

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 946**

51 Int. Cl.:
A61K 39/12 (2006.01)
C07K 14/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05014317 .1**
- 96 Fecha de presentación: **25.08.1998**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1604685**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.12.2005**

54 Título: **Virus de la encefalitis Japonesa atenuado**

30 Prioridad:
28.08.1997 KR 4200197
28.08.1997 KR 4200297

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.06.2012

73 Titular/es:
CJ CHEILJEDANG CORPORATION
500 NAMDAEMUNRO 5-GA
CHUNG-KU, SEOUL 100-095, KR y
WALTER REED ARMY INSTITUTE OF RESEARCH

72 Inventor/es:
Kim, Hyun, Su;
Yoo, Wang, Don; Kim, Soo, Ok;
Lee, Sung, hee; Moon, Sang, Bum ;
Hong, Sun, Pyo; Shin, Yong, Cheol;
Chung, Yong, Ju; Eckels, Kenneth, H.;
Innis, Bruce; Putnak, Joseph, R.;
Binn, Leonard, N.; Dubois, Doria, R. y
Srivastava, Ashok, I.

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

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).

ES 2 382 946 T3

DESCRIPCIÓN

Virus de la encefalitis Japonesa atenuado.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**CAMPO DE LA INVENCION**

10 La presente invención se refiere a un virus de la encefalitis Japonesa atenuado adaptado a la célula Vero por pases en célula Vero y una vacuna contra la encefalitis Japonesa que comprende dicho virus atenuado.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 La encefalitis japonesa (EJ) es una enfermedad arboviral transmitida por los mosquitos de principal importancia para la salud pública en Asia. Cada año se informa de más de 35.000 casos y 10.000 muertes en ese continente, pero los informes oficiales indudablemente subestiman el número real de casos (Okuno, T. *World Health Stat Q.* 3: 120-31, 1.978; Umenei, T. et al. *Bull World Health Org.* 63: 625-31, 1.985). La enfermedad se puede manifestar por un síndrome de dolor de cabeza febril, meningitis aséptica o encefalitis y aproximadamente la mitad de los supervivientes tiende a presentar secuelas neurológicas y psiquiátricas permanentes (Burke, D. S. et al. *The Arbovirus: Epidemiology and Ecology* 3: 63-92, 1.988; Monath, T. P. *Virology* 763-814, 1.990).

25 El virus de la EJ es uno de 66 virus de ARN monocatenario con sentido positivo, con cubierta, Flaviviridae, que son en gran medida transmitidos por vectores (Chambers, T. J. et al. *Ann. Rev. Microbiol.* 44: 649-88, 1.990). Morfológicamente, los flavivirus son esféricos, de aproximadamente 40 nm de diámetro, están constituidos por una bicapa lipídica que rodea a una nucleocápside que contiene genoma de 11-kb complejo con una proteína de la cápside (C) (Rice, C. M. et al. *Science* 229: 726-33, 1.985). Las proyecciones superficiales en la membrana están constituidas por una cubierta (E) glicosilada y proteínas de membrana (M). Se escinde una glicoproteína pre-M, presente en viriones nacientes intracelulares, en la proteína M, encontrada en viriones extracelulares maduros. Se asocian importantes actividades fisiológicas a la proteína E de 53-kd, incluyendo hemaglutinación, neutralización vírica, ensamblaje del virión, fusión de membranas y unión vírica a receptores celulares (Koshini, E. et al. *Virology* 188: 714-20, 1.992).

35 Hay tres vacunas contra la EJ para seres humanos (Tsai, T. et al. *Vaccines* 671-713, 1.993). De las tres, sólo la vacuna contra la EJ inactivada producida en cerebro de ratón está disponible internacionalmente. Un fabricante, la Fundación para la Investigación de Enfermedades Microbianas de la Universidad de Osaka (Biken) produce la mayoría de la vacuna contra la EJ inactivada distribuida internacionalmente; esa vacuna fue autorizada en 1.992 en los EE.UU., donde es distribuida por Connaught Laboratories, Inc., como JE-VAX™. La vacuna contra la EJ inactivada y viva atenuada preparada en células de riñón de hámster primarias (RHP) es distribuida exclusivamente en China.

40 La vacuna inactivada contra la EJ producida en cerebros de ratón fue autorizada en Japón en 1.954. Debido a que se produce por inyección cerebral de ratones bebés, es laboriosa de fabricar y aumentaron las preocupaciones acerca de la posibilidad de efecto secundario neurológico relacionado con la vacuna. Aunque sucesivos refinamientos en el procedimiento de fabricación han aumentado su pureza y potencia (Oya, A. *Vaccination Theory and Practice* 69-82, 1.975; Oya, A. *Acta Pediatr Jpn.* 30: 175-84, 1.988; Takaku, K. *Biken J.* 11: 25-39, 1.968), se ha declarado una frecuencia moderada de reacciones sistémicas locales y leves hasta recientemente (Hoke, C. H. et al. *New Engl J Med.* 319: 608-14, 1.988; Poland, J. D. et al. *J Infect Dis.* 161: 878-82, 1.990; Sanchez, J. L. et al. *Lancet* 335: 972-73, 1.990). Con el 20% de las vacunas tiene lugar sensibilidad, enrojecimiento y/o inflamación, local, en el sitio de la inyección. Se declaran síntomas sistémicos leves, principalmente dolor de cabeza, fiebre baja, mialgias, malestar y síntomas gastrointestinales, por el 10 a 30% de las vacunas. Un modelo aparentemente nuevo de reacciones adversas incluyendo urticaria, angioedema, insuficiencia respiratoria, eritema multiforme, eritema nodoso y trastornos neurológicos graves se ha declarado desde 1.989, principalmente entre viajeros vacunados en Australia, Europa y América del Norte (Anderson, M. M. et al. *Lancet.* 337: 1.044, 1.991; Ruff, T. A. et al. *Lancet* 228: 881-2, 1.991). Además, en 1.992 y 1.995 Ohtaki informó de siete niños con encefalomiелitis aguda diseminada (EMAD) con cambios en resonancia magnética nuclear (MRI, por sus siglas en inglés) después de vacunación contra la EJ (Ohtaki, E. et al. *Pediatr Neurol.* 8: 137-9, 1.992; Ohtaki, E. et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 59: 316-7, 1.995). También hay que observar que la vacunación con vacunas contra la rabia que contienen tejido de cerebro animal ha causado complicaciones neurológicas graves (Plotkin, S. A. et al. *Vaccines* 661-2, 1.994). Por estas razones, la OMS ha designado el desarrollo de la vacuna contra la EJ como una alta prioridad.

60 Más recientemente, la vacuna inactivada y viva atenuada contra la EJ de China han demostrado ser eficaces, obteniendo altos títulos de anticuerpo que neutraliza virus y confiriendo una protección sólida (Tsai, T. et al. *Vaccines* 671-713, 1.993). Sin embargo, las células RHP en que se preparó la vacuna China no están homologadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para producción de vacuna vírica o autorizada para uso humano por los países desarrollados. La principal desventaja en el uso de células de hámster primarias para la producción de

vacunas es la incertidumbre con respecto a la calidad de la vacuna. Incluso si se usan hámsteres sin patógenos específicos, los animales pueden llegar a estar infectados inesperadamente, siendo problemático para la producción de vacunas. Ocasionalmente una infección de este tipo podía no ser detectada durante mucho tiempo. Con estas críticas, se requieren estudios controlados adicionales de la seguridad de la vacuna para permitir la confianza teniendo en cuenta su uso extendido. Otra desventaja de la producción de vacunas a partir de células primarias es la baja proporción de recolección del virus y el alto coste sin que se permita la producción en masa.

A la vista de lo anterior, hay una necesidad de una nueva vacuna contra la EJ que se produzca en líneas celulares estándar tales como Vero o células diploides humanas que hayan sido aceptadas como sustratos para vacunas humanas, con buena eficacia de coste. Las células Vero se transforman pero las células no tumorígenas procedían de riñón de mono. La línea celular Vero es más ventajosa que cualquier otra línea celular estándar porque las células Vero se pueden adaptar más fácilmente a cultivo de células a gran escala y como una célula transformada tiene una vida infinita.

