموضة المعدة العالية (الرقم الهيدروجيني pH 1 إلى 2) . قياس القدرة على مقاومة حموضة المعدة البشرية بواسطة اختبار Baby Rosset Rice ذات قيمة من ٨ إلى ٢٣ دقيقة و التي يقال لتكون قادرة على الحصول على لتجنب تثبيط مستضد فيروس روتا في تركيبية اللقاح بعد إعطاء لقاح فيروس روتا في الطفل البشري . 15

و هكذا ، على نحو فعال ، اعطاء لقاح فيروس روتا الذي يكون قادرا على الحصول على استجابة مولدة للمناعة بما يكفي لإضفاء الحماية ضد الاصابات الفيروسية ، على الأقل من 1,5 إلى 2 مليلتر من لقاح فيروس روتا أو تركيبية اللقاح المعاد تشكيلها في الجرعة البشرية للإعطاء عن طريق الفم ، و ذلك للسماح بمرور مستضد الفيروس روتا للمرور خلال الوسط الحمضي الفائق للمعدة . 20 و بالتالي ، من الوصف السابق للحالة المتمثلة في الطبيعة الحالية للقاحات فيروس روتا المتاحة حتى الآن ، من السهل فهم وتقدير الأشخاص ذوي الخبرة في هذا المجال ، مستضد الفيروسات روتا عبارة عن مستضد غير متغير للحمض ، و تنظيم لقاح فيروس روتا يتطلب دائما مكون من الأحماض أو المادة المنظمة بذلك زيادة الكمية المطلوبة (من حيث الجرعة في الحجم لكل وحدة لقاح) من تناول اللقاح . 25

انه حقيقى ايضا ان مستضد فيروس روتا يكون غير مستقر للغاية و بالنظر إلى الحالة التي يكون فيها مستضد لقاح فيروس روتا بطريقة غير ثابتة ؛ و بالتالي يتم استكمال مولد المضاد

- الفيروسى مع المحاليل الصيدلانية الخاصة بكل من اللقاح لعلاج تركيبات اللقاح ، مما يضيف إلى مقدار جرعة اللقاح من حيث الحجم لكل وحدة لقاح . علاوة على ذلك ، تضمن المحاليل المنظمة أو مضادات الأحماض أو التي تحتاج إلى إعادة تشكيل اللقاح باستخدام المادة المخففة للقاح القائمة على المحاليل المنظمة تزيد من مقدار جرعة اللقاح من حيث الحجم لكل وحدة لقاح . و من ثم ، فإن توفير لقاح فيروس روتا بدون المحلول المنظم/ مضاد الحموضة سوف يقلل بالتأكد من حجم الجرعة لكل وحدة لقاح . و في نفس الوقت ، من الضروري أن يكون لقاح فيروس روتا المذكور بدون محلول منظم يجب ألا يؤثر على الفعالية والثبات للقاح الفيروس روتا .
- 5
- حيث أن الشخص المستقبل للقاح الخاص بلقاح الفيروسات روتا يكون دائما طفل في المجموعة العمرية بين 6 أسابيع و 6 شهور من السن ، من الممكن الحصول على كمية كبيرة من تركيبة لقاح فيروس روتا التي يتم اطلاقها إلى فم الطفل .
- 10
- و هذا يعطي فرصة للإعطاء الجزئي للقاح و بذلك يقلل من امتثال اللقاح و عدم حماية المرض المتمثل بالرغم من الحصول على اللقاح . و بالتالي ، فمن المفضل دائما أن تكون كمية الجرعات من حيث الحجم لكل وحدة من لقاح فيروس روتا بأكثر قدر ممكن دون المساس بفعالية تركيب اللقاح . و في الوقت الحالي ، يتراوح حجم الجرعة الذي تم الكشف عنه في حالة الفن للقاح فيروس روتا من 1,5 مليلتر - 2,5 مليلتر . و تحتوي اللقاحات على مثبتات لقاح و محاليل منظمة للقاح تضيف سعة الجرعة الكلية للقاح . و هكذا ، النقص في حجم الجرعة لكل وحدة من لقاح فيروس روتا الذي له نفس السعة لرفع التوليد المناعي المطلوب للوقاية من عدوى فيروس روتا في الرضع سوف تقلل من إمكانية التخلص من تركيبة اللقاح التي يتم إعطائها للطفل . وبالتالي ، سيكون غير واضح للغاية عمل لقاح فيروس روتا ذو جرعة منخفضة تصل إلى 1 مليلتر ، و يفضل أن تكون 0,8 مليلتر ، أو أكثر من 0,5 مليلتر في الجرعة البشرية بدون المحلول المنظم التي تساوي أو بالأحرى ، أكثر فعالية من لقاح الفيروسات روتا المتاحة بدرجة عالية من المحاليل المنظمة أو مضادات الحموضة ذات حجم الجرعة العالية لكل وحدة لقاح .
- 15
- يكشف الفن السابق عن كل تركيبات لقاح فيروس روتا و التي يتم تثبيتها في تكوينات سائلة عند درجات حرارة تبريد بين 3 ± 5 درجة مئوية أو كمساحيق مجفدة التي تتطلب إعادة تشكيل اللقاح قبل إعطاء اللقاح باستخدام مخفف مناسب . لقد سبق أن نوقش هذا الاختراع بأن إعادة تشكيل اللقاح للمسحوق المجفد يتطلب مهارات و عناية خاصة . علاوة على ذلك ، تتضمن متطلبات التصنيع
- 20
- 25

المنفصلة للمواد المخففة علاوة على مضاعفة اللقاح تكاليف تصنيع اللقاح وكذلك تكاليف النقل .
 النقص في المهارات و الرعاية و البنية التحتية الملائمة لمتطلبات التخزين تضيف المشكلة مع مصدر
 لقاح الفيروس روتا المجفد . وبالنسبة للقاحات السائلة عند 5 ± 3 درجة مئوية ، تقتصر مدة تخزين
 اللقاحات لفترة تصل إلى سنتين فقط . و هناك أيضا ما يصاحب ذلك من فقدان المعيار المصاحب
 للحصول على اللقاحات المتوفرة عند درجة حرارة تتراوح من 2 الى 8⁰ م ، أثناء التخزين و النقل و
 الذي تكون غير مرغوب فيها . إلا أن تركيبات اللقاح للفيروس روتا الخاصة باللقاح عند درجة حرارة -
 20⁰ م وجد أنها لم تكن هناك أية خسائر تماما في النقل والتخزين .

كما يتم تقليل فرص التلوث باللقاح إلى حد كبير جدا بالنسبة للقاحات عند درجة حرارة
 - 20⁰ م . علاوة على ذلك ، تم إنشاء وسيلة إمداد اللقاح عند درجة حرارة - 20⁰ م بالفعل في
 قرابة 120 بلدا من العالم من اجل انتاج اللقاح ضد شلل الأطفال . وبناء على ذلك ، وفقا للمرافق
 القائمة لتخزين اللقاح و مصادر اللقاح المماثلة للحصول على إمدادات اللقاح ضد شلل الأطفال من
 شأنه أن يساعد بشكل كبير في تقليل عبء مرض الفيروسات في العالم . ومن المفضل وضع
 استراتيجيات بديلة حيث يتم زيادة ثبات لقاح الفيروس روتا ، بحيث يمكن توفير اللقاح لتحديد زوايا
 مختلفة من العالم . وبالتالي ، يتم الكشف عن صيغ لقاح فيروس روتا الجديدة في طلب البراءة هذا ،
 حيث يتم ثبات تركيبات لقاح فيروس روتا على مدى 5 سنوات على الأقل ، تكون جديدة تماما و لا
 يتم ذكرها في الحالة الحالية للفن على الإطلاق .

الهدف من الاختراع الحالي

الهدف الرئيسي للاختراع هو توفير لقاح فيروس روتا خالي من المحلول المنظم و ثابت
 للحمض .

أحد الأهداف الرئيسية للاختراع هو توفير كمية منخفضة من الجرعة تصل الى 1 مليلتر أو
 حتى 0,8 مليلتر ، ويفضل 0,5 مليلتر حجم جرعة منخفضة من لقاح فيروس روتا .
 هدف آخر للاختراع هو توفير تركيب لقاح فيروس روتا ثابت مع حجم لقاح اقل من 0,5 مل
 لكل جرعة .

و هناك هدف اخر للاختراع يتمثل في التقليل من التخلص من لقاح فيروس روتا و التقليل
 الى ادنى حد من مرحلة اللقاح المقترن بمتلقي اللقاح و زيادة مطابقة اللقاح بذلك .

هدف آخر للاختراع هو توفير تركيب لقاح فيروس روتا الذي لا يتطلب أي تخفيف أو تقنيات إعادة تشكيل محددة قبل أو أثناء إعطاء اللقاح .

