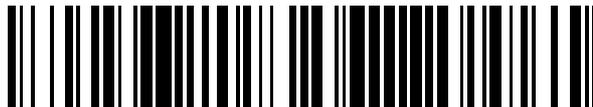


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 527**

51 Int. Cl.:

A61K 39/15 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2008 E 08829810 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2197487**

54 Título: **Inactivación térmica de rotavirus**

30 Prioridad:

04.09.2007 US 969826 P

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

13.04.2016

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (100.0%)
Technology Transfer Office 4770 Buford Highway, MS K79
Atlanta, GA 30341, US**

72 Inventor/es:

**JIANG, BAOMING;
GLASS, ROGER I. y
SALUZZO, JEAN-FRANCOIS**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 566 527 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inactivación térmica de rotavirus

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, a procedimientos y composiciones de rotavirus. Más específicamente, la presente invención se refiere a procedimientos de inactivar térmicamente rotavirus y composiciones de vacuna de rotavirus inactivado.

Antecedentes de la invención

10 De los diversos virus patógenos intestinales que provocan diarrea intensa en niños, el rotavirus es el más común que provoca un promedio de 611.000 muertes al año. Virtualmente todos los niños se infectan por rotavirus sobre la edad de 5. Se cree que el virus es altamente contagioso y se ha descrito como un virus "democrático", puesto que la infección no afecta a un grupo socioeconómico o geográfico particular de manera desproporcionada. Aunque la mayoría de los niños que tienen acceso a una adecuada atención médica complementaria y paliativa sobreviven a la infección sin consecuencias significativas a largo plazo, el número de muertes asociadas con diarrea intensa, vómitos, deshidratación y choque es inaceptable y requiere una intervención preventiva, si es posible.

15 La vacunación frente a la enfermedad mediada por rotavirus es una estrategia para abordar este problema de salud significativo. En la actualidad, aunque se han desarrollado y autorizado vacunas orales con microbios vivos, las continuas preocupaciones sobre seguridad y eficacia justifican un enfoque alternativo a la vacunación parenteral con una vacuna de rotavirus inactivado. Existe una escasez de procedimientos eficaces para inactivar rotavirus y composiciones de vacuna que incluyen rotavirus inactivados. Una dificultad particular es el tratamiento de rotavirus vivos para inactivar el virus mientras se mantiene la antigenicidad asociada con partículas de rotavirus de doble capa y triple capa sustancialmente intactas.

20 Pontes *et al.* (J.Mol.Biol.,2001, 307: 1171-1179) describen un procedimiento para la inactivación de rotavirus que usa diferentes condiciones, que incluyen una inactivación térmica a 60 °C durante tres minutos.

25 Existe una continua necesidad de procedimientos de inactivación de rotavirus y composiciones que incluyan rotavirus inactivado.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a una composición de vacuna que comprende rotavirus antigénico inactivado térmicamente caracterizado por una estructura de partícula de rotavirus intacta en la que el rotavirus en la composición es obtenible mediante el procedimiento que comprende:

30 exponer la preparación de partida de partículas de rotavirus a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C-80 °C, inclusive, durante un tiempo de incubación suficiente para hacer que el rotavirus sea incapaz de replicarse o infectar, produciendo, de este modo, una preparación de rotavirus inactivado con calor que es antigénico y conserva la estructura de partícula de rotavirus intacta de la preparación de partida,

35 y en la que la estructura de partícula de rotavirus intacta se selecciona del grupo que consiste en: partículas de rotavirus de triple capa, partículas de rotavirus de doble capa y una combinación de partículas de rotavirus de triple capa y partículas de rotavirus de doble capa.

En otro aspecto, la invención se refiere a una vacuna de acuerdo con el primer aspecto para su uso en un procedimiento de vacunación de un sujeto frente a rotavirus.

40 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir una composición de vacuna como se define en el primer aspecto, que comprende

exponer la preparación de partida de partículas de rotavirus a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C-80 °C, inclusive, durante un tiempo de incubación suficiente para hacer que el rotavirus sea incapaz de replicarse o infectar, produciendo, de este modo, una preparación de rotavirus inactivado con calor que es antigénico y conserva la estructura de partícula de rotavirus intacta de la preparación de partida,

45 en la que la preparación de partida de partículas de rotavirus presentan una estructura de partícula de rotavirus intacta seleccionada de: partículas de rotavirus de doble capa, partículas de rotavirus de triple capa y una mezcla de partículas de rotavirus de doble capa y partículas de rotavirus de triple capa.

Breve descripción de los dibujos

50 La figura 1A es una reproducción de una micrografía electrónica de un rotavirus vivo de simio purificado teñido con ácido fosfovolfámico y caracterizado por una estructura de triple capa;

- la figura 1B es una reproducción de una micrografía electrónica de partículas de rotavirus de simio inactivado térmicamente de acuerdo con un modo de realización de un procedimiento de la presente invención teñido con ácido fosfovolfámico y caracterizado por una estructura de triple capa;
- 5 la figura 2A es una reproducción de una imagen digitalizada de un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie que muestra marcadores de masa molecular (kilodaltons) en el carril 1, proteínas aisladas a partir de rotavirus vivo en el carril 2 y proteínas aisladas a partir de rotavirus inactivados térmicamente en el carril 3;
- la figura 2B es una reproducción de una imagen digitalizada de una inmunotransferencia que muestra proteínas inmunorreactivas de antirrotavirus de conejo aisladas a partir de rotavirus vivos en el carril 1 y proteínas inmunorreactivas de antirrotavirus de conejo aisladas a partir de rotavirus inactivados térmicamente en el carril 2;
- 10 la figura 3A es un gráfico que muestra la respuesta de anticuerpos séricos totales frente a rotavirus inactivados térmicamente;
- la figura 3B es un gráfico que muestra la respuesta de anticuerpos neutralizantes frente a rotavirus inactivado térmicamente;
- 15 la figura 4A es un gráfico que muestra la respuesta de anticuerpos séricos totales frente a una composición que incluye AIOH y rotavirus inactivado térmicamente;
- la figura 4B es un gráfico que muestra la respuesta de anticuerpos neutralizantes frente a una composición que incluye AIOH y rotavirus inactivado térmicamente;
- la figura 5A es una reproducción de una micrografía electrónica de un rotavirus vivo humano purificado;
- 20 la figura 5B es una reproducción de una micrografía electrónica de un rotavirus humano destruido con calor purificado que presenta sustancialmente la misma morfología que la preparación de partida, cuya muestra se muestra en la figura 5A;
- la figura 6A es una reproducción de una imagen digitalizada de un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie que muestra marcadores de masa molecular (kilodaltons) en el carril 1, proteínas aisladas a partir de rotavirus vivo en los carriles 2 y 4 y proteínas aisladas a partir de rotavirus inactivados térmicamente en los carriles 3 y 5;
- 25 la figura 6B es una reproducción de una imagen digitalizada de una inmunotransferencia que muestra marcadores de masa molecular (kilodaltons) en el carril 1, proteína inmunorreactiva de antirrotavirus de ratón VP5 aislada a partir de rotavirus vivos en el carril 2 y proteínas inmunorreactivas de antirrotavirus de ratón VP5 o sus agregados aisladas a partir de rotavirus inactivados térmicamente en el carril 3;
- 30 la figura 7 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo de inmunoenzimático (EIA) para VP5 en rotavirus vivo (TLPorg) y rotavirus destruido con calor (60C2h) que indica que ambas preparaciones contienen niveles similares de proteína VP5;
- la figura 8A es un gráfico que muestra la excreción del virus en muestras de heces de lechones vacunados sin antígeno y con 750 microgramos de $AlPO_4$ en 4 animales;
- 35 la figura 8B es un gráfico que muestra la excreción del virus en muestras de heces a partir de lechones inmunizados con rotavirus inactivado térmicamente y sin adyuvante;
- la figura 8C es un gráfico que muestra la excreción del virus en muestras de heces de lechones inmunizados con rotavirus inactivado térmicamente y adyuvante;
- la figura 8D es un gráfico que muestra la excreción del virus medida en muestras de heces de lechones inmunizados únicamente con tampón; y
- 40 la figura 9 es un gráfico que muestra un número reducido de días de excreción del rotavirus en sujetos vacunados con rotavirus inactivado con calor (HH) en comparación con controles placebo (GG).

Descripción detallada de los modos de realización preferentes

- De acuerdo con la presente invención, se proporcionan procedimientos de inactivar térmicamente rotavirus y composiciones de vacuna que incluyen rotavirus inactivado térmicamente.
- 45 Descrito a grandes rasgos, se seleccionan una combinación de la temperatura a la que se calientan las partículas de rotavirus y el tiempo de incubación del rotavirus a esa temperatura para hacer que de manera eficaz el rotavirus sea inactivo mientras se mantiene la antigenicidad del rotavirus y se conserva una estructura de partícula de rotavirus sustancialmente intacta de acuerdo con un procedimiento de la presente invención.

Los términos "rotavirus destruido", "rotavirus inactivo" y "rotavirus inactivado" se refieren a rotavirus que está tratado térmicamente y es incapaz de replicarse o infectar en condiciones en las que los rotavirus vivos pueden replicarse y/o infectar una célula.

5 Estructura de partícula de rotavirus se conoce bien en la técnica. El término "triple capa" se refiere a partículas de rotavirus que presentan tres capas de cápside concéntricas. El término "doble capa" se refiere a partículas de rotavirus que carecen de la capa de cápside más externa y conservan las capas de cápside media y más interna.