Ahora se ha encontrado que el virus de la EJ se puede cultivar en cultivo de células Vero. Se han realizado considerables esfuerzos en el campo de la vacuna contra la EJ para producir vacunas en células estándar que permitan efectuar cultivos de células en un gran volumen. Sin embargo, la caracterización del virus incluyendo estabilidad genética, rendimiento y procedimiento necesario para la comercialización de la vacuna por cultivo con células Vero nunca había satisfecho los requerimientos de vacuna humana. Debido a estos hechos y a las dificultades de trasponer un conocimiento adquirido en otros cultivos de virus a virus de la EJ, la técnica anterior no había alcanzado el éxito en el desarrollo de la vacuna contra el virus de la EJ que fuera genéticamente estable y presentara un carácter inmunogénico alto a partir de líneas celulares continuas. Entre todas estas investigaciones, ninguna ha resultado hasta el momento una nueva producción de vacunas que satisfaga el criterio mencionado en este fundamento.

La presente invención sugiere un desarrollo y una propagación de virus de la EJ en línea celular continua. Las células Vero para la producción de vacunas que superen los problemas previos en el virus de la EJ se produjeron en cerebro de ratón o en líneas celulares primarias. La presente invención también identifica la metodología desarrollada para cultivar el virus de la EJ y un procedimiento al final de la línea de producción para producción de vacunas con eficacia de coste.

Además, la presente invención identifica la metodología mejorada en las vacunas contra la EJ comercializadas previamente de las siguientes maneras.

1. Seguridad: El virus inventado no adquirió la virulencia por el cultivo de células Vero, reduciéndose los peligros de producción y permitiéndose un nivel adicional de seguridad a los receptores más allá del proporcionado por el control riguroso por el procedimiento de inactivación de virus. Esta ventaja no ha sido proporcionada nunca por las vacunas contra la EJ comercializadas previamente.

2. Suministro aumentado en la producción segura de sustrato: La vacuna contra la EJ de la presente invención se produce en ausencia de suero bovino, produciéndose altos rendimientos y una producción económica y escalable, que no se consiguen en las vacunas contra la EJ comercializadas previamente.

3. Menos reactogenicidad: No se incorpora estabilizante de gelatina en la vacuna contra la EJ de la presente invención, reduciéndose el riesgo de reacciones de la vacuna como las observadas con la vacuna existente (Saskaguchi M. et al. Vaccines 68-69, 1.998). Además, los componentes de origen bovino no deseables, incorporados a las vacunas contra la EJ existente se eliminan de manera eficaz. De manera concluyente, este punto de seguridad de la presente invención nunca ha sido proporcionado por la vacuna contra la EJ previa.

4. Potencia aumentada: El éxito de la producción escalable con células Vero y la ausencia de complementos para la producción, así como la purificación eficaz, permiten el primer uso de adyuvantes potentes en la formulación de la vacuna contra la EJ. Aunque el uso de los adyuvantes en la formulación de la vacuna se ha aplicado en otra vacuna, trasponer este conocimiento a la vacuna contra la EJ ha encontrado dificultad puesto que ninguna de las vacunas contra la EJ existentes asegura su producción segura.

Como conclusión, ninguna había dado como resultado hasta ahora una nueva vacuna que satisficiera las ventajas ya mencionadas en la comercialización de la vacuna contra la EJ.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una vacuna contra la EJ segura y eficaz producida en sustrato de células estándar para aumentar su aceptabilidad en muchos países. Un objeto más de la invención es proporcionar un procedimiento eficaz para producir una vacuna estable muy purificada y formular una vacuna que presente un alto carácter inmunogénico con una cantidad pequeña de antígeno.

SUMARIO DE LA INVENCION

Según la presente invención se proporciona una vacuna contra la encefalitis Japonesa que comprende hidróxido de aluminio como adyuvante y un virus atenuado o inactivado de la encefalitis japonesa, excepto un virus caracterizado porque un gen de la proteína E de dicho virus comprende las mutaciones puntuales T19A, T177A, K243E y Q264H, estando caracterizado el virus de la encefalitis japonesa porque se adapta a las células Vero por pases en células vero.

Preferiblemente, el virus se adapta a células vero por pases en serie en células vero.

Preferiblemente, el número de pases es cuatro o más.

Preferiblemente, el virus inactivado de la encefalitis japonesa se inactiva mediante un agente de inactivación.

Preferiblemente, el virus atenuado de la encefalitis japonesa es virus de la EJ vivo atenuado, no tratado mediante un agente de inactivación.

Preferiblemente, la vacuna comprende además aditivos farmacéuticamente aceptables.

El virus atenuado de la encefalitis japonesa de la presente invención, que se refiere como CJ50003 en la presente memoria, fue depositado en la colección permanente del Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos, Seoul, Corea, el 20 de abril de 1.998 bajo el Tratado de Budapest del reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para el fin de procedimiento de patente y se puede obtener un subcultivo del mismo a partir del depósito con el número de acceso KCCM-10125.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención llegarán a entenderse mejor con respecto a la siguiente descripción, reivindicaciones adjuntas y dibujos adjuntos como sigue:

La Figura 1 muestra pases y adaptación del virus de la EJ SA14-14-2(RPP) en células Vero. Se recolectó el pase 1 de virus a los 5 días después de inoculación de una monocapa de células Vero con 0,1 mdi de cepa de SA14-14-2(RPP). Se midió el título de virus de la EJ por ensayo en placa realizado en monocapas de células Vero. Se realizaron pases en serie posteriores a 30 pases con virus del pase 1 de virus como material de partida por sucesivas infecciones del virus y valoración como se describe en el Ejemplo 1.

La Figura 2 muestra recolección en múltiples tiempos de virus de la EJ CJ50003 en un frasco rotativo cada dos días desde 3 a 17 días posinfección. Se infectó una monocapa de células Vero a una mdi de 0,01 unidades formadoras de placa (ufp) por célula. Se permitió que el virus se adsorbiera durante 2 horas a 35°C, después se lavaron las células con PBS tres veces, se alimentaron con 100 ml de EMEM sin suero y se incubaron a 35°C. Cada 48 h desde 3 días a 17 días posinoculación, se reemplazaron los sobrenadantes del cultivo con EMEM sin suero fresco. Se realizaron valoraciones de infectividad del virus de las recolecciones poniéndolas en placas en monocapas de células Vero.

La Figura 3 muestra un análisis del virus de la EJ CJ50003 purificado mediante ultracentrifugación por gradiente de sacarosa por SDS-PAGE y método Western. Se aplicaron sesenta ml de sobrenadante de cultivo concentrado a cuarenta ml de gradiente de sacarosa al 15-60% y se centrifugó en un rotor Ti 45 a 2.303 rad/s (22.000 rpm), 18 h, 12°C. Se recogieron muestras de dos ml del fondo del tubo y se sometieron a SDS-PAGE con gradiente de 4-20% y se transfirieron las proteínas resueltas a membranas de Nitrocelulosa. Se visualizaron las proteínas por tinción con azul brillante de Coomassie (Panel A) o nitrato de plata (Panel B) y se visualizaron los antígenos por reacción con reactivo de anticuerpo monoclonal frente a proteína E viral de la EJ (Panel C). Ruta 1, patrones de proteínas pre-coloreadas (Novex Seebue™) que representaban pesos moleculares de 250, 98, 64, 50, 36, 30, 16 y 6 kDa desde la parte superior; Ruta 2-10, fracción N° 3-11 desde el fondo después de ultracentrifugación; E, proteína de cubierta; C, proteína de la cápside; M, proteína de la membrana.

La Figura 4 muestra la cinética de inactivación con formaldehído del virus de la EJ CJ50003 purificado. Las preparaciones de virus de la EJ purificado se inactivaron con formaldehído al 0,018 % a 4°C ó 22°C. Se valoraron en las muestras tomadas en los tiempos indicados sus virus infecciosos residuales poniéndolas en placas directamente en monocapas de células Vero. Adicionalmente, se realizó un ensayo de multiplicación para detectar niveles bajos de virus como sigue. Se inocularon matraces por duplicado que contenían monocapas de células Vero con muestras de instantes de inactivación del virus. Después de un periodo de adsorción de 2 h a 35°C, se volvieron a alimentar las células y se incubaron a 35°C. Se volvieron a alimentar las células el día 7 y el día 14 posinfección. Se recolectó el medio de cultivo y se puso en placas para detectar virus infeccioso. Los instantes de inactivación de dos experimentos separados se muestran: 4°C (rectángulo relleno), 22°C (círculo relleno). Se hicieron en paralelo controles de inactivación térmica (no formaldehído) (rectángulo vacío para 4°C y círculo vacío para 22°C).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una cepa del virus de la EJ que presenta propiedades deseables para la preparación de la vacuna contra la EJ. Dicho virus es un virus atenuado y se puede propagar en la línea celular continua, Vero que es admitida por la OMS como sustrato celular para producción de vacunas humanas. Así, se espera que dicho virus se pueda usar para la preparación de vacunas contra la EJ de virus inactivados y vivos más seguras que la vacunas actuales.