أحد الأهداف الأخرى للاختراع هو توفير لقاح فيروس روتا الذي يكون ثابتا لمدة ٥ سنوات على الأقل عند - 20 درجة مئوية .

5 هدف آخر للاختراع هو توفير لقاح فيروس روتا ذو الجرعة المنخفضة و الذي يكون ثابتا لمدة عامين عند 3 ± 5 درجة مئوية ، و 6 أشهر عند درجة حرارة 25^0 م ، و 1 أسبوع عند درجة حرارة 37^0 م

10 أحد الأهداف الأخرى للاختراع هو توفير حجم الجرعة المنخفضة الخالية من المحلول المنظم حتى 1 مليلتر من تركيب لقاح فيروس روتا الذي يكون مستقرا في المعدة عند pH 2 إلى pH 4 لمدة 20 دقيقة على الأقل .

هدف آخر للاختراع هو توفير حجم الجرعة المنخفضة الخالية من المحلول المنظم حتى 1 مليلتر من تركيب لقاح فيروس روتا الذي يكون ثابتا عند pH 2-4 بدون أي إضافة للمحاليل المنظمة أو عوامل تثبيت الحمض .

15 هدف آخر للاختراع هو توفير حجم الجرعة المنخفضة الخالية من المحلول المنظم ، الثابت للحمض لتركيب لقاح فيروس روتا الذي لا يتطلب إعطاء أي مضاد للحمض أو محلول منظم ، قبل أو ما بعد أو أثناء إعطاء اللقاح للشخص .

كبدل لذلك ، فإن هذا الاختراع هو أيضا توفير حجم الجرعة المنخفضة لتركيب لقاح فيروس روتا 0,5 مليلتر مع وجود محلول منظم و التي تكون فعالة أيضا ضد إصابات الفيروسات روتا في البشر .

20 هدف آخر للاختراع هو توفير حجم الجرعة المنخفضة لقاح ضد فيروس روتا بدون وجود محلول منظم الذي يكون قادرا على توليد الاستجابة المناعة المكافئة أو العالية عن لقاحات فيروس روتا التي تكمل بالأحماض أو المحاليل المنظمة في تركيبات اللقاح.

وفقا لأحد تجسيديات الاختراع ، يوفر تركيب لقاح حيث ان الفقد في مقياس لقاح فيروس روتا لا يزيد عن 0,55 FFU / لكل 0,5 مليلتر بين الأس الهيدروجيني pH من 2-4 لمدة ساعة واحدة على الأقل . 25

في تجسيد اخر ، يوفر الاختراع تركيبية لقاح حيث لا تكون الخسارة في عيار لقاح فيروس روتا أكثر

- من 0,68 FFU / لكل 0,5 مليلتر بين pH في 2-4 لمدة 20 دقيقة على الأقل .
- 5 تجسيد اخر للاختراع ، يعطى تركيب لقاح للفيروس روتا بحجم جرعة تتراوح من 1 مليلتر إلى 0,5 مليلتر ، حيث تحتوي او لا تحتوي تركيبات اللقاح على محاليل منظمة او مضادات الحموضة ، و تمثل الوزن الاسمي في عيار اللقاح عند pH 2 و pH لمدة زمنية تبلغ 30 دقيقة .
- في تجسيد اخر للاختراع ، يوفر قدرات معادلة حامضية لحجم الجرعة المنخفضة لتركيب فيروس روتا من حوالي 0,5 مليلتر إلى 1 مليلتر لكل وحدة من اللقاح بالمقارنة مع تراكيب لقاح فيروس روتا في وجود المحاليل المنظمة الموجودة من خلال تقييمات Baby Rosset Rice .
- 10 في تجسيد اخر للاختراع ، توفير لقاح فيروس روتا الخالي من المحلول المنظم بحجم الجرعة فقط 0,5 مليلتر الذي يكون قادر على توليد استجابة مناعية مكافئة أو أكبر من حيث الانقلاب المصلي أربعة أمثال بعد التطعيم مشابه لذلك الذي يتم الحصول عليه بالانقلاب المصلي الناتج بتركيبية اللقاح إما في وجود المحاليل المنظمة أو تناول مضادات الحموضة .
- 15 في تجسيد اخر للاختراع ، يوفر الاختراع طريقة للوقاية من الإسهال الفيروسي في البشر ، الطريقة تشتمل على خطوات إعطاء كمية فعالة من تركيب لقاح فيروس روتا المثبت الذي يشمل سلالة فيروس روتا 116E ، توليفة من السكريات المختارة من السكروز ، اللاكتوز و التيرهاوز ، حلقة بروتين مصل اللبن ، زلال مصل بشري مأشوب بدون وجود أي مستحضر منظم في تركيبية لقاح فيروس روتا المذكور .
- 20 تجسيد اخر للاختراع ، مطروح لتراكيب لقاح فيروس روتا ثابتة ، و التي تكون ثابتة عند - 20 درجة مئوية لمدة 5 سنوات على الأقل .
- في تجسيد اخر للاختراع فانه يوفر تركيبات لقاح فيروس روتا المستقرة عند درجة حرارة تتراوح من 2-8 درجة مئوية ، 25 م و 37 درجة مئوية لمدة سنتين ، 6 أشهر و 3 أسابيع على الترتيب .

الوصف الكامل للاختراع

التجسيد 1 : تراكيب فيروس روتا لروتا بمحاليل منظمة و حموضة المعدة

لقد تم ذكر بعاليه في خلفية الاختراع ان استخدام المحاليل المنظمة من الممارسات الشائعة في استراتيجيات تركيبية لقاح فيروس روتا روتا ، التي يقوم بها العديد من مصنعي لقاح الفيروسات روتا حتى الآن ، ومن ثم لقاح Rota المشتمل على سلالة 116E عند درجة حرارة 20⁰ م (SPG و DMEM) تم اختبارها باستخدام محلول منظم من سيترات - بيكربونات ظروف معادلة الماء العادية في البداية . 5

Bharat Biotech International Limited حصلت على سلالات فيروس روتا 116E البشرية من المعهد الوطني للصحة National Institute of Health طبقا لاتفاق نقل المواد مع المعهد الوطني لعلاج أمراض الحساسية والأمراض المعدية (NIAID) ، Bethesda ، NIH ، USA . لقد تم بالفعل الكشف عن المتواليات الوراثية الكاملة لسلالات الفيروسات روتا 116E في النشرات . 10

أخذت 3 تراكيب لقاح فيروس روتا مع فيروس روتا 116E المخزن عند - 20⁰ م في 3 مجموعات (المجموعة I ، II ، و III) على النحو المفصل أدناه . و تشتمل تركيبات لقاح فيروس روتا في كل المجموعات الثلاثة أدناه على مولد ضد فيروس روتا حي موهن لسلالة فيروس روتا 116E المذاب في 10% من SPG (السكروز ، بوتاسيوم ثنائي الهيدروجين فوسفات و ثاني بوتاسيوم هيدروجين فوسفات) و الوسط الأساسي الأدنى Dulbecco . وقد عولجت تركيبات اللقاح المذكورة بشكل منفصل كما هو مفصل فيما يلي :

المجموعة I : 0,5 مل من تركيبية فيروس روتا A 116 E عند درجة حرارة 20⁰ م
المجموعة II : 2 مليلتر (ما يعادل 4 جرعات بشرية علاجية من 0,5 لكل جرعة بشرية)
من تركيبية فيروس روتا A 116 E مخلوط مع 5 مليلتر من السلاين العادى .
المجموعة III : 0,570 مليلتر من فيروس روتا A 116 E + مزيج خليط من
[1,42 مليلتر محلول منظم من سيترات - بيكربونات + 8 مليلتر من 34,8 mEq HCl] . 20

كما هو مبين أعلاه ، تتضمن المجموعة I تركيبية لقاح فيروس روتا عند درجة حرارة - 20⁰ م حيث لم تتم اضافة محلول منظم أو سلاين إلى تركيبية اللقاح وتم قياس حجم اللقاح لمدة 120 دقيقة التالية . في المجموعة الثانية II ، 2 مليلتر من لقاح الفيروس روتا 116E (مخزن عند 20⁰ م) و يضاف مع 5 مليلتر من محلول سلاين عادى ، و تم قياس حجم اللقاح عند حجم مستهدف قدره 10⁶ FFU/ml حتى 120 دقيقة . و في المجموعة الثالثة III ، اخذ 0,57 مليلتر 25

تركيبية لقاح فيروس روتا (مخزن عند 20 ° م) و تمت إضافتها مع 1,42 مليلتر من محلول بيكربونات سترات منظم و ٨ مليلتر من 34,8 mEq حمض هيدروكلوريك .