El término "antigénico" se refiere a un material que suscita una respuesta inmunitaria en un sujeto y, en particular, una respuesta inmunitaria protectora.

10 Un procedimiento de inactivación de un rotavirus incluye exponer el rotavirus a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C-80 °C, inclusive, durante un tiempo de incubación suficiente para hacer que el rotavirus sea inactivo mientras se mantiene la antigenicidad del rotavirus y se conserva una estructura de partícula de rotavirus sustancialmente intacta.

15 En modos de realización adicionales, un procedimiento de inactivación de un rotavirus incluye exponer el rotavirus a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 55 °C-70°C, inclusive, durante un tiempo de incubación suficiente para hacer que el rotavirus sea inactivo mientras se mantiene la antigenicidad del rotavirus y se conserva una estructura de partícula de rotavirus sustancialmente intacta.

20 En un modo de realización particular, un procedimiento de inactivación de un rotavirus incluye exponer el rotavirus a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 58 °C-67°C, inclusive, durante un tiempo de incubación suficiente para hacer que el rotavirus sea inactivo. El rotavirus inactivado es antigénico y conserva una estructura de partícula de rotavirus sustancialmente intacta.

El tiempo de incubación durante el que se expone el rotavirus a una temperatura seleccionada está en el intervalo de aproximadamente 10 minutos-24 horas, inclusive.

25 En modos de realización adicionales de procedimientos de acuerdo con la presente invención, el tiempo de incubación durante el que se expone el rotavirus a una temperatura seleccionada está en el intervalo de aproximadamente 30 minutos-10 horas, inclusive.

En todavía modos de realización adicionales de procedimientos de acuerdo con la presente invención, el tiempo de incubación durante el que se expone el rotavirus a una temperatura seleccionada está en el intervalo de aproximadamente 1-3 horas, inclusive.

30 Un procedimiento de inactivación de un rotavirus de acuerdo con la presente invención es aplicable a los rotavirus que incluyen de manera ilustrativa rotavirus humanos, rotavirus de simio, rotavirus bovinos, lapinos, porcinos, equinos, caninos, caprinos, aviares y murinos.

35 Los rotavirus inactivados mediante un procedimiento de la presente invención conservan las características de los rotavirus vivos. En particular, si los rotavirus de triple capa se inactivan mediante incubación a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado, las partículas de rotavirus inactivado conservan una estructura de partícula de rotavirus de triple capa sustancialmente intacta. Los rotavirus de doble capa se inactivan mediante incubación a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado, y las partículas de rotavirus inactivado conservan una estructura de partícula de rotavirus de doble capa sustancialmente intacta.

40 Una preparación de partida de partículas de rotavirus que se va a inactivar con calor incluye opcionalmente tanto partículas de rotavirus de doble capa como de triple capa. Tras la inactivación con calor, la preparación resultante de partículas de rotavirus inactivado con calor contiene una proporción sustancialmente similar de partículas de rotavirus de doble capa y triple capa como la preparación de partida.

45 Adicionalmente, los rotavirus inactivados mediante un procedimiento de la presente invención son sustancialmente similares a los rotavirus vivos con respecto a la cantidad de proteína vírica e integridad. En rotavirus inactivados térmicamente de acuerdo con modos de realización de procedimientos de la presente invención se conserva una cantidad de una o más proteínas víricas sustancialmente intactas presentes en el rotavirus vivo.

50 Por ejemplo, un rotavirus inactivado con calor de una preparación producido de acuerdo con los procedimientos de la presente invención está caracterizado por una cantidad de proteínas víricas sustancialmente intactas VP1, VP2, VP4, VP5, VP6 y VP7 que es sustancialmente similar a una cantidad de proteínas víricas sustancialmente intactas VP1, VP2, VP4, VP5, VP6 y VP7 presentes en la preparación de partida. De esta manera, si una preparación de partida de rotavirus que incluye rotavirus de triple capa, y que también pueden incluir rotavirus de doble capa, se inactiva mediante un procedimiento de la presente invención, la preparación resultante de partículas de rotavirus inactivado con calor conserva una cantidad de proteínas VP1, VP2, VP4, VP5, VP6 y VP7 sustancialmente intactas que es sustancialmente similar a una cantidad de proteínas víricas VP1, VP2, VP4, VP5, VP6 y VP7 sustancialmente intactas presentes en el rotavirus vivo.

La filtración de las partículas de rotavirus se realiza preferentemente antes del calentamiento de las partículas de rotavirus para inactivar las partículas. Sin querer vincularse a las consideraciones teóricas, se cree que la filtración reduce o elimina los agregados de partículas de rotavirus, lo que permite una inactivación térmica más eficaz.

5 Revolver las partículas durante la incubación, tal como mediante agitación, es ventajoso para distribuir uniformemente el calor en las partículas de rotavirus en modos de realización particulares de los procedimientos de la invención de inactivación de rotavirus.

En modos de realización particulares de la presente invención, las partículas de rotavirus se disponen en un primer recipiente durante una primera parte del tiempo de incubación y las partículas de rotavirus se transfieren a un segundo recipiente durante una segunda parte del tiempo de incubación.

10 Una preparación de partida de rotavirus para inactivación con calor de acuerdo con los procedimientos de la presente invención se prepara mediante procedimientos estándar. Por ejemplo, en general, un tipo de célula compatible se inocula con rotavirus y las células se mantienen en condiciones que permitan la replicación vírica y la producción de partículas infecciosas.

15 Un ejemplo particular de un tipo de células que permite la infección por rotavirus, la replicación y la producción de partículas es una línea de células de mamífero, tal como una línea de células Vero.

20 El término "partículas de rotavirus aisladas" se refiere a partículas de rotavirus que se han separado del entorno en el que se encuentran típicamente, tal como organismos, células, sobrenadante de células cultivadas y material de desecho, tal como material fecal o aguas residuales. Las partículas de rotavirus se cosechan, típicamente a partir del sobrenadante de cultivo celular, para la inactivación térmica. Las partículas de rotavirus se pueden aislar a partir del sobrenadante de cultivo celular, por ejemplo, mediante filtración y/o centrifugación.

En un ejemplo particular, los rotavirus aislados se resuspenden en un tampón diluyente y se exponen a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C-80°C, inclusive, durante un tiempo de incubación suficiente para hacer que el rotavirus sea inactivo.

25 Tras la inactivación, las partículas de rotavirus aisladas se liofilizan opcionalmente, tal como para una resuspensión más tarde en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 Las composiciones de vacuna se proporcionan de acuerdo con modos de realización de la presente invención que incluyen rotavirus antigénico inactivado térmicamente caracterizado por una estructura de partícula de rotavirus de triple capa sustancialmente intacta. En modos de realización adicionales, las composiciones de vacuna se proporcionan de acuerdo con modos de realización de la presente invención que incluyen tanto una estructura de partícula de rotavirus de triple capa sustancialmente intacta como una estructura de partícula de rotavirus de doble capa sustancialmente intacta.

35 El término "composición de vacuna" se usa en el presente documento para referirse a una composición que incluye un rotavirus inactivado térmicamente que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto inoculado con la composición de vacuna. En un modo de realización particular, una composición de vacuna que incluye un rotavirus inactivado térmicamente estimula la generación de anticuerpos neutralizantes frente al rotavirus inactivado térmicamente. Una composición de vacuna incluye preferentemente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo que es sustancialmente no tóxico para un sujeto y sustancialmente inerte al rotavirus inactivado térmicamente incluido en una composición de vacuna. Un vehículo farmacéuticamente aceptable está en forma de sólido, líquido o gel y es típicamente estéril y libre de pirógenos.

Una composición de vacuna de la presente invención puede estar en cualquier forma adecuada para su administración a un sujeto.

Una composición de vacuna se administra mediante cualquier vía de administración adecuada que incluye oral y parenteral, tal como las vías de administración intradérmica, intramuscular, mucosal, nasal o subcutánea.

45 En modos de realización preferentes, una composición de vacuna de la presente invención se administra mediante vía parenteral. Una composición de vacuna para su administración parenteral se puede formular como un líquido inyectable que incluye rotavirus inactivado térmicamente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles, tales como propilenglicol, polietilenglicol, glicerol, y similares, mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Se puede mantener una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento de un tamaño de partícula deseado en el caso de dispersiones y/o mediante el uso de un tensioactivo, tal como lauril sulfato de sodio. Se incluye opcionalmente un estabilizante, tal como, por ejemplo, sacarosa, EDTA, EGTA y un antioxidante.

50

Una forma de dosificación sólida para su administración o para su suspensión en un líquido antes de la administración incluye de manera ilustrativa cápsulas, comprimidos, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, se combina un rotavirus con al menos un vehículo que incluye de manera ilustrativa un tampón, tal como, por ejemplo, citrato de sodio o un fosfato de metal alcalino que incluye de manera ilustrativa fosfatos de sodio, fosfatos de potasio y fosfatos de calcio; una carga, tal como, por ejemplo, almidón, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico; un aglutinante, tal como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga; un humectante, tal como, por ejemplo, glicerol; un agente disgregante, tal como, por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio, almidones vegetales, tales como almidón de patata o de tapioca, ácido alginico, determinados silicatos complejos y carbonato de sodio; un retardante en solución, tal como, por ejemplo, parafina; un acelerador de la absorción, tal como, por ejemplo, un compuesto de amonio cuaternario; un agente de humectación, tal como, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerol y un glicol; un adsorbente, tal como, por ejemplo, caolín y bentonita; un lubricante, tal como, por ejemplo, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, un lauril sulfato de sodio o polietilenglicol sólido; un conservante, tal como un agente antibacteriano y un agente antifúngico, que incluye, por ejemplo, ácido sórbico, gentamicina y fenol; y un estabilizante tal como, por ejemplo, sacarosa, EDTA, EGTA y un antioxidante.