La presente invención proporciona una vacuna que satisface la presente necesidad. Se ha adaptado un virus contra la EJ a célula Vero por pases en serie a no más de 35°C. Los pases continuados en célula Vero dieron como resultado un aumento en el título del virus, más de 10^7 ufp/ml de sobrenadante de cultivo y tiempo de cultivo reducido para mostrar un título del virus máximo. La invención se refiere al desarrollo de un procedimiento de recolección de tiempo múltiple sin requerimiento de suero como complemento dando como resultado un alto rendimiento de productividad del virus, que son propiedades comercialmente factibles para la producción a gran escala de dicha vacuna con eficacia de coste. Según la invención, el procedimiento de recolección múltiple en cultivo del virus es responsable del grado reducido de efecto citopático (ECP) de células infectadas. La vacuna contra la EJ de la presente invención contiene una cantidad extremadamente pequeña de componentes procedentes de células residuales debido al nivel reducido de ECP. Además, se espera que la vacuna contra la EJ de la presente invención permita inmunogenicidad aumentada y mayor protección frente a la enfermedad que las vacuna contra la EJ actuales. La vacuna contra la EJ purificada, de la presente invención, presenta una ventaja principal sobre las vacunas actuales porque los virus purificados de las células Vero cultivadas satisfacen los requerimientos de desarrollo para vacuna humana.

La presente invención también se refiere a los métodos para la preparación de dicha vacuna. Los métodos pueden proporcionar alta productividad, pureza y potencia de dicha vacuna. El virus de la EJ CJ50003 se obtiene sometiendo el virus de la EJ SA14-14-2 (RPP) a 4 pases o más de adaptación en las células de cultivo de tejido de Vero a temperaturas no mayores que 35°C y seleccionando el virus cultivado mientras se vigila la propagación del virus basada en el número de focos que se formaron en células Vero y/o LLC-MK2. El virus obtenido de esa adaptación presenta un título máximo de al menos 1×10^7 ufp/ml de sobrenadante de cultivo en cultivo de células Vero y un periodo de incubación reducido para la recolección. El virus de la EJ SA14-14-2 es una cepa atenuada que se obtiene por adaptación de un virus de la EJ de cepa natural SA 14 de mosquito, en la célula de cultivo de tejido de Riñón de Hámster Primario (RHP) y la célula de cultivo de tejido de Riñón de Perro Primario (RPP) (Kenneth H. Eckels, et al. Vaccine 6 513-518, 1.988). Pero las células de RHP y RPP no están admitidas por la OMS, así que no son adecuadas para la preparación de vacunas aplicables a seres humanos. La célula Vero está admitida por la OMS para uso humano, así que la cepa de virus de la EJ adaptado a Vero, CJ50003, es una buena base para la producción de vacuna para seres humanos.

Se sabe que el virus SA14-14-2(RPP) pertenece a flaviviridae y tiene las siguientes propiedades fisicoquímicas: genoma de ARN con sentido positivo, monocatenario, con extremo metilado 5' y extremo 3' sin estructura de poli A. El tamaño del genoma de ARN es aproximadamente 11 kb y el genoma está en un estado combinado con proteína de la nucleocápside (C) de 13.500 Da. El virus está constituido adicionalmente por proteína de membrana (M) de 8.700 Da, proteína de la cubierta (E) de 53.000 Da y proteínas no estructurales NS1, 2a, 2b, 3, 4a, 5 y similares.

La cepa de virus de la EJ adaptada a Vero, CJ50003 se pasó a célula Vero por 30 pases. El título del virus y la morfología de la placa no variaron por pase, sugiriendo que el virus presenta un carácter fenotípico estable.

Para conseguir un entendimiento de la base molecular para las características biológicas del virus de la EJ CJ50003, se analizaron las propiedades fisicoquímicas del virus. Se determinó la secuencia de las bases del genoma vírico por clonación y secuenciación del ADNc. Como resultado, se descubrió que tres bases adenina de las posiciones 1.032, 1.506 y 1.704 y una base guanina de la posición 1.769 del gen de la proteína E de virus de la EJ SA 14-14-2(RPP) fueron reemplazos por tres guaninas y una timina en el virus de la EJ CJ50003, respectivamente. De acuerdo con esto, se cambió la secuencia de aminoácidos de proteína E desde treonina de la posición 19, treonina de la posición 177, lisina de la posición 243 y glutamina de la posición 264 a alanina, alanina, glutamato e histidina, respectivamente. Los cambios de aminoácido en la proteína E se mantuvieron por pase del virus en la célula Vero mientras duraba nuestra investigación.

El virus de la EJ CJ50003 no mató a los ratones cuando se inyectaron los virus que tenían diferente número de pases en células Vero, a ratones jóvenes por vía intracerebral. De acuerdo con esto, se puede decir que el virus de la EJ adaptado a Vero CJ50003 es una cepa del virus atenuada y estable con poca o ninguna neurovirulencia. Es uno de los puntos críticos para usar dicho virus para la vacuna viva contra el virus de la EJ y/o la vacuna inactivada.

La presente invención también proporciona un método para purificar virus de cultivo celular sin congelar los materiales brutos o de pureza intermedia. Dicho método comprende las etapas de: retirar partículas celulares, concentrar el virus, purificar el virus por precipitación de los materiales de origen celular y ultracentrifugación por gradiente de sacarosa, fraccionar de los ingredientes y ensayar las fracciones para virus. Más específicamente, la

presente invención proporciona un método para la producción de virus contra la EJ purificados, por propagación de virus a alto título en líneas celulares continuas, en presencia o ausencia de complementos de proteína de suero, purificación del virus por ultracentrifugación y mezcla de las fracciones positivas del virus.

5 Dichos virus se propagan en células de cultivo de tejido Vero. Las células Vero cultivadas de manera confluyente en frascos rotativos se infectan y se incuban con el virus CJ50003. La recolección del virus se puede realizar por el método de recolección múltiple. La recolección de sobrenadante de cultivo se inició en el momento de 2 ó 3 días posinfección según mdi de infección y se volvió a alimentar el medio fresco al cultivo. Después de 2 días de incubación del cultivo alimentado de nuevo, se recolectó de nuevo el sobrenadante del cultivo. La recolección se
10 puede repetir hasta 4 veces por 8 ó 9 días posinfección con el título del virus mantenido a más de 10^7 ufp/ml de sobrenadante de cultivo. El método de recolección múltiple dio un rendimiento alto de virus por unidad de frasco rotativo, así que hace esta invención más compatible con las leyes de mercado. Además, el procedimiento es responsable del grado reducido de ECP de células infectadas. El nivel reducido de ECP contribuye a un nivel extremadamente bajo de componentes procedentes de células residuales en una vacuna contra la EJ de la presente invención. Los sobrenadantes de cultivo recolectados se pueden almacenar a 4°C hasta que empieza la purificación. La clarificación de los sobrenadantes de cultivo recolectados se puede llevar a cabo por métodos comunes conocidos en la técnica incluyendo centrifugación a baja velocidad, por ejemplo, a 1.500 g durante 10 min y/o por filtración por un filtro de tamaño de poro de 0,45. El fluido de cultivo recolectado se almacena a 4°C hasta
20 concentración. Para la concentración del virus, se ultrafiltra el fluido del cultivo y se recoge el retenido. En otro método para concentración, se disuelve el polietilenglicol (PEG) 8000 en el fluido del cultivo hasta 10% y se disuelve el precipitado en un tampón apropiado, por ejemplo disolución salina tamponada de fosfato (PBS, pH 7,0). Se realiza la precipitación de sulfato de protamina para eliminación del ADN u otros materiales que se originaron de la célula, que se puede llevar a cabo por adición de sulfato de protamina a disolución concentrada de virus y centrifugación a alta velocidad, por ejemplo, a 12.000 g, durante 5 min. Para más purificación del virus, se lleva a cabo ultracentrifugación con gradiente de densidad en gradientes de sacarosa continuos o multietapa al 15-60%. Se
25 fracciona el gradiente de sacarosa y se ensaya el virus en las fracciones. Los métodos para ensayar fracciones positivas de virus incluyen ensayo en placa, ensayo de hemaglutinación, electroforesis en gel de poliacrilamida y ensayos de antígeno tales como inmunoensayos. Se mezclan las fracciones para tratamiento adicional sobre la base de alto título de virus y bajo nivel de otras impurezas. La pureza del virus purificado mezclado se estimó por ensayo para ADN cromosomal y proteína originados en célula Vero. Los resultados mostraron que los contenidos de ADN celular y proteína en huésped son tan bajos como 2,5 pg y 2 ng por 5 µg de virus purificado de la EJ, respectivamente, que demostró los métodos de purificación descritos anteriormente eliminaban con eficacia otras impurezas a partir de antígeno vírico. El rendimiento de virus de la EJ de 1 l de fluido de cultivo infectado se estima que es aproximadamente 2,3 miligramos.