# المجموعة	صفر دقيقة FFU / 0,5 مليلتر	60 دقيقة FFU / مليلتر	120 دقيقة FFU / مليلتر	ملاحظات
المجموعة I	6,35 10	6,17 10	6,32 10	ثابت بدرجة عالية
المجموعة II	5,76 10	5,84 10	5,96 10	ثابت بدرجة ضعيفة
المجموعة III	4,61 10	5,3 10	5,11 10	ثابت بدرجة ضعيفة

الجدول 2 :

تركيبية لقاح فيروس روتا (عند درجة حرارة التخزين - 20 ° م) و عيارات اللقاح في وجود المحاليل المنظمة في الدقيقة صفر ، الدقيقة 60 و الدقيقة 120 .

بناء على ذلك ، يحدد الجدول أعلاه انه تعريض الفيروس لظروف السلاين العادية من أو في وجود محاليل منظم ، يكون العيار أو حجم مستضد فيروس روتا ثابتا ، و بالتالي يكون اللقاح ثابتا .
النموذج 2: تقييم بيروكسيدز المناعي لتراكيب لقاح فيروس روتا عند قيم أس هيدروجيني pH مختلفة .

المثال 1 : تم تقييم بيروكسيدز المناعي بعد ادخال تركيبات لقاح فيروس روتا مباشرة إلى البيئة الحمضية بالإضافة المباشرة لحمض الهيدروكلوريك (HCl) 34,8 mEq الى تركيبية لقاح فيروس روتا . يتم توصيل الأس الهيدروجيني pH لتراكيب اللقاح مباشرة من pH 7 إلى قيم pH المختلفة اقل pH 2 ، و pH 4 بإضافة مباشرة لحمض ، و بعد ذلك تم قياس عيار مستضد اللقاح عند قيمة pH 2 و pH 4 . و بعد ذلك ، تم قياس عيار اللقاح لمدة ساعة واحدة عند رقم هيدروجيني pH أقل من 2 و 4 . وجدت الملاحظات التالية . تم فحص خليط التفاعل عند نقاط زمنية مختلفة و مستويات مختلفة للأس الهيدروجيني . تظهر التفاصيل أدناه في الجدول التالي . تركيبية لقاح فيروس روتا (عند درجة حرارة التخزين - 20 ° م) تحتوي مستضد فيروس روتا 116E حي موهن ، 10 % SPG (صوديوم فوسفات جلوتامات) مذاب في الوسط الأساسي المنخفض Dulbecco .

ملاحظات	Titer in FFU/0.5 mL dose				تفاصيل العينة
	الحجم الحقيقي بعد صفر دقيقة	المعيار و الحجم المصحح مع عامل تخفيف بعد	الحجم الحقيقي بعد ساعة	المعيار و الحجم المصحح مع عامل تخفيف بعد	
سجل الخسارة بعد ساعة					

		ساعة		صفر دقيقة		
-	-	4,94 10	4,94 10	NA	4,95 10	0,5 مليلتر تركيبة لقاح فيروس روتا 116E عند pH 7,4
لا يوجد تأثير لـ pH	Nil	5,05 10	3,85 10	5,05 10	3,85 10	0,5 مليلتر تركيبة لقاح فيروس روتا 34,8 + 116E HCl mEq عند 4 pH
تأثير هامشى لـ pH	0,55	4,4 10	2,93 10	5,01 10	3,54 10	0,5 مليلتر تركيبة لقاح فيروس روتا 34,8 + 116E HCl mEq عند 2 pH

الجدول 3 : نتائج تقييم بيراوكسيديز المناعي عند المعيار او الحجم المستهدف مقداره 10⁵

FFU / 0,5 مليلتر في الدقيقة صفر ، الدقيقة 60 بالاضافة المباشرة للحمض الى تراكيب لقاح فيروس روتا (درجة حرارة التخزين - 20⁰ م) .

ملاحظة : التخفيض المحسوب في القيمة الجبرية لحجم الاعداء نتيجة التخفيف = 10^{1,47}

5 FFU . ومن ثم فإن العيار الفعلي للقاح بعد التخفيف هو 10^{2,93} عند pH 2 . و كل العينات تم معايرتها ثلاث مرات بتقييم بيراوكسيديز المناعي . كان لقاح فيروس روتا عن طريق الفم ثابتا (العيار المستهدف 10⁵ ، (0,5 / FFU مليلتر) عند pH 4 . العيار المستهدف يعنى ، اقل تركيز لمستضد فيروس روتا 116E فى زجاجة اللقاح المراد تحقيقها في القارورة المعينة . العيار الأصلي عند الأس الهيدروجيني المحايد للقاح كان 10^{4,95} / FFU 0,5 مليلتر عند الدقيقة صفر . 10 عيار اللقاح عند الأس الهيدروجيني 2 عند الدقيقة صفر هو 10^{3,45} / FFU 0,5 مليلتر و يقل العيار الى 10^{2,93} / FFU 0,5 مليلتر خلال ساعة واحدة . و بذلك ، بعد إضافة قيمة عامل التخفيف 1,47 نتيجة اضافة الحمض ، مع القيمة التقريبية الفعلية (10^{2,93} / FFU 0,5 مليلتر) وعيار اللقاح المصحح عند pH 2 بعد ساعة واحدة من إضافة الحمض 10^{4,4} بالمقارنة مع عيار اللقاح

الأصلي البالغ 10 4,95 عند pH 7 عند الدقيقة صفر . بالتالي ، اللقاح الذي يعبر عن سجل الخسارة الكلي في حجم او معيار اللقاح 0,55 فقط عند pH 2 في خلال ساعة .

هذا يثبت أنه حتى عند قيمة الرقم الهيدروجيني pH المنخفضة عن 2، المشار إليها في

بيئة حمضية خاصة عندما تظهر في المعدة البشرية ، تركيبة لقاح الفيروس روتا قادرة على الحفاظ

على عيار اللقاح بقيمة 10^{4.4} FFU / 0,5 مليلتر . وعند عيار اللقاح هذا ، يكون اللقاح قادرا على

رفع استجابة مناعية كافية ضد إصابات الفيروسات اللاحقة. في تجربة سريرية تمت بواسطة لقاح

فيروس روتا 116E بعيار حجمي قدره 10⁴ ، أنتج اللقاح 4 اضعاف الانقلاب المصلي حوالى

62%، و هو مشجع جدا (Nita Bhandari et al, J Infect Dis 2009, 200, 421-9) .

المثال 2 : تم تكرار نفس التجربة باستخدام لقاح مختلف (عند درجة حرارة التخزين

– 20⁰ م) ، حيث يكون العيار المستهدف هو 10⁶ FFU/ml (جرعة) يتم توفير قيم العيار

المحسوبة مع عامل التخفيف في الجدول التالي عند قيم الأس الهيدروجيني pH المختلفة عند الدقيقة

صفر و بعد ساعة واحدة . تركيبات لقاح فيروس روتا (عند درجة حرارة التخزين – 20⁰ م)

تحتوى مستضد فيروس روتا 116E حى موهن ، 10 % SPG مذاب في DMEM .

ملاحظات	سجل الافتقار بعد ساعة	المعيار و الحجم المصحح مع عامل تخفيف بعد ساعة في 0,5 / FFU مليلتر	المعيار و الحجم المصحح مع عامل تخفيف بعد صفر دقيقة في 0,5 / FFU مليلتر	pH	تفاصيل عينة اللقاح
لا يوجد تأثير لـ pH	0,05 (بدون فقد)	10 ^{5,3}	10 ^{5,35}	7,2	0.5 ml Rotavirus 116E vaccine formulation 0,5 مليلتر تركيبة لقاح فيروس روتا 116E
لا يوجد تأثير لـ pH	0,24 (فقد هامشى)	10 ^{5,09}	10 ^{5,3}	4	0,5 مليلتر تركيبة لقاح فيروس روتا 116E + HCl mEq 34,8
تأثير هامشى لـ pH	0,68 (فقد هامشى)	10 ^{4,21}	10 ^{4,89}	2	مليلتر تركيبة لقاح فيروس روتا 116E + 34,8 HCl mEq

جدول 4 : نتائج تقييم بيروكسيدز المناعي عند المعيار او الحجم المستهدف مقداره 10⁶ FFU / 0,5 مليلتر في الدقيقة صفر ، الدقيقة 60 بالاضافة المباشرة للحمض الى تراكيب لقاح فيروس روتا (درجة حرارة التخزين - 20⁰ م) .

استنتاج: هناك نقص فقط في الفقد في 0,24 حجم اللقاح في عينات اللقاح عند الأس الهيدروجيني 4، الذي يعتبر أنه ليس له تأثير على الأس الهيدروجيني pH في الظروف العملية التي يتم الحفاظ عليها لمدة ساعة واحدة . عند pH 2 ، كان هناك خسارة للمعيار 0,46 عند الدقيقة صفر و فقدان قدره $\log_{10} 0,68$ FFU عند ساعة واحدة . يقال إن هذا له تأثير هامشي جدا على قيمة pH على قيم عيار اللقاح عند قيمة pH الحمضى اقل من 2 .