Las formas de dosificación sólidas incluyen opcionalmente un recubrimiento, tal como un recubrimiento entérico. El recubrimiento entérico es típicamente un material polimérico. Los materiales de recubrimiento entérico preferentes presentan las características de ser polímeros bioerosionables, gradualmente hidrolizables y/o gradualmente solubles en agua. La cantidad de material de recubrimiento aplicada a una dosificación sólida dicta, en general, el intervalo de tiempo entre la ingestión y la liberación de fármaco. Se aplica un recubrimiento que presenta un grosor tal que el recubrimiento completo no se disuelve en los fluidos gastrointestinales a pH por debajo de 3 asociados con los ácidos del estómago, pero se disuelve por encima de pH 3 en el entorno del intestino delgado. Se espera que cualquier polímero aniónico que presente un perfil de solubilidad dependiente del pH se use fácilmente como un recubrimiento entérico en la práctica de la presente invención para lograr la administración del principio activo en el tubo intestinal inferior. La selección del material de recubrimiento entérico específico depende de propiedades, tales como resistencia a la disgregación en el estómago; impermeabilidad a fluidos gástricos y difusión del principio activo mientras está en el estómago; capacidad para disiparse en el sitio objetivo del intestino; estabilidad física y química durante el almacenamiento; no toxicidad; y facilidad de aplicación.

Los materiales de recubrimiento entérico adecuados incluyen de manera ilustrativa polímeros celulósicos, tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, acetato de celulosa, ftalato acetato de celulosa, trimelitato acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, succinato de hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa de sodio; polímeros y copolímeros de ácido acrílico, preferentemente formados a partir de ácido acrílico, ácido metacrílico, acrilato de metilo, metilacrilato de amonio, acrilato de etilo, metacrilato de metilo y/o etilo; polímeros y copolímeros vinílicos, tales como polivinilpirrolidona, acetato de polivinilo, ftalato acetato de polivinilo, copolímero de ácido crotónico acetato de vinilo y copolímeros de etileno acetato de vinilo; goma laca; y combinaciones de los mismos. Un material de recubrimiento entérico particular incluye polímeros y copolímeros de ácido acrílico descritos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.136.345.

El recubrimiento entérico contiene opcionalmente un plastificante para prevenir la formación de poros y grietas que permiten la penetración de los jugos gástricos en la forma de dosificación sólida. Los plastificantes adecuados incluyen de manera ilustrativa citrato de trietilo (Citroflex 2), triacetina (triacetato de glicerilo), citrato de acetiltriethyl (Citroflex A2), Carbowax 400 (polietilenglicol 400), ftalato de dietilo, citrato de tributilo, monoglicéridos acetilados, glicerol, ésteres de ácidos grasos, propilenglicol y ftalato de dibutilo. En particular, un recubrimiento compuesto de un polímero aniónico acrílico carboxílico típicamente contiene aproximadamente de un 10 % a un 25 % en peso de un plastificante, en particular, ftalato de dibutilo, polietilenglicol, citrato de trietilo y triacetina. El recubrimiento también puede contener otros excipientes de recubrimiento, tales como antiadhesivos, agentes antiespumantes, lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio) y estabilizantes (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, ácidos o bases) para solubilizar o dispersar el material de recubrimiento, y para mejorar el rendimiento de recubrimiento y el producto recubierto.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen rotavirus inactivado térmicamente y un vehículo farmacéuticamente aceptable formulados como una emulsión, solución, suspensión, jarabe o elixir. Una forma de dosificación líquida de una composición de vacuna de la presente invención puede incluir un agente de humectación, un agente emulsionante, un agente de suspensión, un edulcorante, un saborizante o un agente perfumante.

La información detallada relativa a los ingredientes habituales, equipo y procedimientos para preparar formas de dosificación se encuentra en *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, eds. H. A. Lieberman *et al.*, Nueva York: Marcel Dekker, Inc., 1989; y en L.V. Allen, Jr. *et al.*, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Dmg Delivery Systems*, 8.º ed., Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004; A. R. Gennaro, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins, 20.º ed., 2003; y J. G. Hardman *et al.*, *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill Professional, 10.º ed., 2001.

Un adyuvante se incluye opcionalmente en una composición de vacuna de acuerdo con modos de realización de la presente invención. El término "adyuvante" como se usa en el presente documento se refiere a un material que potencia una respuesta inmunitaria frente a un antígeno en un sujeto sin reacción adversa sustancial. Los adyuvantes son conocidos en la técnica e incluyen de manera ilustrativa adyuvante de Freund, hidróxido de aluminio, fosfato de

aluminio, óxido de aluminio, óxido de hierro, saponina, dextranos, tales como de dextrano DEAE, aceites vegetales, tales como aceite de cacahuate, aceite de oliva y/o acetato de vitamina E, aceite mineral, proteoglicanos, peptidoglicanos y lipopolisacáridos bacterianos.

5 Se proporciona una vacuna para su uso en un procedimiento para vacunar a un sujeto frente a rotavirus de acuerdo con modos de realización de la presente invención. El uso incluye una cantidad terapéutica de una composición de vacuna que incluye rotavirus antigénico inactivado térmicamente caracterizado por una estructura de partícula de rotavirus de triple capa y/o de doble capa sustancialmente intacta.

10 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa en el presente documento para referirse a una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunológica y confiere inmunidad protectora para prevenir o mejorar los signos o síntomas de una enfermedad mediada por rotavirus. La inducción de una respuesta inmunológica protectora en un sujeto se puede determinar mediante cualquiera de diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen de manera ilustrativa la detección de anticuerpos antirrotavirus, la medida del valor de anticuerpos antirrotavirus y/o ensayo de proliferación de linfocitos. Se pueden observar los signos y síntomas de la enfermedad mediada por rotavirus para detectar la inducción de una respuesta inmunológica con respecto a la administración de una composición de vacuna de la presente invención en un sujeto. Por ejemplo, la inducción de una respuesta inmunológica se detecta mediante la reducción de los signos y síntomas clínicos de la enfermedad mediada por rotavirus, tales como la reducción de la cantidad de virus excretados en las heces, la reducción del número de días en los que el virus se excreta en las heces, la reducción en el número de días que el sujeto presenta diarrea, la reducción de la mortalidad, la reducción de la morbilidad, la reducción de la pérdida de peso o ganancia de peso.

20 El uso incluye la administración de una o más dosis de una composición de vacuna a un sujeto en un momento en modos de realización particulares. De manera alternativa, se administran dos o más dosis de una composición de vacuna en intervalos de tiempo. Una pauta adecuada para la administración de las dosis de composición de vacuna depende de varios factores, que incluyen la edad y el estado de salud del sujeto, el tipo de composición de vacuna usada y la vía de administración, por ejemplo. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente una dosis y pauta de administración que se va a administrar a un sujeto en particular.

25 El uso incluye administrar al menos dos dosis de la composición de vacuna al sujeto.

30 Aunque el término "sujeto" se usa principalmente en el presente documento para referirse a un ser humano, se entiende que se vacunan animales no humanos, que incluyen de manera ilustrativa vacas, caballos, ovejas, cabras, cerdos, perros, gatos, aves, aves de corral y roedores de acuerdo con modos de realización particulares de la presente invención. De esta manera, la vacunación de un sujeto frente a rotavirus incluye la administración a un sujeto mamífero o aviar. En modos de realización particulares, el sujeto es un ser humano.

Los modos de realización de los procedimientos y composiciones de la invención se ilustran en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan con propósitos ilustrativos y no se consideran limitaciones del alcance de los procedimientos y composiciones de la invención.

35 Ejemplos

Ejemplo 1

40 Se cultivan células Vero en medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con suero fetal bovino al 5 % (ambos de Invitrogen Corporation, Grand Island, NY) y 50 microgramos/ml de neomicina (Sigma, St. Louis, MO). Se infectan monocapas confluentes de células Vero en frascos rotatorios con rotavirus de simio YK-1 a una multiplicidad de infección de 0,1. YK-1 es una cepa de rotavirus recientemente aislada con especificidad P[3],G3, como se describe en *Virology*, 3:40, 2006. Los cultivos infectados se cosechan a los 4 días después de la infección.

Ejemplo 2

45 Las partículas de rotavirus de triple capa se purifican a partir de sobrenadantes mediante centrifugación a través de colchones de sacarosa al 40 % en tampón TNC (Tris 10 mM [pH 8,0], NaCl 140 mM, CaCl₂ 10 mM) durante 2 h a 106.750 g usando un rotor SW32Ti y, a continuación, a través de centrifugaciones isopícnicas en gradientes de CsCl durante 17 h a 111.160 g usando un rotor SW40Ti. Se resuspenden las partículas de virus purificadas en tampón diluyente, solución salina equilibrada de Hank (HBSS) con CaCl₂ 1,3 mM, MgCl₂ 0,5 mM y MgSO₄ 0,4 mM, complementada con sorbitol al 10 %, para la inactivación con calor.