35 La presente invención también proporciona un método de inactivación del virus de la EJ para destruir su infectividad al tiempo que se conserva su antigenicidad. Dicho método comprende añadir una cantidad eficaz de formaldehído e incubar dicho virus con dicho agente en ciertas condiciones de manera que se inactive dicho virus. Específicamente, se diluyó la mezcla de las fracciones a una concentración de proteína apropiada con un tampón apropiado tal como PBS y se añadió el formaldehído a la mezcla de fracciones diluidas. La incubación con formaldehído se realizó a 40 22°C ó 4°C. Se requirieron al menos 4 ó 46 días para destruir completamente la infectividad vírica sin pérdida de antigenicidad vírica a 22°C ó 4°C, respectivamente. El procedimiento de inactivación del virus de la EJ a 22°C se eligió preferiblemente por simplicidad en cultivo a gran escala y el tiempo de incubación se extendió a 7 días para un margen de seguridad. Sin embargo, ejemplos de agentes de inactivación que fueron eficaces incluyen, pero no se limitan a, formaldehído. En general, esto se puede conseguir por medios químicos o físicos. Se puede efectuar la inactivación química por tratamiento de los virus, por ejemplo, con enzimas, β-propionlactona, etileno-imina o un derivado de las mismas y un disolvente orgánico tal como Tween, Tritón, desoxicolato de sodio y sulfobetaina. Si es necesario, la sustancia de inactivación se neutraliza después; el material inactivado con formaldehído puede neutralizarse, por ejemplo, con tiosulfato. La inactivación física se puede realizar preferiblemente sometiendo los
50 virus a radiación rica en energía, tal como luz UV, radiación X o radiación gamma.

Las vacunas contra la EJ se preparan como inyectables, como disolución líquida o suspensión. Es posible añadir un agente estabilizante tal como carbohidratos (sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, dextrano, glucosa, etc.), proteínas (albúminas, caseína, etc.), un agente que contiene proteínas (suero bovino, leche desnatada, etc.) y tampones (tales como fosfato de metal alcalino). La preparación se puede liofilizar después de añadir un estabilizante y se puede almacenar a vacío o en nitrógeno. Si se desea, se puede añadir uno o más compuestos con una acción adyuvante. Compuestos adecuados para este fin son, por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato u óxido, aceite de parafina (tal como Bayol, Marcol 52) y saponinas. Además, si se desea, también se añade uno o más emulsionantes, tales como Tween y span, a los materiales de los virus.

60 La eficacia de un adyuvante se determinó midiendo la cantidad de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra el virus que resultan de la administración del virus inactivo en vacunas, que se absorben también a un adyuvante. Ejemplos de adyuvante que fue eficaz incluyen, pero no se limitan a, hidróxido de aluminio. Se investigó la eficacia en la vacuna obtenida por el ensayo de neutralización por reducción en placa (PRNT, por sus siglas en inglés) con los sueros de dichos ratones inmunizados por la vacuna y estimulación directa de ratones inmunizados con un virus
65

neurovirulento. Como resultado, se mostró que dicha vacuna tenía la misma eficacia o mejor de obtención de anticuerpo neutralizante que vacunas comparables.

5 Para investigar posibles cambios en la inmunogenicidad de virus adaptados a Vero con diferentes números de pases, las vacunas se prepararon con diferente número de pases y se comparó la eficacia de cada vacuna. No hubo diferencia destacable en la eficacia entre las vacunas preparadas a partir de virus con diferente número de pases a pesar de realizarse pases sucesivos en célula Vero. Así, se puede decir que la cepa de virus de la EJ adaptados a Vero, CJ50003, presenta inmunogenicidad estable.

10 Los siguientes ejemplos ilustran el virus de la EJ atenuado adaptado a célula Vero según la presente invención y la vacuna contra la EJ que comprende dicho virus atenuado según la presente invención. De la descripción anterior y los siguientes ejemplos, se cree que los expertos en la materia podrían realizar la invención en la mayor extensión.

15 EJEMPLO 1

Adaptación de virus SA14-14-2(RPP) en célula Vero

Se usó el virus de la EJ SA 14-14-2 (RPP), SA 14-14-2 en 8 pases de cultivo celular de riñón de perro para iniciar pases en serie en cultivo de células Vero. Se inocularon las monocapas de células Vero con EJ SA14-14-2 (RPP) a una mdi de 0,1 ufp por célula. Los cultivos de células infectadas se cultivaron en matraces de cultivo de 25 cm² que contenían 5 ml de medio nutriente que consistió en medio esencial mínimo de Eagle enriquecido con suero fetal bovino al 10% en una atmósfera de aproximadamente 5% de CO₂ en aire y a una temperatura no mayor que aproximadamente 35°C, típicamente a desde aproximadamente 32°C a aproximadamente 35°C, siendo preferido aproximadamente 35°C. Se controló el crecimiento vírico por observación al microscopio de efecto citopático (ECP) y diversos ensayos para la presencia de antígeno vírico incluyendo ensayo de hemadsorción (HA), ensayo de placa y ensayo de inmunoanálisis ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Se recolectó el virus de la EJ el día 5 posinfección cuando el cultivo presentaba máximo de título del virus, se clarificó por centrifugación. Se purificó la placa sola a partir del sobrenadante clarificado y se multiplicó en células Vero. Se volvió a infectar el virus multiplicado en célula Vero por más pases. Se realizaron pasees en serie posteriores hasta 30 pases por sucesiva infección del virus, valoración y purificación de placa, como se describió anteriormente. Como se muestra en la Figura 1, los títulos del virus alcanzaron aproximadamente 4X10⁷ ufp por ml de sobrenadante de cultivo con 4 pases en células Vero y se mantuvieron próximos a este nivel en más pases. Además, el periodo óptimo para recolección vírica se redujo de 5 días con el pase 1 a 2 - 3 días con el pase 4. Un aumento significativo en el rendimiento de virus, aproximadamente 10⁵ ufp/ml a más de 10⁷ ufp/ml y una disminución en el tiempo de incubación dieron como resultado una selección del pase 4 de EJ en células Vero como material de partida de elección para la preparación de una vacuna candidata contra la EJ. El pase 4 de la EJ en células Vero se marcó como CJ50003 (Vero, PS4). La abreviatura PS significa número de pases de virus en la célula designada.

40 EJEMPLO 2

Caracterización de virus CJ50003; Secuenciación del gen de la cubierta y estudio de neurovirulencia

Como esfuerzo para proporcionar un entendimiento de la base molecular para la característica biológica de la cepa CJ50003, se determinó la secuencia de nucleótidos 1.500 que codifica el gen de la cubierta (E) que posee epítomos de neutralización principales y se comparó con las de las cepas de vacunas precursoras, SA 4-14-2(RPP), SA 14-14-2(RHP) y un virus SA14 de cepa natural (Aihira, S. et al. Virus Genes, 5: 95-109, 1.991; Ni, H. et al. J Gen Virol. 76: 401-407, 1.995; Ni, H. et al. J Gen Virol. 76: 409-413, 1.995; Nitayaphan, S. et al. Virology 177: 541-542, 1.990). Se usó virus CJ50003 (Vero, PS4) para análisis de secuencia. Esto reveló que la región C-terminal (aminoácido 280-500) muestra una conservación completa, mientras que la región N-terminal (aminoácido 1-279) muestra variación de secuencia entre las cepas de virus. Las mutaciones en la región N-terminal están casi uniformemente distribuidas. La secuencia de nucleótidos del gen de la proteína E de CJ50003 difiere de SA 14/CDC por 8 nucleótidos y 7 aminoácidos mientras que SA 14-14-2(RPP) difiere de SA14/CDC por 7 nucleótidos y 5 aminoácidos. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

55 La secuencia del virus CJ50003 difiere de la secuencia publicada del virus SA 14-14-2(RPP) en las posiciones 5: los cambios del nucleótido en las posiciones 1.032, 1.506, 1.704 y 1.769 dieron como resultado diferencias de 4 aminoácidos entre los virus SA14-14-2 (RPP) y CJ50003: los cambios del nucleótido en la posición 989 no dieron como resultado sustitución de aminoácidos. Pases mayores del virus CJ50003, es decir, el pase 15 y 30 no revelaron cambios de nucleótido adicionales. Hubo, por lo tanto, 5 cambios distintos de nucleótido y 4 de aminoácido entre CJ50003 y el virus precursor, SA14-14-2(RPP) y estos cambios fueron estables en el pase de este virus en cultivo celular. El resto Lys en 243 en el SA14-14-2(RPP), que es especialmente diferente comparado con otros virus de la EJ atenuados se substituyó con resto Glu en CJ50003.