وفقا للجدول أعلاه ، نرى أن عيار اللقاح 10^{4,89} FFU / 0,5 مليلتر عند pH 2 يتم الاحتفاظ بها إلى أن تكون قيمة العيار 10^{4,21} FFU / 0,5 مليلتر ، عيار قياسي من 4,21 - 4,89 هو جيد بدرجة كافية لمضاعفة فيروس روتا في الأمعاء الهضمية في الرضع عند سن 6 أسابيع إلى سنتين . حمضية المعدة للطفل هي أيضا pH 2 ، تمثل البيئة المعدية المحاكاة . و يظل اللقاح قادرا على البقاء له عيار 10^{4,89} FFU / 0,5 مليلتر التي تكون كافية لتعبر المعدة و بعد ذلك يتم تركيبها في الزغيبات المعوية و لتكاثر فيروس روتا ، مسئول عن توليد استجابة مناعية في الطفل الرضيع ، و بالتالي يمنح الحماية و الوقاية من التهاب معدى معوى . و لذلك وجد أن اللقاح ثابت عند pH الحمضى 2 لمدة على الأقل ساعة واحدة بدون وجود أي خسارة ملحوظة تماما في عيار اللقاح .

التجسيد 3 : تجربة المختبر لبيان أن لقاح فيروس روتا 116E لا يتطلب مضاد

للحموضة :

عدا الخلاصات المأخوذة من نتائج التجارب السريرية التي تتبع لاحقا في مواصفات البراءة ، فقد ثبت أيضا في المختبر الظروف المماثلة لحمضية المعدة باعطاء اللقاح مباشرة بدون محلول منظم .

المثال 3 . 1 : اخذ 1 مليلتر من اللقاح (التركيبية 3 أ) تحتوى فيروس روتا 116E ، خليط من السكروز (50 %) ، لاكتوز (0,5 %) و تيرهاوز (0,5 %) ، حلامة بروتين اللبن (1 %) ، زلال مصل بشرى (0,4 %) ، و اضيفت الى 1,25 مليلتر من HCl N 0,1 و تم

الخلط جيدا . تم أخذ عينة و اختبار محتوى فيروس روتا عند مستويات الأس الهيدروجيني المختلفة في فترات زمنية مختلفة . و النتائج مبينة في الجدول 5 - 1 أدناه .

رقم العينة	تفاصيل العينة	محتوى الفيروس (FFU / مليلتر)
1	pH 2 - الدقيقة صفر	5,72
2	pH 2 - الدقيقة 10	4,78
3	pH 2 - الدقيقة 30	3,84
4	pH 3 - الدقيقة صفر	5,96
5	pH 3 - الدقيقة 10	5,96
6	pH 3 - الدقيقة 30	5,91
7	قياس	6,1

جدول 5- 1 : تقييم بيروكسيدز المناعي لـ 1 مليلتر لقاح مع فيروس روتا 116E

(التركيبية 3 أ)

المثال 3 - 2 : اخذ 0,8 مليلتر من اللقاح المحتوى فيروس روتا 116E ، خليط من السكروز (40 %) ، و تيرهاوز (0,5 %) ، حلامة بروتين اللبن (20 %) ، متعدد فينيل بيروليدون (0,5 %) التركيبية 3 ب) و اضيفت الى 1,25 مليلتر من HCl N 0,1 و تم الخلط جيدا . تم أخذ عينة و اختبار محتوى فيروس روتا عند مستويات الأس الهيدروجيني المختلفة في فترات زمنية مختلفة . و النتائج مبينة في الجدول 5 - 2 أدناه .

رقم العينة	تفاصيل العينة	محتوى الفيروس (FFU / مليلتر)	محتوى الفيروس (FFU / 0,8 مليلتر)
1	pH 2 - الدقيقة صفر	4,71	4,62
2	pH 2 - الدقيقة 10	4,69	4,6
3	pH 2 - الدقيقة 30	4,41	4,32
4	pH 3 - الدقيقة صفر	5,97	5,88
5	pH 3 - الدقيقة 10	5,94	5,85
6	pH 3 - الدقيقة 30	5,93	5,84
7	قياس	6,1	

جدول 5- 2 : تقييم بيروكسيدز المناعي لـ 0,8 مليلتر لقاح مع فيروس روتا 116E (التركيبية 3 ب)

المثال 3 - 3 : اخذ 0,5 مليلتر من اللقاح المحتوى فيروس روتا 116E ، خليط من السكروز (60 %) ، و تيرهاالوز (0,5 %) ، بروتين صويا (20 %) ، بيريدوكسين - HCL (0,1 %) ، متعدد فينيل بيروليدون (0,25 %) (التركيبية 3 ج) و اضيفت الى 1,25 مليلتر من HCl N 0,1 و تم الخلط جيدا . تم أخذ عينة و اختبار محتوى فيروس روتا عند مستويات الأس الهيدروجيني المختلفة في فترات زمنية مختلفة . و النتائج مبينة في الجدول 5 - 3 أدناه .

رقم العينة	تفاصيل العينة	محتوى الفيروس (FFU / مليلتر)
1	pH 2 - الدقيقة صفر	4,29
2	pH 2 - الدقيقة 10	4,21
3	pH 2 - الدقيقة 30	3,39
4	pH 3 - الدقيقة صفر	5,2
5	pH 3 - الدقيقة 10	5,17
6	pH 3 - الدقيقة 30	5,08
7	قياس	5,8

جدول 5- 3 : تقييم بيروكسيدز المناعي لـ 0,8 مليلتر لقاح مع فيروس روتا 116E (التركيبية 3 ج)

المثال 3 - 4 : اخذ 0,5 مليلتر من اللقاح فيروس روتا 116E ، المحتوى 10 % SPG المذاب DMEM (التركيبية 3 د) و اضيفت الى 1,25 مليلتر من HCl N 0,1 و تم الخلط جيدا . تم أخذ عينة و اختبار محتوى فيروس روتا عند مستويات الأس الهيدروجيني المختلفة في فترات زمنية مختلفة . و النتائج مبينة في الجدول 5 - 4 أدناه .

رقم العينة	تفاصيل العينة	محتوى الفيروس (FFU / مليلتر)
1	pH 2 - الدقيقة صفر	4,78
2	pH 2 - الدقيقة 10	4,48

4,29	pH 2 - الدقيقة 30	3
5,22	pH 3 - الدقيقة صفر	4
5,17	pH 3 - الدقيقة 10	5
4,7	pH 3 - الدقيقة 30	6
5,8	قياس	7

جدول 5-4 : تقييم بيروكسيدز المناعي لـ 0,8 مليلتر لقاح مع فيروس روتا 116E
(التركيبية 3 د)

المثال 3 - 5 : اخذ 0,5 مليلتر من اللقاح فيروس روتا 116E ، المحتوى السكروز (40 %) ، و تيرهالوز (0,5 %) ، لاكتوز (5 %) ، rHSA (0,5 %) ، LAH (1 %) و محلول منظم مخلوط (خلات امونيوم + بيكربونات امونيوم + ثانى امونيوم اورثو فوسفات) (التركيبية 3 د) و اضيفت الى 1,25 مليلتر من 0,1 N HCl و تم الخلط جيدا . تم أخذ عينة و اختبار محتوى فيروس روتا عند مستويات الأس الهيدروجيني المختلفة في فترات زمنية مختلفة . و النتائج مبينة في الجدول 5 - 5 أدناه .

10

رقم العينة	تفاصيل العينة	محتوى الفيروس (FFU / مليلتر)
1	pH 2 - الدقيقة صفر	4,77
2	pH 2 - الدقيقة 10	4,65
3	pH 2 - الدقيقة 30	4,39
4	pH 3 - الدقيقة صفر	5,21
5	pH 3 - الدقيقة 10	5,19
6	pH 3 - الدقيقة 30	4,87
7	قياس	5,8

جدول 5-5 : تقييم بيروكسيدز المناعي لـ 0,8 مليلتر لقاح مع فيروس روتا 116E
(التركيبية 3 د)

الخلاصة : من الجداول أعلاه ، من الواضح أنه عند الاس الهيدروجيني 2 لمدة 30 دقيقة أيضا تركيبات لقاح فيروس روتا 116E قادرة على الصمود في غياب أية محلول منظم أو أي مضاد للحموضة .