Ejemplo 3

50 Se resuspenden las partículas de virus purificadas en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) con CaCl₂ y MgCl₂ (Invitrogen) complementada con sorbitol al 10 % (Sigma) y se almacenan a -70 °C antes de ser inactivadas e inyectadas en un sujeto.

Se diluyen las partículas de rotavirus de triple capa purificadas hasta una concentración de 300 microgramos/ml con tampón diluyente y se esterilizan mediante filtración usando una unidad de filtro accionado con jeringa Millex®-HV

PVDF (0,45 micrómetros; Millipore Corporation, Bedford, MA). Para inactivar el rotavirus mediante calor, se incuban las partículas de virus en criotubos de 3,6 ml (NalgeNunc, Rochester, NY) durante 1 h a 60 °C en un baño de agua con agua recirculante (modelo NesLab Ex 10; Thermo Electron Corporation, Newington, NH) y, a continuación, se transfieren a otro tubo recién preparado y se incuban durante 1 h a 60 °C. Se somete inmediatamente a prueba una pequeña alícuota para determinar cualquier infectividad residual y el remanente se almacena a -70 °C antes de su uso en la inmunización de un sujeto.

Ejemplo 4

Se examina la eficacia de la inactivación inoculando la suspensión de rotavirus tratado térmicamente sobre monocapas de células Vero en tubos rotatorios e incubando en un aparato de rotación a 37 °C durante 7 días. A continuación, los cultivos de células infectadas se someten a una segunda tanda de amplificación en células Vero de la misma manera durante otros 7 días. Se considera inactivado el rotavirus YK-1 si los cultivos de células inoculadas dan negativo en la prueba frente a rotavirus usando un kit comercial de EIA (Rotaclone®; Meridian, Cincinnati, OH). En los controles, el YK-1 no tratado con calor se inocula sobre células Vero de la misma manera y los cultivos infectados dan positivo en la prueba frente a rotavirus.

Ejemplo 5

La integridad de las partículas de rotavirus antes y después de la inactivación térmica se determina mediante microscopía electrónica.

El rotavirus YK-1 se purifica a partir de cultivos de células Vero infectadas y únicamente se usan partículas de triple capa para el estudio de la inactivación. Las partículas de YK-1 de triple capa inactivado y vivo se tiñen con ácido fosfotungstácico y se examinan con un microscopio electrónico. Después del tratamiento térmico a 60 °C durante 2 h, se descubre que las partículas de YK-1 mantienen la integridad biofísica, como se demuestra mediante la preservación de estructuras de triple capa que son morfológicamente similares a los viriones naturales. En la figura 1A, se muestra una reproducción de una micrografía electrónica del rotavirus YK-1 vivo purificado teñido con ácido fosfotungstácico. En la figura 1B, se muestra una reproducción de una micrografía electrónica del rotavirus YK-1 inactivado con calor purificado teñido con ácido fosfotungstácico. La escala gráfica mostrada en ambas figuras 1A y 1B indica una longitud de 100 nm.

Ejemplo 6

La pureza y composición de proteínas de partículas de rotavirus inactivados mediante un procedimiento de inactivación térmica de la presente invención se determinan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y, a continuación, tinción con azul de Coomassie o análisis de transferencia Western usando inmunosuero específico de conejo específico para rotavirus. El rotavirus YK-1 se purifica a partir de cultivos de células Vero infectadas y únicamente se usan partículas de triple capa para el estudio de la inactivación. Después del tratamiento térmico a 60 °C durante 2 h, se analizan las partículas de YK-1 inactivado con calor mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y tinción con azul de Coomassie o análisis de transferencia Western usando inmunosuero específico de conejo específico para rotavirus. La inactivación de rotavirus en muestras tratadas con calor se confirma por la ausencia de crecimiento del virus tras dos pasos secuenciales en células Vero. En los controles, se observa el consistente crecimiento del virus en células infectadas con el rotavirus YK-1 vivo no tratado con calor original. Para este análisis, la concentración de proteínas de partículas purificadas se mide mediante el procedimiento de Bradford que usa IgG bovina como patrones (Bio-Rad, Hercules, CA). Se analizan las partículas de rotavirus de triple capa inactivado térmicamente y vivo en gel de poliacrilamida al 12 % seguido de tinción con azul de Coomassie. Este análisis muestra que las partículas de virus inactivado térmicamente contenían todas las proteínas víricas estructurales principales, VP1, VP2, VP4, VP6 y VP7, y son antigénicas, como se demuestra mediante su detección en el análisis de transferencia Western usando inmunosuero específico de conejo con respecto a rotavirus RRV, como se muestra en las figuras 2A y 2B. La figura 2A muestra una reproducción de una imagen digitalizada de un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie en la que el carril 1 contiene marcadores de masa molecular (kilodaltons) y los carriles 2 y 3 contienen, respectivamente, YK-1 vivo y destruido. La figura 2B muestra una reproducción de una imagen digitalizada de una inmunotransferencia que muestra la antigenicidad de proteínas rotavíricas principales usando inmunosuero específico de conejo específico para rotavirus. El carril 1 contiene proteínas a partir de YK-1 vivo y el carril 2 contiene proteínas a partir de YK-1 destruido. Las proteínas víricas estructurales principales se indican mediante etiquetas a la derecha de las figuras 2A y 2B.

Ejemplo 7

Se preextrae sangre de ratones hembra BALB/C consanguíneos (Covance Research Products, Denver, PA) y dan negativo en la prueba frente a anticuerpo específico para rotavirus total (IgA, IgG e IgM) mediante EIA. Se inmunizan I.M. dos veces los ratones en grupos de 7 con 20 microgramos o 2 microgramos de YK-1 destruido en tampón diluyente y se refuerzan 21 días más tarde. Para los controles, se inmunizan los ratones en el grupo de 6 con el tampón de la misma manera. Para la inmunización, a los ratones se les inyecta 100 microlitros de la vacuna o tampón en una pata trasera, se les extrae sangre en los días 0, 21 y 35, y se desangran en el día 49.

Se determinan en ratones las respuestas de anticuerpos neutralizantes y anticuerpos séricos totales frente a rotavirus inactivado térmicamente. Se vacuna a los ratones por vía intramuscular (I.M.) dos veces con YK-1 destruido con calor y se determinan los anticuerpos neutralizantes y específicos para rotavirus totales (IgA, IgG e IgM) mediante EIA. Para el anticuerpo total, se somete a prueba cada muestra de suero a una dilución inicial de 1:100. Las muestras de suero sanguíneo preextraídas no presentaban ningún anticuerpo detectable a esta dilución, se usa un valor de 20 para determinar la ilustración y los valores de media geométrica. El anticuerpo neutralizante se somete a prueba a una dilución inicial de 1:20.

Se miden los anticuerpos específicos para rotavirus (IgM, IgG e IgA) en los sueros mediante un inmunoanálisis con modificaciones, como se describe en detalle en Jiang B, *et al.*, Vaccine 1999; 17:1005-13. En concreto, se recubren placas de 96 pocillos (NalgeNunc, Rochester, NY) con inmunosuero específico de conejo diluido con respecto a rotavirus RRV, se incuban con sobrenadantes de células MA104 infectadas con RRV, y seguido de adición de sueros de ratón diluidos en serie. Las placas se incuban con anticuerpos de cabra anti-IgA, IgG e IgM de ratón conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Kirkegaard and Perry, Gaithersburg, MD) y, a continuación, con el sustrato tetrametilbencidina (Aldrich, Milwaukee, WI). La reacción se detiene con HCl 1 N y se mide una densidad óptica (DO) a 450 nm con un lector de EIA (MRX Revelation, Dynex Technologies, Chantilly, VA). El valor de anticuerpos en un suero se define como el recíproco de la dilución más alta con un valor de DO neto (OD con RRV menos OD con blotto al 5 %) mayor de 0,1.

El anticuerpo neutralizante de rotavirus se mide mediante un análisis de microneutralización, como se describe en detalle en Jiang B, *et al.*, Vaccine 1999; 17:1005-13. Los sueros de ratón se diluyen en serie dos veces en pocillos duplicados y se incuban con rotavirus RRV activado con tripsina. El medio MEM libre de suero tratado de manera similar o rotavirus activado se incuban en ausencia de sueros y sirve como controles positivo y negativo, respectivamente. Se añaden a cada pocillo células MA104 en medio MEM complementado con una concentración final de 10 microgramos/ml de tripsina y suero de polluelo al 0,5 % (Invitrogen). Después de la incubación a 37 °C durante 18 h, las placas se fijan con formalina. Los antígenos de rotavirus en células MA104 se detectan incubando placas con inmunosuero específico de conejo anti-RRV, anti-IgG de conejo marcada con HRP, y, a continuación, tetrametilbencidina. El valor de anticuerpos neutralizantes en un suero se define como el recíproco de la dilución más alta que da un 70 % de reducción en el valor de absorbancia en comparación con el del virus de control.

Los resultados mostrados en las figuras 3A y 3B indican que el rotavirus inactivado térmicamente es altamente inmunogénico como se demuestra mediante la inoculación de ratones con rotavirus inactivado térmicamente.