65 La secuencia CJ50003 también difiere de la secuencia publicada del virus SA14-14-2(RHP) (Aihira, S. et al. Virus Genes, 5: 95-109, 1.991). La diferencia de nucleótido en 1.032 causó diferencia de aminoácidos en la posición E19

pero el cambio de nucleótido en la posición 989 no dio como resultado sustitución de aminoácido. Los nucleótidos en 1.506 y 1.704 en el virus CJ50003 fueron los mismos que los presentes en el SA14-14-2(RHP) en estas posiciones mientras difieren del SA14-14-2(RPP) en esas posiciones. El patrón de sustituciones por la región N-terminal del CJ50003 y el gen E de SA 14-14-2(RHP) es casi el mismo salvo la sustitución de aminoácidos en E 19.

5 Los virus SA14-14-2(RHP), SA14-14-2(RPP) y CJ50003 presentan 4 sustituciones de aminoácidos idénticas comparado con la secuencia de virus SA 14 precursor en la posición E107, E138, E176 y E279. De esos, los aminoácidos en la posición E138 y E176 (Ni, H. et al. J Gen Virol. 76: 409-413, 1.995), que se sabía que contribuían a la atenuación aún se conservaban después de adaptación a Vero, sugiriendo que CJ50003 no perdió su carácter
10 atenuador.

Tabla 1 Comparación de secuencias de nucleótidos y aminoácidos entre cepas de virus de la EJ SA14, SA-14-14-2(RHP), SA14-14-2(RPP) Y CJ50003.

Posición	Nucleótido				Aminoácido							
	SA14/ USA	SA14/JAP CDC	SA14-14-2/P HK	SA14-14-2/PDK	CJ50003	SA14/ USA	SA14/ CDC	SA14/J AP	SA14-14-2/PHK	SA14-14-2/PDK	SA14-14-2/PDK	CJ50003
NT	AA	SA14/ USA	SA14/JAP CDC	SA14-14-2/P HK	SA14-14-2/PDK	CJ50003	SA14/ USA	SA14/ CDC	SA14/J AP	SA14-14-2/PHK	SA14-14-2/PDK	CJ50003
989	E4	G	G	U	U	G	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
1032	E19	A	A	A	A	G	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Ala
1052	E25	G	A	A	A	A	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
1061	E26	U	U	C	C	C	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
1217	E80	C	U	U	C	C	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
1296	E107	C	C	U	U	U	Leu	Leu	Leu	Phe	Phe	Phe
1389	E138	G	G	A	A	A	Glu	Glu	Glu	Lys	Lys	Lys
1503	E176	A	A	G	G	G	Ile	Ile	Ile	Val	Val	Val
1506	E177	A	A	G	A	G	Thr	Thr	Thr	Ala	Thr	Ala
1704	E243	G	G	G	A	G	Glu	Glu	Glu	Glu	Lys	Glu
1708	E244	G	A	A	A	A	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
1769	E264	G	G	A	G	U	Gln	Gln	Gln	His	Gln	His
1813	E279	A	A	U	U	U	Lys	Lys	Lys	Met	Met	Met
1921	E315	C	U	U	U	U	Ala	Val	Ala	Val	Val	Val
1977	E334	C	C	C	C	C	Pro	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro
2293	E439	A	G	G	G	G	Lys	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
2441	E488	G	A	A	A	A	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly

AA: aminoácido; NT: cepas posición nucleótido.

Se ensayó la neurovirulencia en ratones en CJ50003 y el SA14-14-2(RPP) precursor por inyección intracerebral (i.c.) en los ratones BALB/c de 4 semanas. Los resultados se presentan en la Tabla 2. La letalidad para ratones adultos jóvenes no fue significativamente diferente entre los virus SA14-14-2(RPP) y CJ50003, que es muy baja comparada con la del virus SA14 de cepa natural. Así, parece ser que la introducción para el sustrato de célula Vero no proporcionaba un fenotipo neurovirulento al virus SA14-14-2(RPP) y el CJ50003 aún presenta carácter atenuado.

Tabla 2. Virulencia intracerebral de ratones de 4 semanas inoculados con virus CJ50003 con pases Vero. PS representa pase en RPP o célula Vero.

Virus	Inóculo UFP	log LD ₅₀ ml ⁻¹	Relación LD ₅₀ /UFP
SA14(RPP, PS3)	2 x 10(7)	6,5	0,17 ^a
SA14-14-2(RPP,PS8)	1,3 x 10(6)	<1,5 ^b	<0,00002 ^a
CJ50003 (Vero, PS6)	3,4 x 10(7)	<1,5 ^b	<0,000001
CJ50003 (Vero, PS15)	3,2 x 10(7)	<1,5 ^b	<0,000001
CJ50003 (Vero, PS30)	3,6 x 10(7)	<1,5 ^b	<0,000001

a: Kenneth H. Eckels et al (Vaccine 6: 513-518, 1.988).

b: 0/10 ratones murieron después de inoculación con virus no diluido.

El volumen de inóculo para inyección i.c. es 0,03 ml por ratón.

10 EJEMPLO 3

Crecimiento y purificación de Virus

15 Se preparó la simiente de producción en el pase 5 de virus en célula Vero [CJ50003 (Vero, PS5)] y se almacenó en congelador. Las células Vero se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, Gibco) que contenía suero fetal bovino al 10% (FBS, Gibco). Se infectaron cultivos de frascos rotativos de monocapas de célula Vero con virus de simiente de producción a una mdi de 0,01 a 0,1 ufp por célula. Después de 2 horas de adsorción de virus, se lavaron los cultivos 3 veces con PBS y se alimentaron con EMEM que contenía suero y se incubaron a 35°C. En cultivos de célula Vero infectados, los virus alcanzaron títulos de alrededor de 10⁷ a 10⁸ ufp/ml los días 2 ó 3 posinfección. Al tiempo que se tomaban recolecciones de virus 4 veces a intervalos de 2 días hasta 8 ó 9 días posinfección empezando desde 2 ó 3 días posinfección, aún se mantenían los títulos de los virus más de 10⁷ ufp/ml con ECP cada semana. Pero después de 9 días posinfección, los títulos estaban por debajo de 10⁷ ufp/ml (Figura 2). Se centrifugaron las recolecciones mezcladas a 838 rad/s (8.000 rpm) durante 15 minutos y se filtraron los sobrenadantes por un filtro de 0,45 µm. Se concentraron los sobrenadantes de cultivo de virus por ultrafiltración (Ultrasette, Filtrón, 100k) o precipitación con PEG. Se recolectó el virus precipitado por PEG por centrifugación y se suspendió en tampón PBS o STE (Tris 10 mM pH 7,2, AEDT 1 mM, NaCl 150 mM). Se concentró el retenido después de ultrafiltración a 250 ml y se lavó la casete con 100 ml de PBS. Se enfriaron los concentrados de virus en el hielo durante 2 horas después de añadir 0,5 - 2 mg/ml de sulfato de protamina y los sobrenadantes obtenidos por centrifugación a 1.047 rad/s (10.000 rpm) durante 5 minutos. Se purificaron los virus concentrados por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. Se llevó a cabo la ultracentrifugación a 38.000 g durante 18 horas. Las fracciones se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida que contenían el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Las bandas de la proteína de la nucleocápside (C, 13.500 Da), la proteína de la membrana (M, 8.700 Da) y la proteína de la cubierta (E, 53.000 Da) se observaron en el SDS-PAGE (Figura 3, panel A). Se detectaron antígenos (E) de la Cubierta por ensayo Western con anticuerpo monoclonal de virus anti-EJ de ratón (Figura 3, panel C). Se mezclaron las fracciones positivas de los virus, fracciones nº 4 a 9, en que otras bandas de proteína salvo proteínas víricas no eran evidentes en gel teñido de plata (Figura 3, panel B) y se ensayó la concentración de proteínas por método Lowry. Los resultados detallados se presentan a partir de dos purificaciones de cultivos Vero infectados concentrados con ultrafiltración de flujo tangencial o por precipitación PEG8000 (Tablas 3 y 4). Se diluyó virus purificado con dos volúmenes de PBS, añadidos al 0,01% de Tween 80 final y se filtró por un filtro de 0,22 µm.

Tabla 3. Purificación de virus de la EJ por concentración con ultrafiltración de flujo tangencial.