نموذج 4 : تحليل Baby Rossett Rice

5 تقييم BRR هو الاجراءات المؤكدة للحصول على معادلة الحمض لتركيب لقاح فيروس روتا . وهكذا يتم تقييم تركيبات اللقاح المختارة المحتوية على محلول منظم سيترات فوسفات و سيترات بيكربونات لسعة معادلة الحمض باستخدام هذا التقييم . و أجريت التجارب تحت ظروف محاكاة لمعدة طفل باستخدام تجربة Baby Rosette Rice Assay (BRR) . تم اختيار صياغات مختلفة مع توليفات مختلفة من عوامل منظمة لتجارب معادلة الحمض والنتائج التي تم الحصول عليها مطروحة في الجدول أدناه عند قيم الأس الهيدروجيني المختلفة حيث يتم محاكاة الظروف كمعدة الاطفال . تم 10 تخفيف تركيبات اللقاح باستخدام ماء للحقن حتى 10 مليلتر ، ثم يضاف 4 مليلتر من HCl N 0,1 ، ثم 0,5 مليلتر من HCl N 0,1 المضاف لكل الدقيقة حتى يصل الرقم الهيدروجيني pH إلى 4 ، ANC يعرف بالزمن بالدقيقة للحفاظ على الرقم الهيدروجيني pH أعلى من 4 .

العيار المستهدف مستضد لقاح فيروس روتا 116E 10 ⁶ FFU / 0,5 مليلتر ، 10 % SPG و DMEM (كمية كافية)	تركيبية اللقاح 4 أ
العيار المستهدف مستضد لقاح فيروس روتا 116E 10 ⁶ FFU / 0,5 مليلتر ، 10 % SPG و DMEM (كمية كافية) مضافة الى 2,5 مليلتر من محلول منظم سيترات بيكربونات	تركيبية اللقاح 4 ب
العيار المستهدف مستضد لقاح فيروس روتا 116E 10 ⁶ FFU / 0,5 مليلتر ، خليط من على الاقل 2 من السكريات (سكروز 50 % و تيرهاالوز 0,5 %) و حلابة بروتين اللبن 0,5 % . العينة 8 فيما بعد) .	تركيبية اللقاح 4 ج
العيار المستهدف مستضد لقاح فيروس روتا 116E 10 ⁶ FFU / 0,5 مليلتر ، خليط من على الاقل 2 من السكريات (سكروز 40 % و تيرهاالوز 0,5 %) و حلابة بروتين اللبن 0,5 % ، 0,35 % زلال مصلى اللبن و 1,1 M محلول منظم من الفوسفات .	تركيبية اللقاح 4 د

الجدول 6 : تفاصيل تراكيب اللقاح :

15 الملاحظات التالية (الجدول 7) اجريت لتقييم Baby Rosset Rice الذى تم اجراؤه مع تراكيب اللقاح 4 أ الى 4 د الواردة بعاليه .

معياري اللقاح الاولى في 0,5 / FFU مليتر بعد ساعة	معياري اللقاح الاولى في 0,5 / FFU مليتر	قيم تقييم Baby Rosset Rice	حجم N 0,1 HCl مضاف	pH بعد اضافة الحمض	البداية pH	تراكيب اللقاح
3,83 10	$10^{4,83}$ $10^{4,83}$	BRR اقل صفر دقيقة) نقص فوري في (pH	4 مليتر	1,95	7,48	تركيب اللقاح 4 أ عند - 20 م بدون محلول منظم لجرعة 0,5 مليتر .
6,15 10	6,17 10	12 دقيقة BRR	10 مليتر	4,22	8,35	تركيب اللقاح 4 ب عند - 20 م مع 2,5 مليتر من محلول منظم سيترات بيكربونات لجرعة 0,5 مليتر .
5,02 10	5,3 10	دقيقتان BRR	5 مليتر	3,98	7,28	تركيب اللقاح 4 ج عند 5 ± 3 م بدون محلول منظم لجرعة 0,5 مليتر .
6,11 10	6,12 10	BRR تقريبا 13 دقيقة	10,5 مليتر	4,33	6,75	تركيب اللقاح 4 د عند 5 ± 3 م بدون محلول منظم لجرعة 1,5 مليتر او 2 مليتر .

الجدول 7 : تحليل Baby Rosset Rice بالمقارنة بتراكيب لقاح الفيروس روتا مع او بدون

محلول منظم .

الاستنتاج : بناء على ذلك من الجدول السابق ، وجدنا ، حتى فيما يتعلق بتركيب اللقاح 4 أ

5

المذكور أعلاه و الذي يبين الانخفاض الفوري للأس الهيدروجيني pH 7,48 إلى pH 1,95 ، يتم الحفاظ على عيار اللقاح من $10^{4,83}$ / FFU 0,5 مليتر و $10^{3,83}$ / FFU 0,5 مليتر . نفس الطريقة يتم الاحتفاظ بعيار اللقاح أيضا في حالة تركيب اللقاح 4 ج بين $10^{5,3}$ إلى $10^{5,02}$.

0,5 / FFU / 0,5 مليلتر حيث ينقص pH من 7,28 الى pH 3,98 خلال دقيقتين . و بالتالي، حتى ولو كانت قيمة BRR لا تزيد عن دقيقتين ، فإن عيار اللقاح يتم الاحتفاظ به إلى حد ما بمعنى 10^{5,02} / FFU 0,5 مليلتر . يتعلق هذا المقدار الكبير من عيار اللقاح بدرجة كافية من توليد الاستجابة المناعية و بالتالي تمنح الحماية و الوقاية من فيروس معدى وعوى فى اطفال الانسان .

النموذج 4 : التجارب السريرية بدون محلول منظم لـ ROTAVAC® سلالة 116E الفرضية و الأساس المنطقي للدراسة

و يفترض ان الارسال الطبيعي للفيروس يحدث عن طريق برازى - فمى . إن الفيروسات في العموم غير ثابتة مع الحمض ، ومن المعتقد أن البيئة الحمضية تؤثر على استمرارية الفيروس .

وبالنظر إلى طبيعة الفيروسات الغير ثابتة للحمض تكون هذه الطريقة فعالة في الإصابة

المطلقة للتديبات التديبات ، معظم الحالات التي يكون لها قيم للأس الهيدروجيني pH المعدي حوالي

٢ . احد الامكانيات هي ان معدة الطفل البشرى أكثر مقبولة نوعا ما من أجل بقاء فيروس روتا

غير المعدة للبالغين و يمكن أن تكون معدة الأطفال البشرية ، حيث أن مستويات الأس الهيدروجيني

المعدي للأطفال تميل إلى أن تكون تقريبا 3,2 بالمقارنة مع البالغين في حوالي 1,00 . وهذا يمكن أن

يأخذ في الاعتبار أن 60 إلى 90 % من مرض فيروس روتا البشرى المبلغ عنه يحدث في الأطفال

دون سن 3 سنوات .

تصميم دراسات

و لاختبار هذه الفرضية يتم إجراء تجربة متعددة التقسيم من النوع العشوائي لتقييم و مقارنة

استجابة مناعية للقاح في الأشخاص الذين يتلقون ROTAVAC مع محلول منظم من سيترات

بيكربونات للأشخاص الذين يحصلون على ROTAVAC بدون المحلول المنظم .

وبناء على ذلك، تشمل الدراسة على مجموعات العلاج الثلاثة التالية :

مجموعة I (مستقبلية ROTAVAC® مع 5 دقائق من الإعطاء المسبق لـ 2,5 مليلتر من

المحلول المنظم) ،

الاختلافات بين لقاح السكر الانسولين البشرى واللقاح الحيواني مجموعة II (مستقبلية

ROTAVAC® بدون المحلول المنظم) ،

مجموعة III (مستقبلية ROTAVAC® مباشرة مخلوطة مع 2,5 مليلتر من المحلول المنظم

قبل الإعطاء او التناول) ،

باحث الدراسة و الفحص المتعلق بالسلامة (منسفو الدراسات) لم ينتبهوا الى تخصيص مجموعة العلاج . تم تحقيق هذا المستحضر من قبل ممرض باعطاء اللقاح باستخدام مجموعة المعالجة الموزعة. كل الأشخاص حصلوا على ثلاثة جرعات من اللقاح بينها 4 أسابيع . و تم اختبار الاستجابة المناعية لللقاح بأربعة أسابيع بعد جرعة اللقاح الثالثة (اليوم ٨٤) وبالمقارنة مع خط البداية (اليوم صفر) . لقد تم اختبار توليد المناعة من حيث متوسط الحجم الهندسي (GMTs) من المصل المضاد للفيروسات روتا IGA و الانقلاب المصلى (الضعف نتج فى مستويات الجسم المضاد من التحصين المبكر إلى ما بعد التطعيم) في مجموعات العلاج .

نتائج و خلاصات الدراسة

الاستجابة المناعية لما بعد التحصين قابلة للمقارنة مع عدم وجود فرق كبير من الناحية الإحصائية في الاستجابة المضادة للفيروسات روتا IGA بين مجموعات العلاج . والأهم من ذلك أن عملية الانقلاب المصلى و GMTs التي تم الحصول عليها في المجموعة II (ROTAVAC®) اعطى بدون محلول منظم) كانت مماثلة لتلك الموجودة في المجموعتين الأخرين من المعالجة حيث يتم إعطاء ROTAVAC® مع المحلول المنظم .