La figura 3A es un gráfico que muestra la respuesta de anticuerpos séricos totales con respecto a una composición que incluye rotavirus inactivado térmicamente de acuerdo con un modo de realización de un procedimiento de la presente invención. El valor de anticuerpos en la Fig. 3A se expresa como la media geométrica para cada grupo (n=7 o 6). La barra de error representa 1 error estándar. La figura 3A ilustra que se observa una respuesta de anticuerpos totales específicos para rotavirus en el suero de ratones que recibieron una inmunización de una dosis con 20 microgramos o 2 microgramos de rotavirus YK-1 inactivado térmicamente. Los ratones que recibieron dos inmunizaciones con 20 microgramos de rotavirus inactivado térmicamente presentaron altos valores de anticuerpos totales. Se observan valores de anticuerpos comparables aunque más bajos (2 a 8 veces) en ratones que se inoculan dos veces con 2 microgramos de rotavirus inactivado térmicamente. Estos altos niveles de anticuerpo se mantienen 2 semanas más tarde en las muestras de suero finales cuando se sacrifican los ratones. No se detecta ningún valor de anticuerpos (<100) en los ratones de control que recibieron el tampón diluyente.

El suero adquirido a partir de ratones individuales se somete a prueba para determinar el anticuerpo neutralizante específico para rotavirus usando un análisis de microneutralización y valores detectados de anticuerpo neutralizante con un patrón similar al de la respuesta de anticuerpos totales como se muestra en la Fig. 3B. El valor de anticuerpos en la Fig. 3B se expresa como la media geométrica para cada grupo (n=7 o 6). La barra de error representa 1 error estándar. Todos excepto 2 presueros presentaban un valor de neutralización < 20 y los dos restantes presentaban un valor de neutralización de 40. Los ratones en grupos de 7 vacunados una vez con 20 microgramos de rotavirus inactivado térmicamente o 2 microgramos de rotavirus inactivado térmicamente presentaron un pequeño aumento (2 a 8 veces) en el valor de anticuerpos neutralizantes, que se incrementó drásticamente hasta 1280 tras una segunda vacunación. Los valores de anticuerpos neutralizantes permanecieron altos 2 semanas más tarde cuando se sacrifican los ratones. Los ratones inmunizados con tampón diluyente no presentaron ningún aumento en los valores de neutralización. La IgA específica para rotavirus se analiza de la misma manera que el anticuerpo total y no se detecta ningún aumento en el valor en los sueros de ratones vacunados.

Ejemplo 8

En ensayos particulares, se añade un adyuvante de AIOH a composiciones para potenciar la inmunogenia de la vacuna de rotavirus inactivado con calor. En estos ensayos, se dividen 30 ratones BALB/C en 5 grupos de 6; los ratones en 4 grupos se inmunizan I.M. una vez con 2 microgramos o 0,2 microgramos de antígeno sin o con 600 microgramos de AIOH. Los ratones de control en el grupo 5 se inmunizan con 600 microgramos de AIOH de la misma manera. Se extrae sangre a los ratones en los días 0 y 21, y se desangran en el día 35. Todos los sueros se almacenan a -70 °C antes de ser sometidos a prueba.

Los anticuerpos neutralizantes se determinan mediante EIA. Para el anticuerpo total, se somete a prueba cada muestra de suero a una dilución inicial de 1:100. Las muestras de suero sanguíneo preextraídas no presentaban ningún anticuerpo detectable a esta dilución, se usa un valor de 20 para determinar la ilustración y los valores de media geométrica. El anticuerpo neutralizante se somete a prueba a una dilución inicial de 1:20. Los resultados se muestran en las figuras 4A y 4B.

La figura 4A es un gráfico que muestra la respuesta de anticuerpos séricos totales con respecto a una composición que incluye AIOH y rotavirus inactivado térmicamente de acuerdo con un modo de realización de un procedimiento de la presente invención. La adición de un adyuvante, AIOH, al rotavirus YK-1 inactivado térmicamente potencia la respuesta inmunitaria con respecto al rotavirus YK-1 inactivado térmicamente y proporciona valores altos de anticuerpo con una dosis muy baja de antígeno, como se muestra en las figuras 4A y 4B. Los valores de anticuerpos se expresan como las medias geométricas para cada grupo (n=6) en las figuras 4A y 4B. Las barras de error representan 1 error estándar.

Se inmunizan por vía intramuscular dos veces los ratones en grupos de 6 con 2 microgramos o 0,2 microgramos de YK-1 destruido sin adyuvante o con 600 microgramos de AIOH. La figura 4A muestra que los valores de anticuerpos específicos para rotavirus se detectan en ratones que recibieron 2 microgramos o 0,2 microgramos de antígenos y que la adición de AIOH a la vacuna potencia los valores de anticuerpos totales. Estos altos valores de anticuerpos se incrementaron adicionalmente 2 semanas más tarde cuando se sacrifican los ratones. Los ratones de control que recibieron 600 microgramos de AIOH no presentaban valores de anticuerpos específicos para rotavirus (<100).

La figura 4B es un gráfico que muestra la respuesta de anticuerpos neutralizantes con respecto a una composición que incluye AIOH y rotavirus inactivado térmicamente de acuerdo con un modo de realización de un procedimiento de la presente invención.

Ejemplo 9

Se resuspende una cepa de partículas de rotavirus A humano purificado que presenta un genotipo P[8], G1 en tampón diluyente, solución salina equilibrada de Hank (HBSS) con CaCl_2 1,3 mM, MgCl_2 0,5 mM, y MgSO_4 0,4 mM, complementada con sorbitol al 10 %, y se almacena a -70 °C antes de inactivarse con calor y se inyecta en un sujeto.

Se diluye una muestra de partículas de rotavirus humano purificado hasta una concentración de 300 microgramos/ml con tampón diluyente, solución salina equilibrada de Hank (HBSS) con CaCl_2 1,3 mM, MgCl_2 0,5 mM, y MgSO_4 0,4 mM, complementada con sorbitol al 10 %, y se esteriliza mediante filtración usando una unidad de filtro accionado con jeringa Millex®-HV PVDF (0,45 micrómetros; Millipore Corporation, Bedford, MA).

Para inactivar el rotavirus humano mediante calor, se colocan las partículas de virus en tampón diluyente en criotubos de 3,6 ml (NalgeNunc, Rochester, NY) durante 1 h a 60 °C en un baño de agua con agua recirculante (modelo NesLab Ex 10; Thermo Electron Corporation, Newington, NH) y, a continuación, se transfieren a otro tubo recién preparado y se incuban durante 1 h a 60 °C. Una pequeña alícuota se somete inmediatamente a prueba para determinar cualquier infectividad residual y el remanente se almacena a -70 °C antes de su uso en la inmunización de un sujeto.

Se verifica la eficacia de la inactivación inoculando la suspensión de rotavirus humano tratado térmicamente sobre monocapas de células Vero en tubos rotatorios e incubando en un aparato de rotación a 37 °C durante 7 días. A continuación, los cultivos de células infectadas se someten a una segunda tanda de amplificación en células Vero de la misma manera durante otros 7 días. Se considera inactivado el rotavirus humano si los cultivos de células inoculadas dan negativo en la prueba frente a rotavirus humano usando un kit comercial de EIA (Rotaclone®; Meridian, Cincinnati, OH). En los controles, el rotavirus humano no tratado con calor se inocula sobre células Vero de la misma manera y los cultivos infectados dan positivo en la prueba frente a rotavirus humano.

La integridad de las partículas de rotavirus antes y después de la inactivación térmica se determina mediante microscopía electrónica. Las partículas de rotavirus A humano inactivado y vivo se tiñen con ácido fosfotungstácico y se examinan con un microscopio electrónico. Después del tratamiento térmico a 60 °C durante 2 h, se descubre que las partículas de rotavirus humano mantienen la integridad biofísica, como se demuestra mediante la preservación de estructuras de tripe capa que son morfológicamente similares a los viriones naturales. Las figuras 5A y 5B son reproducciones de micrografías electrónicas que muestran rotavirus A de CDC-9 humano destruido con calor (inactivado) y vivo purificado.

Tras la inactivación con calor, las partículas de rotavirus humano se examinan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción, así como mediante inmunoanálisis para determinar el contenido de proteínas e integridad de las partículas.

La figura 6A es una reproducción de una imagen digitalizada de un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie que muestra marcadores de masa molecular (kilodaltons) en el carril 1, proteínas a partir de rotavirus humano vivo en los carriles 2 y 4 y proteínas de rotavirus humano inactivado térmicamente en los carriles 3 y 5. Las muestras en los carriles 2 y 3 se incubaron a 37 °C durante 10 min antes del análisis, mientras que las muestras en los carriles 4 y 5 se trataron a 97 °C durante 5 min antes del análisis.

La figura 6B es una reproducción de una imagen digitalizada de una inmunotransferencia que muestra proteína inmunorreactiva de antirrotavirus de ratón VP5 aislada a partir de rotavirus humano vivo en el carril 2 y proteínas inmunorreactivas de antirrotavirus de ratón VP5 o sus agregados aisladas a partir de rotavirus humano inactivado térmicamente en el carril 3. Las muestras en los carriles 2 y 3 se incubaron a 37 °C durante 10 min antes del análisis. No se detectaron proteínas inmunorreactivas de rotavirus humano VP5 o agregados de VP5 en muestras en los carriles 4 y 5 que se trataron a 97 °C durante 5 min antes del análisis. Los resultados muestran que la inactivación con calor no destruye las VP5 (un producto escindido de VP4), pero puede dar como resultado agregados o reordenamientos de VP5.

La figura 7 es un gráfico que muestra el análisis de rotavirus humano CDC-9 mediante EIA usando un anticuerpo monoclonal específico para VPS. Se detectaron niveles similares de VP5 en preparaciones de CDC-9 inactivado con calor y vivo.