Muestra	Volumen Total (ml)	Total ufp	%Rendimiento (ufp)	Proteína total (mg)	%Rendimiento (proteína)	Actividad Especifica (ufp/mg)
Sobrenadante						
cultivo	10.000	4,4x10 ¹¹	100	600	100	7,3x10 ⁷
mezclado						
Concentrado	200	4,0x10 ¹¹	90	280	47	1,4x10 ⁸
filtrón						

(continúa)

Muestra	Total Volumen (ml)	Total ufp	%Rendimiento (ufp)	Proteína total (mg)	%Rendimiento (proteína)	Actividad Específica (ufp/mg)
Mezcla gradiente sacarosa	500	$3,8 \times 10^{11}$	86	42	7	$9,0 \times 10^9$
Filtración 0,22 μm	50	$2,4 \times 10^{11}$	55	23	3,8	$1,0 \times 10^{10}$

Tabla 4. Purificación del virus de la EJ por concentración con precipitación con PEG8000

Muestra	Total Volumen (ml)	Total ufp	%Rendimiento (ufp)	Proteína total (mg)	%Rendimiento (proteína)	Actividad Específica (ufp/mg)
Sobrenadante cultivo mezclado	10.000	$4,4 \times 10^{11}$	100	600	100	$7,3 \times 10^7$
Precipitado PEC	200	$2,7 \times 10^{11}$	61	40	6,7	$6,8 \times 10^9$
Mezcla gradiente sacarosa	500	$2,5 \times 10^{11}$	56	15	2,5	$1,7 \times 10^{10}$
Filtración 0,22 μm	50	$1,6 \times 10^{11}$	41	12	2	$1,3 \times 10^{10}$

Se comparó en las preparaciones de virus la pureza relativa usando medidas de actividad específica (es decir, ufp/mg de proteína). Los virus purificados a partir de concentrado por ultrafiltración presentaban aproximadamente la misma actividad que los virus purificados a partir de concentrado por precipitación de PEG8000. También se estimó la pureza de los virus purificados mezclados por ensayo de ADN cromosómico y proteína originados de células Vero. Los resultados mostraron que los contenidos de ADN y proteína celular del huésped eran tan bajos como 2,5 pg y 2 ng por 5 μg de virus de la EJ purificados, respectivamente, sin tener en cuenta el método de concentración, que demostró que los dos métodos de purificación descritos anteriormente eliminaban de manera eficaz otras impurezas del antígeno vírico. Sin embargo, en términos de rendimiento de proteína de virus purificados, el método de purificación usando ultrafiltración es 2 veces mejor que el método de purificación que implica precipitación de PEG8000.

EJEMPLO 4

Inactivación de virus

El virus purificado se usó directamente para preparación de vacuna viva atenuada después de diálisis con PBS o inactivada con formaldehído durante la preparación de vacuna inactivada. La inactivación con formaldehído al 0,018% se llevó a cabo a 22°C o 4°C. Se tomaron muestras a intervalos regulares y se ensayaron directamente virus infecciosos por valoración en placa (Figura 4). Las muestras que eran negativas por ensayo de placa directo se sometieron a pase ciego en monocapas de célula Vero para amplificar los bajos niveles de virus y después se volvieron a poner en placas. Se encontró que se requerían 4 días a 22°C o 46 días a 4°C para inactivación completa de la infectividad (Tablas 5 y 6). La antigenicidad del virus se vigiló durante la inactivación ensayando muestras con el ensayo *spot blot* de antígeno y antisueros policlonales. Mediante este ensayo parecía no haber pérdidas detectables en antigenicidad después de exposición a formaldehído al 0,018% durante hasta 10 días a 22°C o 15 días a 4°C.

La inactivación con formaldehído en estas condiciones se llevó a cabo durante al menos 7 días a 22°C o 60 días a 4°C, dando un margen de seguridad. Después de inactivación, el formaldehído libre en las muestras se neutralizó por la adición de metabisulfito de sodio al 0,038%. Se llevó a cabo diálisis al mismo tiempo con PBS y después se filtró por un filtro de 0,22 μm .

Tabla 5. Inactivación con formaldehído de virus de la EJ, CJ50003 a 4°C

Día	virus de la EJ (-HCHO)	virus de la EJ (+HCHO)	Multiplicación
0	3,2 x 10 ⁸	3,2 x 10 ⁸	+
0,5	2,6 x 10 ⁸	3,2 x 10 ⁶	+
1	1,52 x 10 ⁸	7,9 x 10 ⁵	+
1,5	2,4 x 10 ⁸	4,8 x 10 ⁵	+
2	2,8 x 10 ⁸	6,4 x 10 ⁴	+
3	2,6x10 ⁸	4,3 x 10 ³	+
4	1,9 x 10 ⁸	1.300	+
5	2,4 x 10 ⁸	285	+
6	2,8 x 10 ⁸	480	+
7	1,6 x 10 ⁸	200	+
11	1,5 x 10 ⁸	0	+
22	1,4 x 10 ⁸	0	+
32	1,2 x 10 ⁸	0	+
46	1,0 x 10 ⁸	0	-
60	1,0 x 10 ⁸	0	-

Tabla 6. Inactivación con formaldehído del virus de la EJ a 22°C

Hora	virus de la EJ (-HCHO)	virus de la EJ (+HCHO)	Multiplicación
0	3,2 x 10 ⁸	3,2 x 10 ⁸	+
3	3,0 x 10 ⁸	1,3 x 10 ⁶	+
6	2,7 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁵	+
12	2,5S x 10 ⁸	3,5 x 10 ⁵	+
24	1,2 x 10 ⁸	140	+
36	1,2 x 10 ⁸	0	+
48	1,2 x 10 ⁸	0	+
72	1,1 x 10 ⁸	0	+
96	1,1 x 10 ⁸	0	-
360	1,0 x 10 ⁸	0	-

EJEMPLO 5

5 **Inmunogenicidad de virus inactivado purificado (VIP), CJ50003 y virus vivos atenuados (VAV) en ratones**

Se ensayaron entonces las inmunogenicidades de VAV y VIP en ratones con vacuna inactivada Biken comercializada previamente. Los grupos de 20 ratones BALB/c de seis semanas se inmunizaron por vía intraperitoneal (i.p.) con tres clases de inmunógeno. Se realizó inmunización con dos inoculaciones sin adyuvante a intervalos de 2 semanas. Se obtuvieron sueros de dos semanas después de segunda inmunización de cada grupo de ratones, se mezclaron y se ensayó con posterioridad la presencia de anticuerpos de neutralización por método PRNT (Tabla 7). Como se muestra en la Tabla 7, no hubo diferencia significativa en el título de anticuerpo de neutralización entre grupos que recibieron tres clases de inmunógeno.

15 **Tabla 7. Inducción de anticuerpos de neutralización en ratones inmunizados con VIP o VAV**

Inmunógeno	Dosis	Títulos de anticuerpos ^a de neutralización
VIP	5 µg	1:320
VIP	10 µg	1:320
VAV	5 µg	1:320
VAV	10 µg	1:640
Vacuna Biken ^b	1 dosis	1:320

a: Se define el título de anticuerpo de neutralización como el recíproco de dilución de suero que da como resultado reducción del 50% de placas de virus de Nakayama de pases de cerebro de ratón.

b: 1 dosis de vacuna Biken contiene 5 µg de proteína vírica (TCA-precipitable) según el fabricante.

La inmunogenicidad de VIP se ensayó además en ratones. Se inmunizaron ratones endogámicos adultos con diversas diluciones de virus inactivados con o sin un adyuvante de alum. Se inmunizaron grupos de 20 ratones BALB/c de seis semanas por vía subcutánea, con 500, 50 y 5 ng de VIP en disolución salina o disolución salina con hidróxido de aluminio (Rehydragel). Los ratones recibieron dos inoculaciones espaciadas 3 semanas. Se mezclaron los sueros de cada grupo de ratones a las 3 semanas después de la segunda inmunización y se ensayó la presencia de anticuerpos de neutralización con cepa Nakayama de pases de cerebro de ratón como virus neutralizados (Tabla 8). Fue mejor VIP que la vacuna Biken en todas las dosis y el adyuvante mejoró significativamente la respuesta inmunitaria de los ratones a 50 y 500 ng de VIP aproximadamente 4 y 8 veces, respectivamente.

Tabla 8. Comparación del título de anticuerpo de neutralización en ratones inmunizados con VIP con o sin hidróxido de aluminio.