طريقة التطعيم ضد فيروس روتا GMTs IGA في المجموعة حيث يتم إعطاء ROTAVAC من غير المحلول المنظم كان 20,7 U / مليلتر بالمقارنة مع 19,6 U / مليلتر في المجموعتين التي تلقت المحلول المنظم المضاد للحموضة 5 دقائق قبل اللقاح و في نفس الوقت مختلطة باللقاح (الجدول 8) . و كانت الاختلافات بين المجموعات ليست ذات دلالة إحصائية (p < 0,05 ، اختبار طالب) .

جدول 8: متوسط العيارات الهندسية و ٩٥ % CI للنتائج (اليوم صفر ، اليوم 84)

المجموعة III (N = 286)		المجموعة II (N = 287)		المجموعة I (N = 290)		الزائر
CI % 95	%	CI % 95	%	CI % 95	%	
(11,3 ، 9,2)	10,2	(11,9 ، 9,7)	10,8	(11,7 ، 9,4)	10,5	اليوم صفر
(22,1 ، 16,8)	19,2	(24 ، 17,9)	20,7	(22,7 ، 17)	19,6	اليوم 84

$N =$ عدد الاشخاص الذى تم تقييمهم فى كل مجموعة ، $GMT =$ المتوسط الهندسى ، 95 %
 $CI \% (UL , LL) =$ فترات الثقة (الحد الادنى ، الحد الاعلى)

و بالمثل ، فإن عملية تحويل الانقلاب المصلى 4 اضعاف الملاحظة فى المجموعات التي تلقت ROTAVAC® بدون المحلول المنظم المضاد للحموضة و مع المحلول المنظم كان مماثلا عند 29,2 % ، 24,5 % و 25,1 % على الترتيب (الجدول 9) . علاوة على ذلك ، فإن الحد الأقل من 95 % فترة الثقة من فرق الاستقلاب المصلى (مرتين) بين مجموعات المعالجة كان < 10 % ، مبين عدم النقص فى الاستجابة المناعية التي يتم الحصول عليها مع جميع أنظمة المعالجة الثلاثة (الجدول 10) .

الجدول 9 : الانقلاب المصلى و 95 % CI (2 ، 3 او 4 اضعاف التغير فى معايير الجسم

المضاد) بين خط الانطلاق و اليوم 84 بعد التحصين 10

المجموعة III (286 = N)		المجموعة II (287 = N)		المجموعة I (290 = N)		تغير التضاعف
CI % 95	%	CI % 95	%	CI % 95	%	
(39,2 ، 28,3)	33,5	(40,9 ، 29,9)	35,2	(36,2 ، 25,7)	30,7	2
(37,4 ، 26,7)	31,8	(38,1 ، 27,3)	32,4	(33,1 ، 22,8)	27,6	3
(30,5 ، 20,5)	25,1	(34,8 ، 24,3)	29,2	(29,7 ، 19,8)	24,5	4

$N =$ عدد الاشخاص الذى تم تقييمهم فى كل مجموعة ، (95 % CI) = فترات الثقة
(الحد الادنى ، الحد الاعلى)

الجدول 10 : الاختلاف فى 2 % ضعف الانقلاب المصلى بعد التحصين فى مجموعات

المعالجة

2 % ضعف الانقلاب المصلى بعد التحصين (اليوم 84)						
المجموعة III (286 = N)		المجموعة II (287 = N)		المجموعة I (290 = N)		
CI % 95	%	CI % 95	%	CI % 95	%	
(39,2 ، 28,3)	33,5	(40,9 ، 29,9)	35,2	(36,2 ، 25,7)	30,7	DAY 84
اختلاف فى % الانقلاب المصلى مع 95 % CI بجانبين ، اختبار Chi-Square						
95 % CI للاختلاف				المجموعة		

4,5 (- 3,5 ، 12,5)	المجموعة I مقابل المجموعة II
1,6 (- 6,5 ، 9,7)	المجموعة II مقابل المجموعة III
2,9 (- 4,7 ، 10,5)	المجموعة I مقابل المجموعة III

التفاعل و السلامة بالنسبة للأحداث العكسية المطلوبة و غير المطلوبة قابلة للمقارنة عبر المجموعات الثلاثة بعدم وجود فرق كبير من الناحية الإحصائية . لقاح ROTAVAC® يعمل بشكل جيد في جميع مجموعات المعالجة الثلاثة التي تلقت اللقاح باستخدام أو بدون محلول منظم مضاد الحموضة .

5 **التجسيد 5 : بيانات تثبيت تراكيب فيروس روتا 116E لـ لتراكيب السائلة ORV 116E عند 37 م⁰ ، 25 م⁰ و 8 م⁰ .**

تراكيب لقاح فيروس روتا من حجم جرعة من 0,5 مليلتر بدون محلول منظم (العينات من 1 إلى 12 ، 14 إلى 16) ، و مع مادة وسيطة مختلطة عند 0,5 مليلتر من حجم الجرعة (العينة 13) التي تم فحصها لفترة طويلة من الزمن تتراوح حتى 5 سنوات ، مطروحة فيما بعد .

10 تفاصيل التركيبة المختلفة مطروحة فيما بعد مع الثبات عند 37 م⁰ لمدة 4 أسابيع ، 25 م⁰ لمدة 6 أشهر على الأقل ، و عند 5 ± 3 درجة مئوية لمدة تصل إلى 2 إلى 5 سنوات . و تقوم الدراسات بان تركيبات لقاح فيروس روتا بدون محلول منظم عند أحجام الجرعة من 0,5 مليلتر ثابتة أيضا في الطبيعة لفترات طويلة من الزمن عند درجات حرارة تبريد لمدة سنتين على الأقل . كما وجد أن تركيبات لقاح فيروس روتا يمكن أن تكون مستقرة لفترة خمس سنوات عند درجات الحرارة المبردة أيضا . 15

لقد تم صياغة العينة 1 المحتوية على فيروس روتا 116E ، سكروز 50 % ، لاكتوز 0,5 % ، HSA 0,5 % ، و حلاصة بروتين مصال اللبن 0,05 % .

قابلية ثبات العينة 1 :

درجة الحرارة	اليوم صفر	شهر	شهرين	3 شهور	6 شهور	9 اشهر	12 شهر	24 شهر	36 شهر	60 شهر
5 ± 3 م ⁰	6,02	6			6,43		6,21	6,16	6,16	6,07
25 م ⁰	6,02	6,07	5,81	5,9	5,51	4,65				
37 م ⁰	6,02	5,32	2,63							

لقد تم صياغة العينة 2 المحتوية على فيروس روتا 116E ، سكروز 50 % ، تيرهاالوز 0,5 % ، HSA 0,5 % ، و حلامة بروتين مصّل اللبن 0,05 % .

قابلية ثبات العينة 2 :

درجة الحرارة	اليوم صفر	شهر	شهرين	3 شهور	6 شهور	9 اشهر	12 شهر	24 شهر	36 شهر	60 شهر
3 ± 5 م ⁰	6,09	6,14			6,19		6,07	6,10	6,05	6,01
25 م ⁰	6,09	6,02	6,06	5,63	5,51	4,48				
37 م ⁰	6,09	5,47	3,23							

لقد تم صياغة العينة 3 المحتوية على فيروس روتا 116E ، سكروز 50 % ، تيرهاالوز 1 % ، HSA 0,5 % ، و حلامة بروتين مصّل اللبن 0,05 % .

قابلية ثبات العينة 3 :

درجة الحرارة	اليوم صفر	شهر	شهرين	3 شهور	6 شهور	9 اشهر	12 شهر	24 شهر	36 شهر	60 شهر
3 ± 5 م ⁰	6,22	6,24			6,26		6,14	6,20	6,13	6,04
25 م ⁰	6,22	6,18	6,15	5,8	5,34	2,03				
37 م ⁰	6,22	5,35	3,22							

لقد تم صياغة العينة 4 المحتوية على فيروس روتا 116E ، سكروز 40 % ، تيرهاالوز 0,5 % ، و حلامة بروتين مصّل اللبن 1 % .

قابلية ثبات العينة 4 :

درجة الحرارة	اليوم صفر	شهر	شهرين	3 شهور	6 شهور	9 اشهر	12 شهر	15 شهر	24 شهر	60 شهر
3 ± 5 م ⁰	6,19	6,18			6,08		6,21	6,24	6,12	6,01
25 م ⁰	6,19	5,66	5,1	4,8	5,01	4,48				
37 م ⁰	6,19	4,23	2,01							

لقد تم صياغة العينة 5 المحتوية على فيروس روتا 116E ، سكروز 40 % ، تيرهاالوز 5 % ، و حلامة بروتين مصّل اللبن 1 % .