Ejemplo 10

Lechones gnotobióticos-I

Se usa un modelo de lechón gnotobiótico de enfermedad por rotavirus en ejemplos particulares. Este modelo de lechón permite someter a prueba en condiciones definidas que evitan los problemas de exposición al entorno de animales y usar la enfermedad como el criterio de valoración. Este modelo también permite someter a prueba una vacuna de rotavirus inactivado con calor que presenta un serotipo G1 frente una exposición a Wa homotípica.

Trece lechones gnotobióticos se seleccionan y asignan de manera aleatoria a 4 grupos como se indica en la tabla 1.

TABLA 1

| Nombre de grupo | Número de lechones en el grupo | Antígeno CDC-9 (microgramos) | AIPO ₄ (microgramos) |
|-----------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| AA | 4 | 0 | 750 |
| BB | 4 | 75 | 0 |
| CC | 3 | 75 | 750 |
| DD | 2 | 0 (tampón) | 0 (tampón) |

Cada grupo de animales indicado en la tabla 1 se mantiene en aisladores separados. Los animales en los grupos BB y CC se vacunan por vía intramuscular 3 veces con una vacuna de rotavirus inactivado con calor sin o con un adyuvante, respectivamente. La formulación de vacuna en este ejemplo incluye 75 microgramos de CDC-9 purificado destruido con calor, una cepa de rotavirus A humano que presenta un serotipo P[8], G1, en diluyente mezclado con 750 microgramos de AIPO₄. Los animales en los grupos AA y DD se vacunan con 750 microgramos de AIPO₄ y tampón, respectivamente, de la misma manera. La adsorción de antígeno se determina mediante el procedimiento de Bradford, que mostró que aproximadamente un 50 % del antígeno se unió a AIPO₄. Tanto el antígeno unido como no unido se inyectó en estas inmunizaciones.

Como se muestra en la tabla 1, los lechones se inmunizaron con una formulación de vacuna que no incluía ningún antígeno y 750 microgramos de AIPO₄; 75 microgramos de antígeno y sin AIPO₄; 75 microgramos de antígeno y 750 microgramos de AIPO₄; o sin antígeno y sin AIPO₄, es decir, solo tampón. Cada vacunación se llevó a cabo mediante la inyección de 0,5 mililitros de la formulación de vacuna en los músculos de las patas traseras de los lechones. Después de 3 dosis de la formulación de vacuna administrada en intervalos de 10-12 días, los lechones se expusieron por vía oral a rotavirus Wa virulento. Antes de la exposición al virus, cada lechón se inocula con 3 mililitros de bicarbonato de sodio para neutralizar los ácidos en el estómago. Las muestras de heces se recogen diariamente a partir de los lechones expuestos durante 10 días. Se recogen las muestras de sangre a lo largo de todo el experimento en intervalos de 7-14 días. La figura 8A muestra la excreción del virus en muestras de heces de lechones vacunados sin antígeno y con 750 microgramos de AIPO₄ en 4 animales. La figura 8B muestra la excreción del virus en muestras de heces a partir de lechones inmunizados con antígeno y sin adyuvante. La figura 8C muestra la excreción del virus en muestras de heces de lechones inmunizados con antígeno y adyuvante. La figura 8D muestra la excreción del virus medida en muestras de heces de lechones inmunizados únicamente con tampón. Estas figuras muestran que los lechones que se vacunaron de manera simulada con AIPO₄ únicamente o tampón diluyente únicamente excretaron todos rotavirus hasta 5 días y a un valor alto. Por el contrario, los lechones que se vacunaron con rotavirus inactivado con calor sin AIPO₄ estaban parcialmente protegidos, como se demuestra mediante una excreción acortada de 1 día o una excreción retrasada y reducida. De los 3 lechones que se vacunaron con rotavirus inactivado con calor y AIPO₄, 2 estaban completamente protegidos y 1 únicamente presentaba una corta excrección reducida de 1 día. De esta

manera, estos resultados muestran la eficacia de una formulación de vacuna inactivada con calor de acuerdo con modos de realización de la presente invención.

Ejemplo 11

Lechones gnotobióticos-II

- 5 Once lechones gnotobióticos se seleccionan y asignan de manera aleatoria a 2 grupos como se indica en la tabla 2.

TABLA 2

| Nombre de grupo | Número de lechones en el grupo | Antígeno CDC-9 (microgramos) | AlPO ₄ (microgramos) |
|-----------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| GG | 5 | 0 | 600 |
| HH | 6 | 50 | 600 |

10 Como se muestra en la tabla 2, los lechones se inmunizaron con una formulación de vacuna que no incluía ningún antígeno y 600 microgramos de AlPO₄ o 50 microgramos de antígeno y 600 microgramos de AlPO₄. Cada la
 15 vacunación se llevó a cabo mediante la inyección de 0,5 mililitros de la formulación de vacuna en los músculos de las patas traseras de los lechones. Después de 3 dosis de la formulación de vacuna administrada en intervalos de 10-12 días, los lechones se expusieron por vía oral a rotavirus Wa virulento. Antes de la exposición al virus, cada lechón se inocula con 3 mililitros de bicarbonato de sodio para neutralizar los ácidos en el estómago. Las muestras de heces se recogen diariamente a partir de los lechones expuestos durante 10 días. Se recogen las muestras de sangre a lo largo de todo el experimento en intervalos de 7-14 días.

La tabla 3 muestra datos que indican valores de anticuerpos neutralizantes en lechones que se vacunaron I.M. con rotavirus humano inactivado con calor o placebo y se expusieron por vía oral a rotavirus Wa humano. Abreviaturas usadas: ID, código de identificación; PID, día posinoculación; PCD, día posexposición; ND, no determinado.

TABLA 3

| Grupo GG | ID de cerdo | PID 0 | PID 10 | PID 21 | PID 28 | PID42/PCD14 |
|----------|-------------|---------|--------|--------|--------|-------------|
| Grupo GG | 13-7-07 | | ND | ND | 2 | 16,5 |
| | 13-8-07 | | ND | ND | 2 | 23,5 |
| | 13-9-07 | | ND | ND | 2 | 22,5 |
| | 13-10-07 | | ND | ND | 2 | 175 |
| | 13-11-07 | | ND | ND | 2 | 19 |
| | MGT | | ND | ND | 2 | 31 |
| | Grupo HH | 13-1-07 | | 2 | 13 | 570 |
| 13-2-07 | | | 2 | 4,8 | 500 | 3050 |
| 13-3-07 | | | 2 | 2 | 170 | 1450 |
| 13-4-07 | | | 2 | 4 | 270. | 4100 |
| 13-5-07 | | | 2 | 5,2 | 390 | 1350 |
| 13-6-07 | | | 2 | 5 | 405 | 3575 |
| MGT | | | 2 | 5 | 357 | 2313 |

5 La tabla 4 muestra el perfil de excreción de antígeno en lechones que se vacunaron I.M. con rotavirus inactivado con calor (IRV) o placebo y se expusieron por vía oral a rotavirus Wa humano. La tabla 4 muestra la detección de antígeno de rotavirus humano en muestras de heces recogidas a partir de lechones 0 a 10 días después de la exposición a Wa. La detección de antígeno de rotavirus humano se midió mediante un kit comercial de EIA (Rotaclone). Se muestran los valores de DO. Abreviaturas usadas: PID. Los datos muestran que la administración de rotavirus humano inactivado con calor reduce la magnitud y duración de la excreción de rotavirus.

TABLA 4

| | | PID | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------|-------------|-----|---|---|---|-----|----|----|---|---|---|---|----|
| Grupo | ID de cerdo | | | | | | | | | | | | |
| HH | 13-1 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 13-2 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 13-3 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 13-4 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 13-5 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 13-6 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GG | 13-7 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 32 | 8 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 13-8 | | 0 | 0 | 1 | 0,1 | 4 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 13-9 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 13-10 | | 0 | 0 | 8 | 0,1 | 8 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 13-11 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 16 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |

10 La figura 9 es un gráfico que muestra que los lechones vacunados con rotavirus inactivado térmicamente presentan una duración reducida de excreción de rotavirus en muestras de heces recogidas a partir de los lechones después de la exposición a rotavirus Wa. La detección de antígeno de rotavirus humano se midió mediante un kit comercial de EIA (Rotaclone). Los datos muestran que la vacunación con rotavirus inactivado térmicamente es protectora frente a la infección.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna que comprende rotavirus antigénico inactivado térmicamente caracterizado por una estructura de partícula de rotavirus intacta en la que el rotavirus en la composición es obtenible mediante el procedimiento que comprende:

exponer la preparación de partida de partículas de rotavirus a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C-80 °C, inclusive, durante un tiempo de incubación suficiente para hacer que el rotavirus sea incapaz de replicarse o infectar, produciendo, de este modo, una preparación de rotavirus inactivado con calor que es antigénico y conserva la estructura de partícula de rotavirus intacta de la preparación de partida,

y en la que la estructura de partícula de rotavirus intacta se selecciona del grupo que consiste en: partículas de rotavirus de triple capa, partículas de rotavirus de doble capa y una combinación de partículas de rotavirus de triple capa y partículas de rotavirus de doble capa.
2. La composición de vacuna de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un adyuvante.
3. La composición de vacuna de la reivindicación 2, en la que el adyuvante es un adyuvante que contiene aluminio seleccionado del grupo que consiste en: AlOH, una sal de aluminio; una combinación de los mismos.
4. La composición de vacuna de la reivindicación 1 formulada para su administración parenteral a un sujeto.
5. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en un procedimiento de vacunación de un sujeto frente a rotavirus.
6. La composición de vacuna de la reivindicación 5 para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el sujeto es un ser humano.
7. La composición de vacuna de la reivindicación 5 para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición de vacuna se administra al sujeto mediante una vía parenteral.
8. La composición de vacuna de la reivindicación 5 para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición de vacuna comprende adicionalmente un adyuvante.
9. La composición de vacuna de la reivindicación 5 para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que administrar la composición de vacuna comprende administrar al menos dos dosis de la composición de vacuna.
10. Un procedimiento de producción de la composición de vacuna de la reivindicación 1, que comprende:

exponer la preparación de partida de partículas de rotavirus a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C-80 °C, inclusive, durante un tiempo de incubación suficiente para hacer que el rotavirus sea incapaz de replicarse o infectar, produciendo, de este modo, una preparación de rotavirus inactivado con calor que es antigénico y conserva la estructura de partícula de rotavirus intacta de la preparación de partida,

en la que la preparación de partida de partículas de rotavirus presenta una estructura de partícula de rotavirus intacta seleccionada de: partículas de rotavirus de doble capa, partículas de rotavirus de triple capa y una mezcla de partículas de rotavirus de doble capa y partículas de rotavirus de triple capa.
11. El procedimiento de inactivación de un rotavirus de la reivindicación 10, en el que el tiempo de incubación está en el intervalo de aproximadamente 10 minutos-24 horas, inclusive.
12. El procedimiento de inactivación de un rotavirus de la reivindicación 10, que comprende adicionalmente filtrar las partículas de rotavirus aisladas antes de exponer la preparación de partida de partículas de rotavirus a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C-80 °C, inclusive.
13. El procedimiento de inactivación de un rotavirus de la reivindicación 12, en el que exponer la preparación de partida de partículas de rotavirus a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C -80 °C, inclusive, comprende un primer periodo de incubación y un segundo periodo de incubación, en el que el primer periodo de incubación y el segundo periodo de incubación combinados están en el intervalo de aproximadamente 10 minutos-24 horas, inclusive.
14. El procedimiento de inactivación de un rotavirus de la reivindicación 10, en el que el rotavirus es un rotavirus animal o humano.
15. El procedimiento de inactivación de un rotavirus de la reivindicación 10, en el que la preparación de rotavirus inactivado con calor se selecciona del grupo que consiste en (i) una preparación de rotavirus inactivado con calor caracterizada por una cantidad de proteínas víricas intactas VP1, VP2, VP4, VP5, VP6 y VP7 que es similar a una cantidad de proteínas víricas intactas VP1, VP2, VP4, VP5, VP6 y VP7 presentes en la preparación de partida y (ii) una preparación de rotavirus inactivado con calor caracterizada por una cantidad de proteínas víricas intactas

VP1, VP2 y VP6 que es similar a una cantidad de proteínas víricas intactas VP1, VP2 y VP6 presentes en la preparación de partida.