Inmunógeno	Dosis	Títulos de anticuerpos de neutralización ^a
VIP	500 ng	1:160
VIP	50 ng	1:40
VIP	5 ng	1:20
VIP + alum	500 ng	1:1.280
VIP + alum	50 ng	1:160
VIP + alum	5 ng	1:20
vacuna Biken	Dosis 1/1,0	1:80
vacuna Biken	Dosis 1/100	1:10
vacuna Biken	Dosis 1/1.000	1:10

a: Se define el título de anticuerpo de neutralización como el recíproco de dilución de suero que da como resultado reducción del 50% de placas de virus de Nakayama de pases de cerebro de ratón.

b: 1 dosis de vacuna Biken contiene 5 µg de proteína vírica (TCA-precipitable) según el fabricante.

La eficacia protectora *in vivo* de VIP se ensayó después en ratones BALB/c. Para ensayos de protección, se inocularon por vía subcutánea grupos de 10 ratones BALB/c de tres semanas en los cuartos traseros con virus de la EJ inactivados en disolución salina o disolución salina con hidróxido de aluminio (Rehydragel). Se inocularon controles de la misma edad con PBS o antígenos no específicos en aluminio. Se reforzó a los ratones con una dosis equivalente tres semanas más tarde. Se estimularon los ratones a las 3 semanas posinmunización por inoculación intracraneal con 500 ufp del virus de la EJ neurovirulento de ratón (Nakayama, adaptado a cerebro de ratón) contenido en 30 µl de PBS. Se vigiló a diario en los ratones estimulados su morbilidad y mortalidad durante hasta veintidós días. Como se muestra en la Tabla 9, los ratones inmunizados con 50 ng de VIP mostraron 90% de protección. Además, los ratones inmunizados con 50 y 5 ng de VIP mezclado con aluminio mostraron 100% y 70% de protección, respectivamente, al tiempo que una dosis de 1/100 de vacuna de Biken protegía sólo el 50% de los ratones inmunizados. En comparación, todos los ratones en el grupo de control llegaron a enfermar y murieron empezando los días cinco a siete postestimulación.

Tabla 9. Protección de ratones vacunados frente a estimulación con Inmunógeno de virus^a Nakayama

Inmunógeno	Dosis	Supervivientes
Control ^b		N/A 0/10
VIP	500 ng	10/10
VIP	50 ng	9/10
VIP	5 ng	3/10
VIP + alum	500 ng	10/10
VIP + alum	50 ng	10/10
VIP + alum	5 ng	7/10
Vacuna Biken ^c	Dosis 1/10	10/10
Vacuna Biken	Dosis 1/100	5/10
Vacuna Biken	Dosis 1/1.000	3/10

a: Ratones inmunizados con 2 inoculaciones de vacunas de ensayo espaciadas 3 semanas, estimulados después con 500 ufp de virus Nakayama neurovirulentos de ratón.

b: Se inocularon controles de la misma con PBS o antígenos no específicos en aluminio.

c: 1 dosis de vacuna Biken contiene 5 µg de proteína vírica (TCA-precipitable) según el

fabricante.

5 Para investigar la estabilidad inmunológica de virus CJ50003 en pases en célula Vero, se purificaron independientemente virus con diversos números de pases en célula Vero y se evaluaron las inmunogenicidades por el método como se describe en la Tabla 8. Como se muestra en la Tabla 10, no hubo una diferencia notable en la capacidad para obtener anticuerpos neutralizantes entre vacunas preparadas a partir de los virus con diferentes números de pases de virus en célula Vero, indicando que el virus CJ50003 es muy estable por pases en célula Vero en términos de inmunogenicidad.

10 Tabla 10. Potencias de la vacuna preparada con virus de la EJ con diferentes números de pase de virus en células Vero

Inmunógeno ^a	Dosis	Títulos de anticuerpos de neutralización ^b	D. e. ^c
VIP – 4ps	0,5 µg	1:150	20
VIP – 6ps	0,5 µg	1:145	15
VIP – 15ps	0,5 µg	1:130	28
VIP – 20ps	0,5 µg	1:140	18
VIP – 30ps	0,5 µg	1:160	13

a: Inmunógeno (VIP -Xps); vacuna inactivada purificada preparada con virus CJ50003 de la que el número de pases en células Vero es X.

b: El título de anticuerpo neutralizante se define como el recíproco de dilución de suero que da como resultado una reducción del 50% de placas de virus Nakayama de pases en cerebro de ratón y se toman valores medios de los resultados de estos tres experimentos separados. Se determina punto final al 50% por el método de Reed y Muench.

c: Desviación estándar.

15 Los resultados presentados en la presente memoria sugieren que tanto una vacuna de virus de la EJ inactivados como una vacuna viva atenuada usando la cepa CJ50003 se muestran prometedoras. Se desarrollaron procedimientos relativamente rápidos y eficaces para cultivar virus de la EJ en célula Vero, concentrándolos y purificándolos hasta una extensión que pueden ser adecuados para uso humano e inactivándolos sin pérdida medible de antigenicidad. Estas preparaciones se encontraron que eran inmunogénicas y protectoras en ratones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la preparación de una vacuna contra la encefalitis Japonesa que comprende hidróxido de aluminio como adyuvante y un virus de la encefalitis Japonesa atenuado o inactivado, **caracterizado porque** el método comprende realizar pases en serie del virus de la encefalitis Japonesa en células vero a temperaturas no mayores que aproximadamente 35°C.
- 10 2. Un método según la reivindicación 1, en el que el virus se somete a cuatro pases en células vero.
3. Un método según la reivindicación 1, en el que el virus se somete a más de cuatro pases en células vero.
4. Un método según la reivindicación 1, en el que el virus se somete a hasta treinta pases en células vero.
- 15 5. Un método según la reivindicación 1, en el que el método comprende inactivar el virus de la encefalitis Japonesa usando un agente de inactivación.
6. Un método según la reivindicación 1, en el que el método comprende un virus de la encefalitis Japonesa vivo atenuado no tratado por un agente de inactivación.
- 20 7. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que el método comprende además añadir aditivos farmacéuticamente aceptables.

Fig 1.

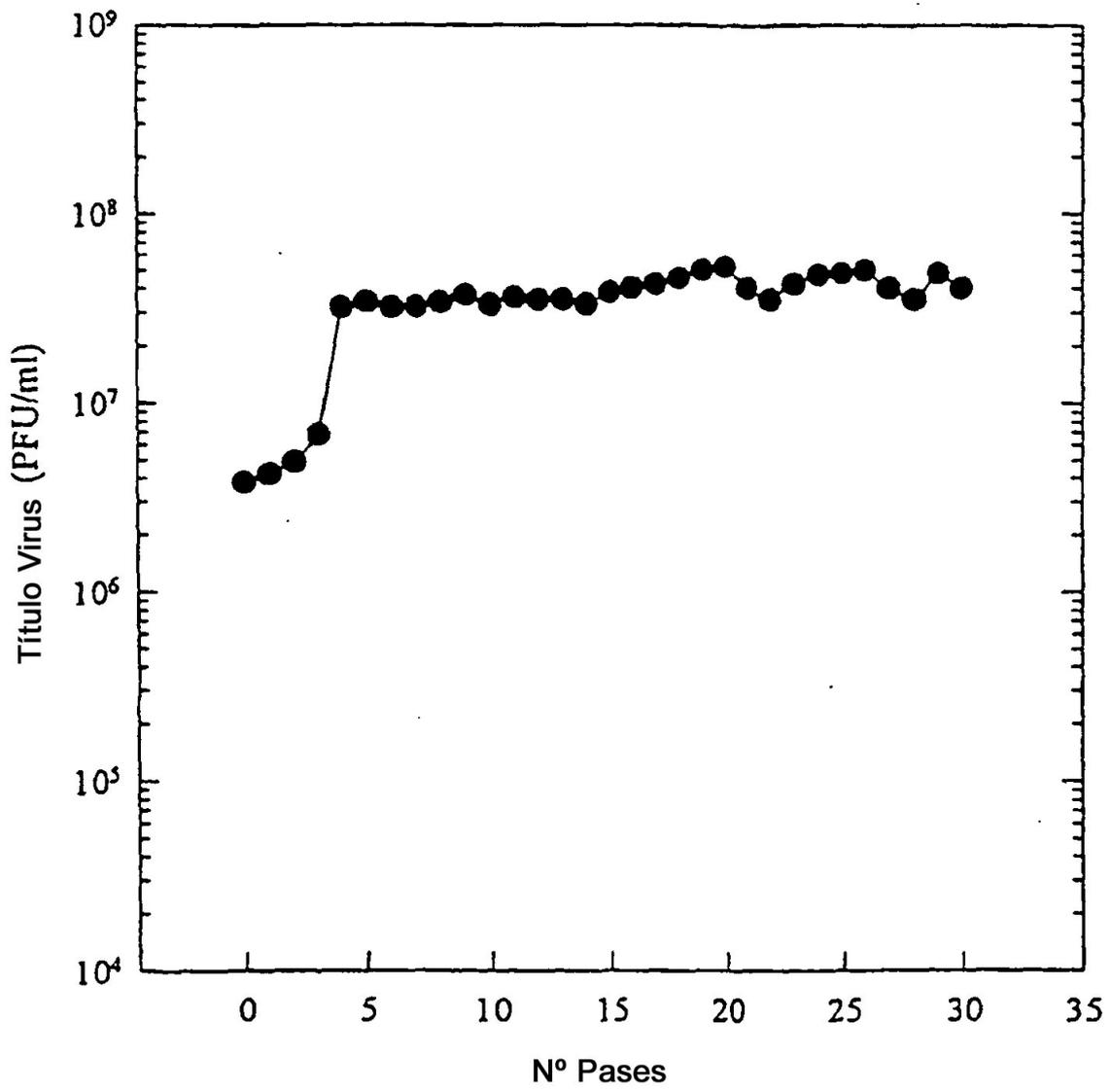


Fig 2.