قابلية ثبات العينة 5 :

درجة الحرارة	اليوم صفر	شهر	شهرين	3 شهور	6 شهور	9 اشهر	12 شهر	15 شهر	24 شهر	60 شهر
5 ± 3 م ⁰	6,35	6,37			6,18		6,01	6,17	6,01	
25 م ⁰	6,35	5,89	5,11	4,77	2,43					
37 م ⁰	6,35	5,31	3,58							

لقد تم صياغة العينة 6 المحتوية على فيروس روتا 116E ، سكروز 40 % ، تيرهاالوز 0,5 % ، و حلامة بروتين مصّل اللبن 1 % .

قابلية ثبات العينة 6 :

درجة الحرارة	اليوم صفر	شهر	شهرين	3 شهور	6 شهور	9 اشهر	12 شهر	15 شهر	24 شهر	60 شهر
5 ± 3 م ⁰	6,19	6,15			6,18		6,03	6,22	6,13	
25 م ⁰	6,19	5,87	5,43	5,12	3,25					
37 م ⁰	6,19	4,02	2,52							

لقد تم صياغة العينة 7 المحتوية على فيروس روتا 116E ، سكروز 40 % ، تيرهاالوز 1 % ، و حلامة بروتين مصّل اللبن 1 % .

5

10

قابلية ثبات العينة 7 :

درجة الحرارة	اليوم صفر	شهر	شهرين	3 شهور	6 شهور	9 اشهر	12 شهر	15 شهر	24 شهر	60 شهر
5 ± 3 م ⁰	6,34	5,79			6		5,55	6,07	6,09	
25 م ⁰	6,34	6,07	5,81	5,9	5,51	4,65				
37 م ⁰	6,34	5,32	2,63							

لقد تم صياغة العينة 8 المحتوية على فيروس روتا 116E ، سكروز 50 % ، تيرهاالوز 0,5 % ، و حلامة بروتين مصّل اللبن 0,5 % .

قابلية ثبات العينة 8 :

درجة الحرارة	اليوم صفر	شهر	شهرين	3 شهور	6 شهور	15 شهر	18 شهر	24 شهر	36 شهر	60 شهر
$5 \pm 3^{\circ} \text{م}$	6,34	6,34			6,33	6,31	6,24	6,14	6,08	
25°م	6,34	6,32	6,14	6,01	5,25					
37°م	6,34	5,11	4							

لقد تم صياغة العينة 9 المحتوية على فيروس روتا 116E ، سكروز 70 % ، تيرهاوز 0,5 % .

قابلية ثبات العينة 9 :

درجة الحرارة	اليوم صفر	شهر	شهرين	3 شهور	6 شهور	15 شهر	18 شهر	24 شهر	36 شهر	60 شهر
$5 \pm 3^{\circ} \text{م}$	6,38	6,31			6,23	6,44	6,35	6,26	6,18	
25°م	6,38	6,41	6,35	6,23	5,57					
37°م	6,38	5,07	4,01							

لقد تم صياغة العينة 10 المحتوية على فيروس روتا 116E ، سكروز 50 % ، لاكتوز 0,5 % ، مالتوز 0,5 % ، HSA 0,5 % ، و حلامة بروتين مصّل اللبن 0,05 % .

5

قابلية ثبات العينة 10 :

درجة الحرارة	اليوم صفر	شهر	شهرين	3 شهور	6 شهور	15 شهر	18 شهر	24 شهر	36 شهر	60 شهر
$5 \pm 3^{\circ} \text{م}$	6,25	6,15			6,03	6,34	6,08	6,12	6,11	6
25°م	6,25	6,14	6,27	6,12	5,88					
37°م	6,25	5,02	4,35							

لقد تم صياغة العينة 11 المحتوية على فيروس روتا 116E ، سكروز 50 % ، تيرهاوز 0,5 % ، مالتوز 0,5 % ، HSA 0,5 % ، .

10

قابلية ثبات العينة 11 :

درجة الحرارة	اليوم صفر	شهر	شهرين	3 شهور	6 شهور	9 اشهر	12 شهر	24 شهر	36 شهر	60 شهر
5 ± 3 م ⁰	6,68	6,62	6,95	6,84	6,64	6,65	6,37	6,72	6,05	
25 م ⁰	6,68	6,50	6,2	5,32	4,47					
37 م ⁰	6,68	5,10	5,58							

لقد تم صياغة العينة 12 المحتوية على فيروس روتا 116E ، سكرور 50 % ، تيرهاالوز 0,5 % ، مالتوز 0,5 % و حلامة بروتين مصّل اللبن 0,05 % .

قابلية ثبات العينة 12 :

درجة الحرارة	اليوم صفر	شهر	شهرين	3 شهور	6 شهور	9 اشهر	12 شهر	24 شهر	36 شهر	60 شهر
5 ± 3 م ⁰	6,62	6,76	6,98	7	6,86	6,74	5,99	6,46	6,17	
25 م ⁰	6,62	6,46	6,42	5,99	5,13	3,25				
37 م ⁰	6,62	5,58	5,06							

لقد تم صياغة العينة 13 المحتوية على فيروس روتا 116E ، سكرور 40 % ، تيرهاالوز 0,5 % ، لاكتوز 5 % ، rHSA 0,5 % ، LAH 1 % و محلول منظم مخلوط (خلايا امونيوم + بيكرونات امونيوم + ثنائي امونيوم اورثو فوسفات) .

قابلية ثبات العينة 13 :

درجة الحرارة	اليوم صفر	شهر	شهرين	3 شهور	6 شهور	9 اشهر	12 شهر	24 شهر	36 شهر	60 شهر
5 ± 3 م ⁰	6,61	6,59	6,58	6,6	6,53	6,54	6,18	6,01	5,83	
25 م ⁰	6,61	6,46	6,44	5,79	5,25	4,15				
37 م ⁰	6,61	5,56	5,01							

قابلية ثبات العينة 13 عند - 20 م⁰ :

درجة الحرارة	اليوم صفر	شهر	شهرين	3 شهور	6 شهور	9 اشهر	12 شهر	24 شهر	36 شهر	60 شهر
- 20 م ⁰	6,61	6,59	6,59	6,56	6,54	6,52	6,21	6,11	6,13	6,09

لقد تم صياغة العينات 14 ، 15 و 16 مع فيروس روتا 116E ، 10 % SPG مذابة في DMEM . تترك العينات 14 ، 15 و 16 عند 20°C م و تراجع قابلية الثبات لمدة 60 شهر . تراكيب اللقاح 13 ، 14 و 15 وجدت انها ثابتة جدا عند 20°C م لمدة على الاقل 5 سنوات .

درجة الحرارة	اليوم صفر	3 شهور	6 شهور	9 اشهر	12 شهر	24 شهر	36 شهر	48 شهر	60 شهر
العينة 14 (10) ⁴ FFU (0,5 / مليلتر)	4,25	4,01	4,08	4,15	4,25	4,02	4,18	4,12	4,08
العينة 15 (10) ⁵ FFU (0,5 / مليلتر)	5,55	5,42	5,68	5,37	5,77	5,89	5,32	5,4	5,32
العينة 16 (10) ⁶ FFU (0,5 / مليلتر)	6,12	6,12	6,06	6,33	6,36	6,27	6,15	6,11	6,05

و هكذا ، من المعروف أن تركيبات لقاح فيروس روتا المختلفة التي لها 0,5 مليلتر من حجم الجرعة ثابتة عند درجة حرارة 20°C م لمدة 5 سنوات ، 2-8 درجة مئوية لمدة سنتين ، 25 درجة مئوية لمدة 6 أشهر، و 37 درجة مئوية لمدة اسبوع . و بغض النظر عن تركيبة اللقاح ، وجد أيضا لقاح فيروس روتا عند 0,5 مليلتر إلى 1 مليلتر من حجم الجرعة . كما هو موضح في التجسيد رقم 3 وعند رقم هيدروجيني pH من 2-4 . لذلك ، يرغب المودعون في الذكر بأنه بغض النظر عن تفاصيل تركيب اللقاح ، أي لقاح فيروس روتا يتضمن فيروس روتا الحي 116E قادر على مقاومة البيئة الحمضية القوية في معدة الأطفال البشرية وإنتاج الاستجابة المناعية المطلوبة ضد الإصابات الفيروسية . إن تركيبات اللقاح التي تم تقديمها في هذا الطلب البراءة لا تعني إلا لأغراض شرح اتساع وعمق الاختراع . من غير العملي توفير كل تفاصيل تركيبة اللقاح الممكنة بواسطة المودع ، على الرغم من أن مودع الطلب قد أعطي استراتيجيات الصياغة العديدة في التجسيدين 3 ، المثال 3 التجسيد 5 . كل الاختلافات الواضحة المحتملة من قبل شخص متمرس في هذا المجال من أجل استراتيجية تركيبة لقاح فيروس روتا المشتملة على سلالة 116E التي يتم تغطيتها أيضا تحت هذا الاختراع . ومن المفهوم أن هذا الاختراع يكون مفهوما و يفسر على هذا النحو، إن تركيبات اللقاح التي لا تدخل على وجه التحديد في طلب البراءة المشتملة على فيروس روتا الحي الموهن 116E يتم تغطيتها أيضا تحت مجال هذا الاختراع .