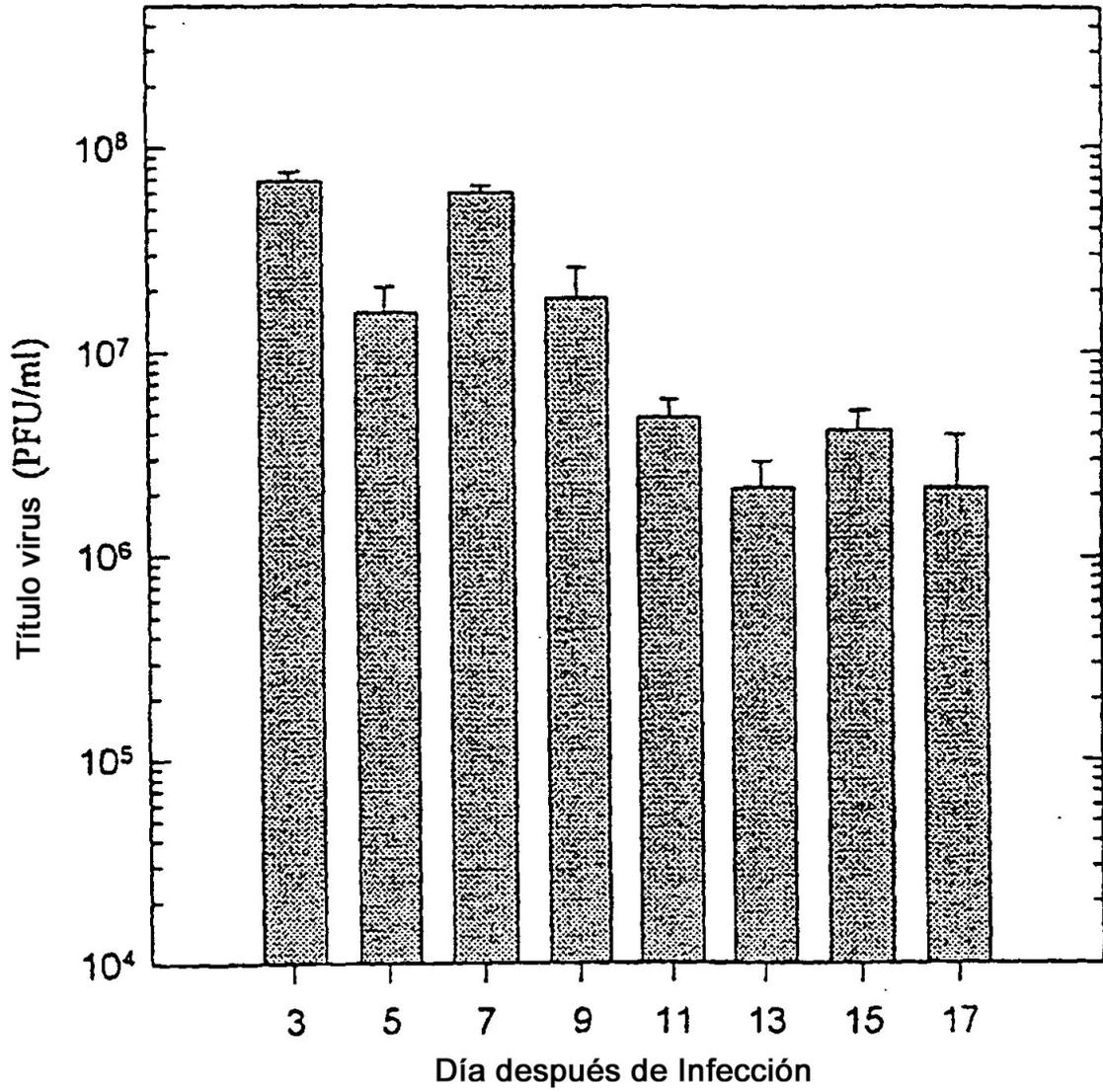


Fig 3.

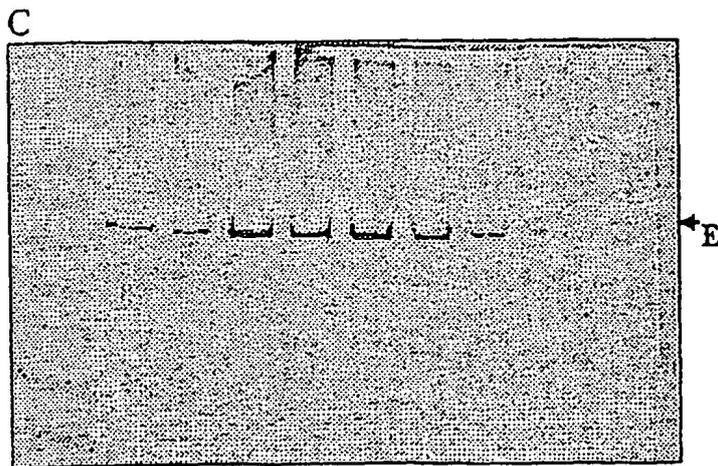
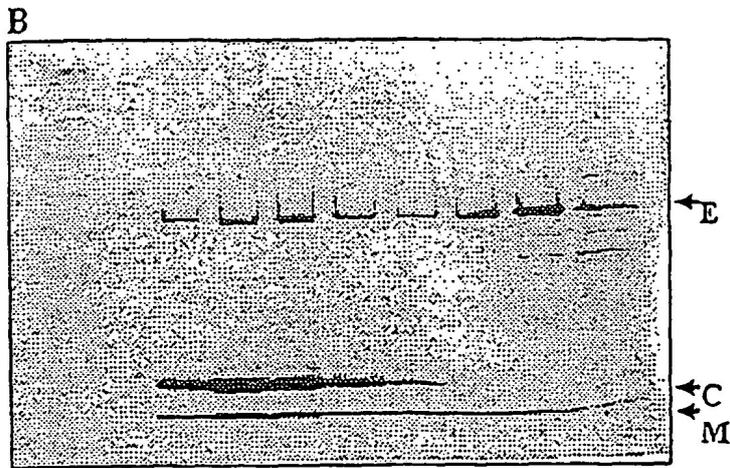
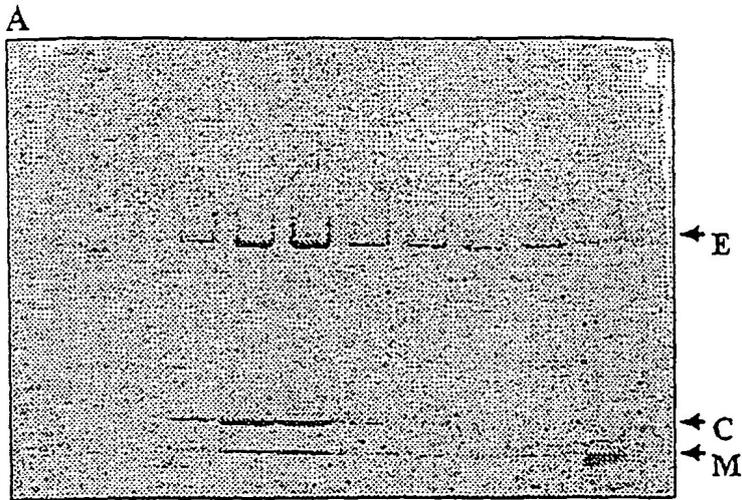


Fig 4.