العناصر الجديدة موضوع الحماية

1 – لقاح لفيروس روتا مستقر حمضياً وخالي من المحلول المنظم حيث تركيبة يتكون من:

(أ) سلالة فيروس 116E

(ب) ، توليفة من السكريات المختارة من السكروز، لاكتوز و تيرهاالوز

(ج) حلاصة بروتين حليب الام و

(د) اليومين المصل البشري المأشوب تصل إلى 0.4 %

، حيث تكون تركيبة اللقاح المذكورة قادرة على تحريك الاستجابة المناعية ضد فيروس روتا و التي تكون مساوية أو أكبر من الاستجابة المناعية المتولدة عن طريق لقاح فيروس روتا التقليدي مع محلول منظم .

2 – لقاح لفيروس روتا طبقاً للعنصر 1 ، حيث ان التركيبة تكون خالية من كل أنواع المحاليل

المنظمة لحماية مستضد فيروس روتا من حموضة المعدة .

3 – لقاح لفيروس روتا طبقاً للعنصر 1 ، حيث تكون تركيبة اللقاح المذكورة تكون ثابتة في المعدة

عند الأس الهيدروجيني pH 2 – 4 بعدم أي فقد حجمي titre و قادر على مقاومة حموضة المعدة في البشر لمدة لا تقل عن 20 دقيقة بدون أي إضافة من الحمض أو المحلول المنظم .

4 – لقاح لفيروس روتا طبقاً للعنصر 1 ، حيث لا يتطلب اللقاح إعطاء أي من مضاد الحمض أو

المحلول المنظم قبل او بعد اعطاء اللقاح للشخص .

5 – لقاح لفيروس روتا يشمل فيروس روتا 116E ، حيث ان حجم الجرعة لكل وحدة لقاح تكون

حتى 1 مليانتر فقط .

6 – لقاح لفيروس روتا طبقاً للعنصر 5 ، حيث حيث ان حجم الجرعة لكل وحدة لقاح تكون حتى

0,8 مليانتر لكل وحدة لقاح .

- 7 — لقاح لفيروس روتا طبقا للعنصر 5 ، حيث حيث ان حجم الجرعة لكل وحدة لقاح تكون حتى 0,5 مليلتر لكل وحدة لقاح .
- 8 — لقاح لفيروس روتا طبقا للعنصر 1 و العنصر 5 حيث يكون اللقاح ثابت عند -20 درجة مئوية لمدة 60 شهر على الأقل . 5
- 9 — لقاح لفيروس روتا طبقا للعنصر 1 و العنصر 5 حيث يكون اللقاح ثابتا عند 2 - 8 ° م لمدة 36 شهرا على الأقل ، عند 25 ° م لمدة 6 أشهر و 37 ° م لمدة 4 أسابيع على الأقل .
- 10 — لقاح لفيروس روتا طبقا للعنصر 5 و العنصر 6 يكون بدون او بوجود محلول منظم . 10
- 11 — لقاح لفيروس روتا طبقا للعنصر 7 ، يكون بدون او بوجود محلول منظم .
- 12 — لقاح لفيروس روتا طبقا للعنصر 1 و العنصر 5 حيث يتم توليد الإستجابة المناعية المذكورة من حيث انقلاب تفاعلية المصل الرباعي بعد التلقيح اما بطريقة مماثلة او اكبر من تلك التي للتحصين الرباعي الذي تم الحصول عليه بواسطة تركيبة اللقاح إما في وجود محاليل منظمة أو بتناول مضادات الحموضة . 15
- 13 — لقاح لفيروس روتا طبقا للعنصر 5 حيث يشتمل اللقاح كذلك على مجموعة من السكريات ، و حلالة بروتين حليب الام ، و البومين المصل البشرى المأشوب . 20
- 14 — لقاح لفيروس روتا طبقا للعنصر 13 ، حيث يشتمل مزيج السكريات على مجموعة من سكروز ، لاكتوز و تيرهاوز .
- 15 — لقاح لفيروس روتا طبقا للعنصر 1 و العنصر 5 حيث ان التركيبة تكون مستحضر سائل يؤخذ عن طريق الفم . 25

RAPPORT DE RECHERCHE DEFINITIF AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE

Établi conformément à l'article 43.2 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 44557	Date de dépôt : 12/06/2017
Déposant : BHARAT BIOTECH INTERNATIONAL LIMITED	Date d'entrée en phase nationale : 14/01/2019
	Date de priorité : 15/06/2016
Intitulé de l'invention : VACCIN CONTRE LE ROTAVIRUS SANS TAMPON, STABLE EN MILIEU ACIDE, ET D'UN FAIBLE VOLUME DE DOSE À ADMINISTRER	
Classement de l'objet de la demande :	
CIB : A61K39/15, A61K39/12	
CPC: A61K39/12; A61K39/15; A61P31/14	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport <input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité	
Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 3 : Remarques de clarté <input type="checkbox"/> Cadre 4 : Observations à propos de revendications modifiées qui s'étendent au-delà du contenu de la demande telle qu'initialement déposée <input type="checkbox"/> Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention <input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications exclues de la brevetabilité <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
Examineur: Redouane TELLAA	 Date d'établissement du rapport : 04/11/2021
Téléphone: (+212) 5 22 58 64 14	

Partie 1 : Considérations générales**Cadre 1 : base du présent rapport**

Les pièces suivantes servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Demande telle qu'initialement déposée
- Demande modifiée suite à la notification du rapport de recherche préliminaire :
- Revendications
15
- Observations à l'appui des revendications maintenues
- Observations des tiers suite à la publication de la demande
- Réponses du déposant aux observations des tiers
- Nouveaux documents constituant des antériorités :
- Suite à la recherche complémentaire (Couvrant les documents de l'état de la technique qui n'étaient pas disponibles à la date de la recherche préliminaire)
 - Suite à la recherche additionnelle (couvrant les éléments n'ayant pas fait l'objet de la recherche préliminaire)
- Observations à l'encontre de la décision de rejet

Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité**Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle**

Nouveauté	Revendications 1 - 15	Oui
	Revendications aucune	Non
Activité inventive	Revendications 1 - 15	Oui
	Revendications aucune	Non
Application Industrielle	Revendications 1 - 15	Oui
	Revendications aucune	Non

Il est fait référence aux documents suivants:

D1 : US 2010/0068227

1. Nouveauté

Aucun document de l'état de la technique ne décrit une composition du vaccin contre le rotavirus telle que décrite dans la revendication 1 de la présente demande.

Par conséquent, l'objet des revendications 1-15 est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

2. Activité inventive

Le document D1 est considéré comme l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 de la présente demande, il divulgue un vaccin anti-rotavirus formulé avec le milieu minimum essentiel d'Eagle tamponné dans du phosphate 310 mM et du citrate 100 mM contenant du saccharose à 50%, du maltose à 0,5%, du tréhalose à 0,5% et de l'albumine de sérum humain à 0,4% à pH 7,4. Le vaccin avait au jour 0 un titre de 106,19 FFU / 0,5 ml, et à 2-8°C il ne montre pas de baisse de titre après 50 semaines (voir [0102]). Les échantillons lyophilisés 1-4 montrent une stabilité à 2-8°C, 25°C et 37°C. jusqu'à 50 semaines sans perte de titre (Figure 11). Les stabilisants utilisés sont les combinaisons de 0,1% à 1,0% de HAS, 1% de SPG, 1,2% de L-arginine, 1% de D-sorbitol, 1% de gélatine et 2% de tréhalose (voir [01081]).

L'objet de la présente demande diffère de D1 en ce qu'aucun phosphate/acétate supplémentaire n'est utilisé.

Le problème technique que la présente demande se propose de résoudre peut être considéré comme la fourniture d'un vaccin rotavirus alternatif plus stable.

La solution proposée dans la présente demande implique une activité inventive pour les raisons suivantes :

À partir des documents de l'art antérieur, Il ne serait pas évident pour l'homme de métier de concevoir une composition de vaccin antirotavirus sans qu'un tampon figure parmi ses constituants. Les données fournies par le déposant dans les observations prouvent que le problème a été résolu sur toute la portée revendiquée.

Par conséquent, l'objet des revendications 1-15 implique une activité inventive au sens de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

3. Application industrielle

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.