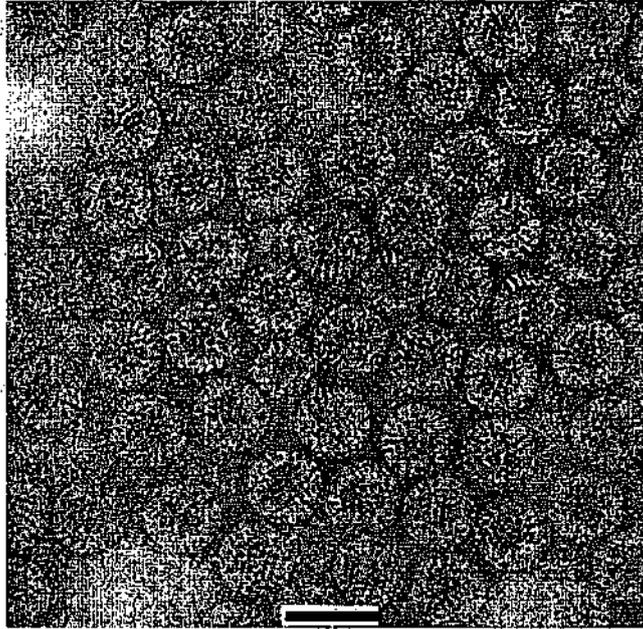


Figura 1A

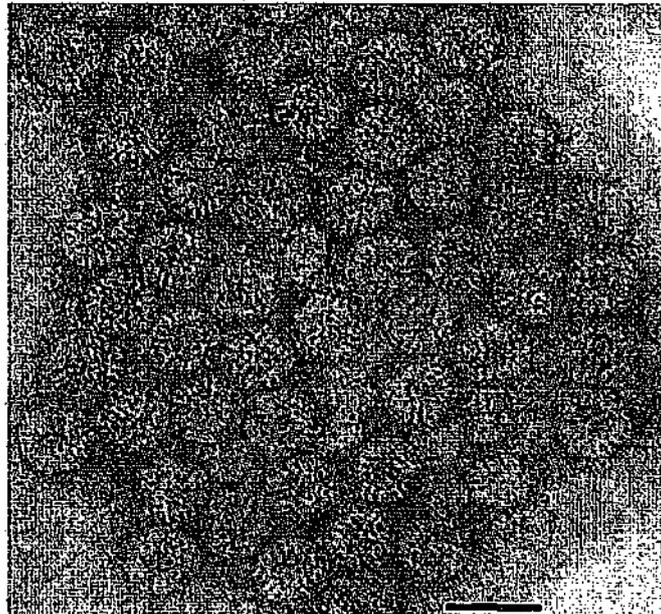


Figura 1B

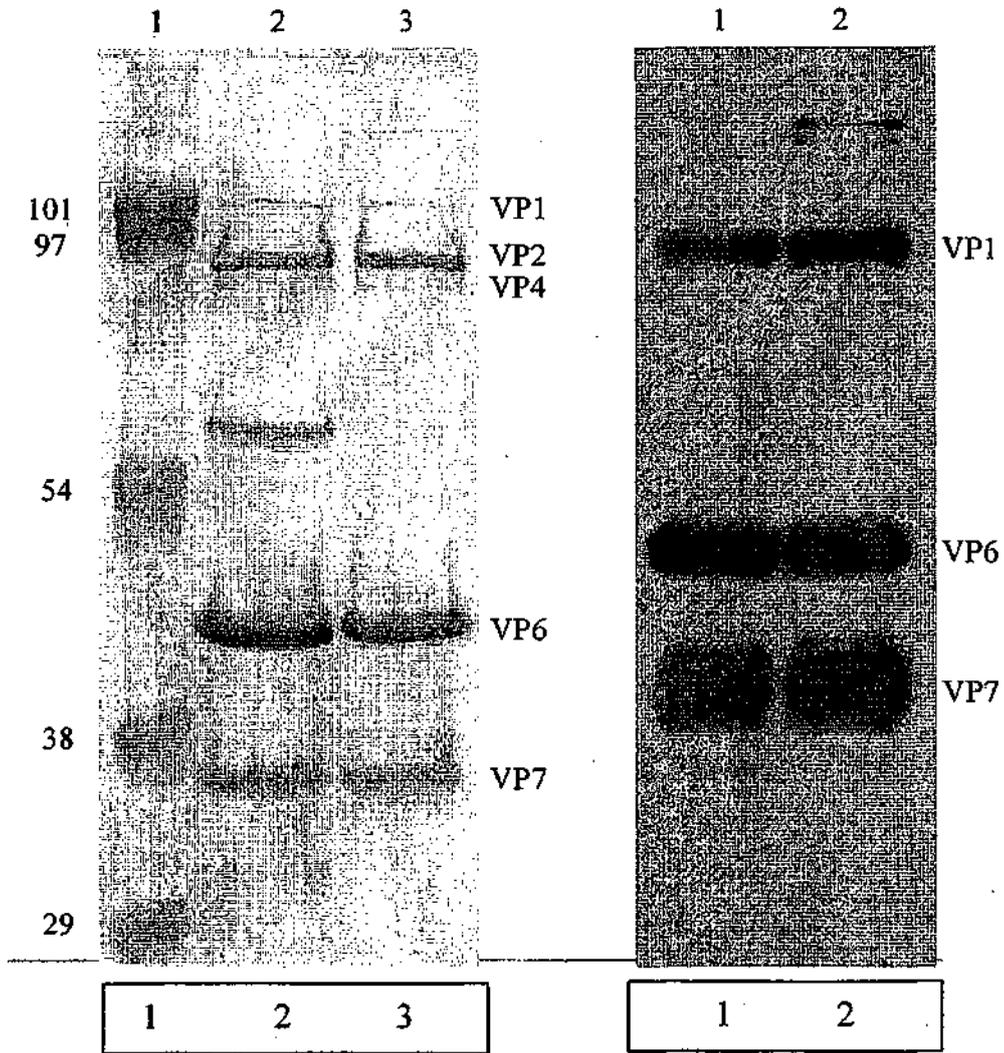


Figura 2A

Figura 2B

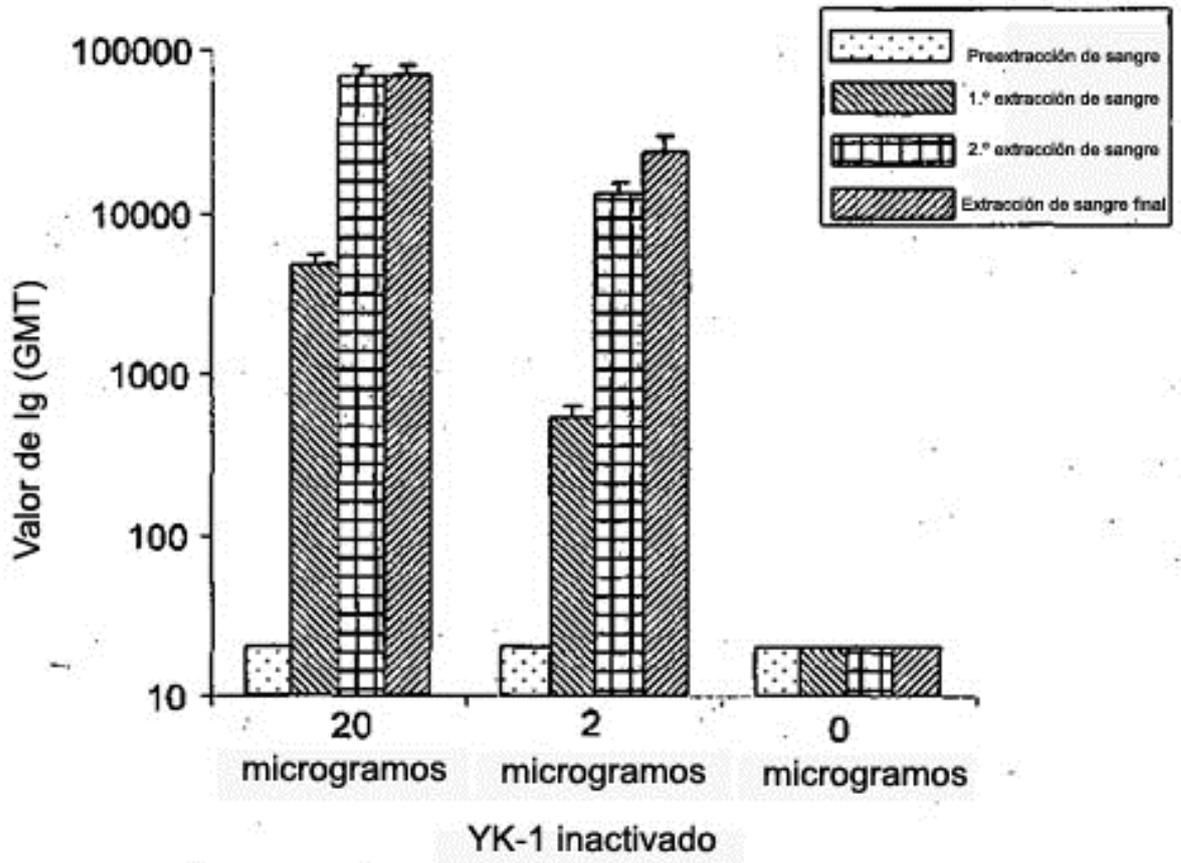


Figura 3A

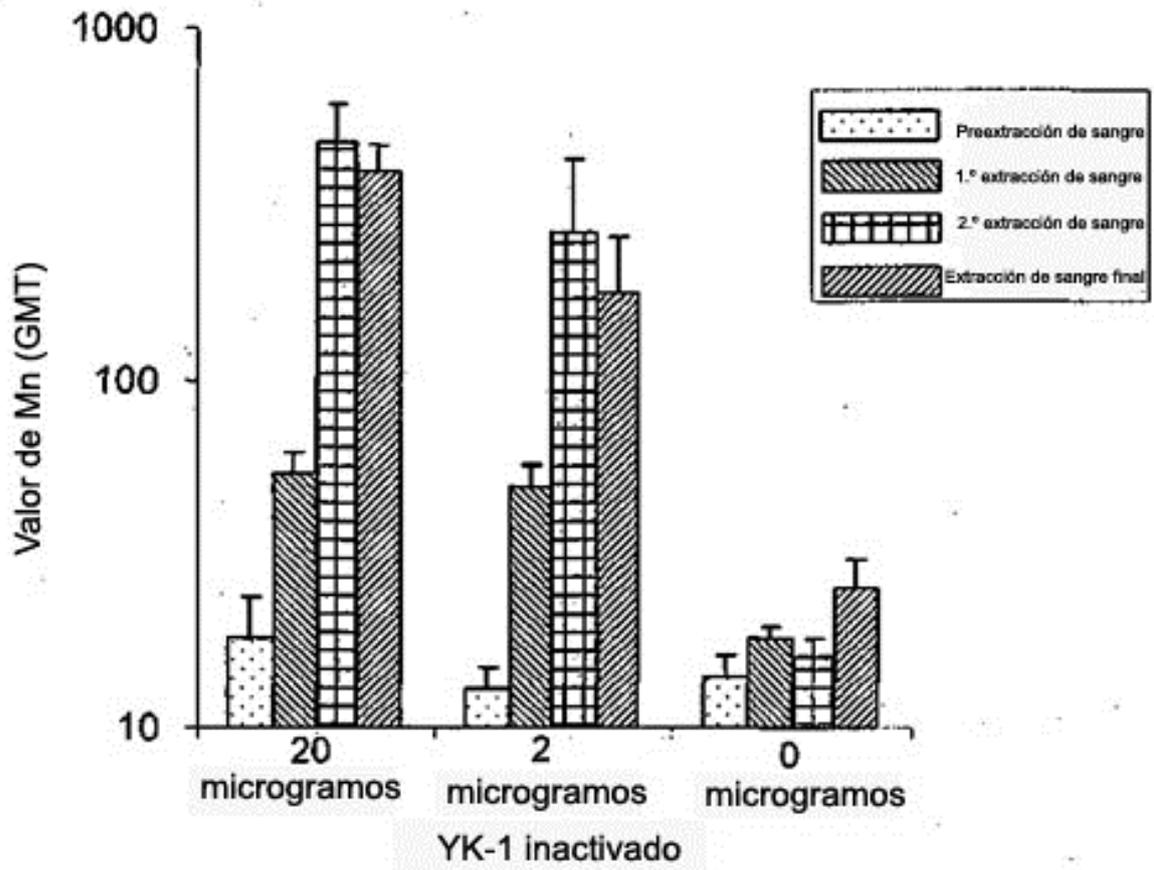


Figura 3B

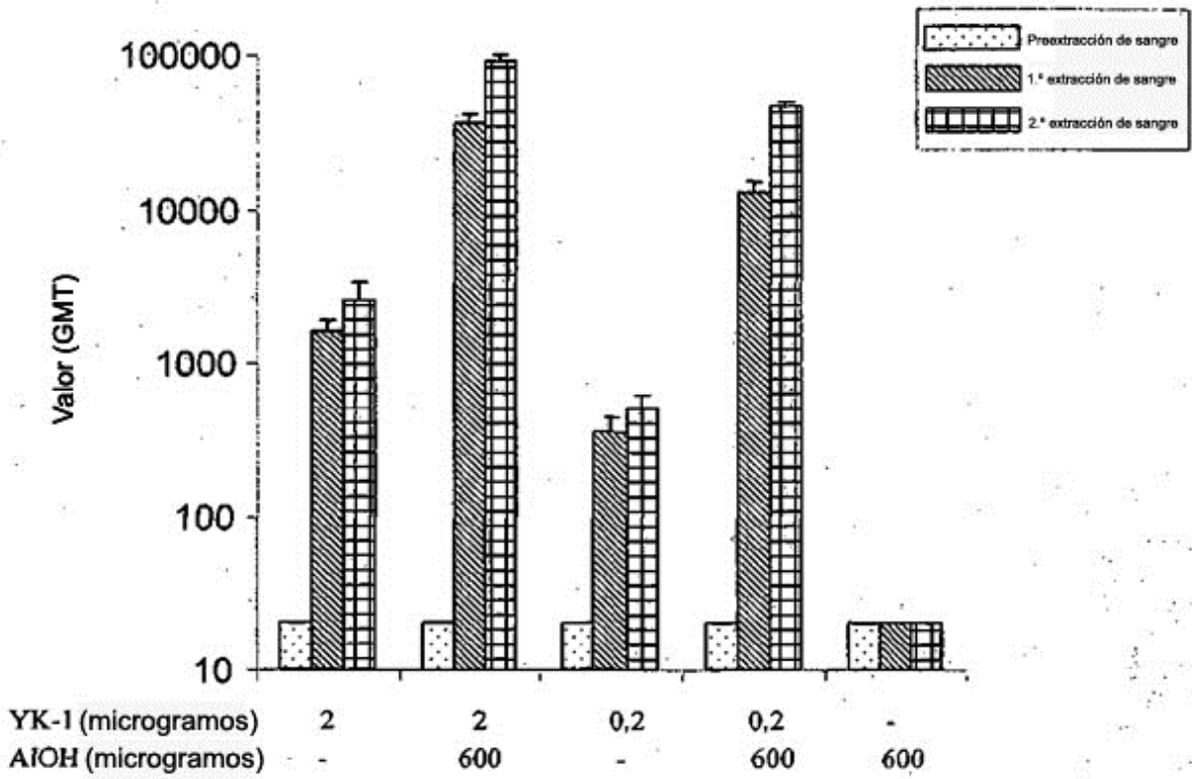


Figura 4A

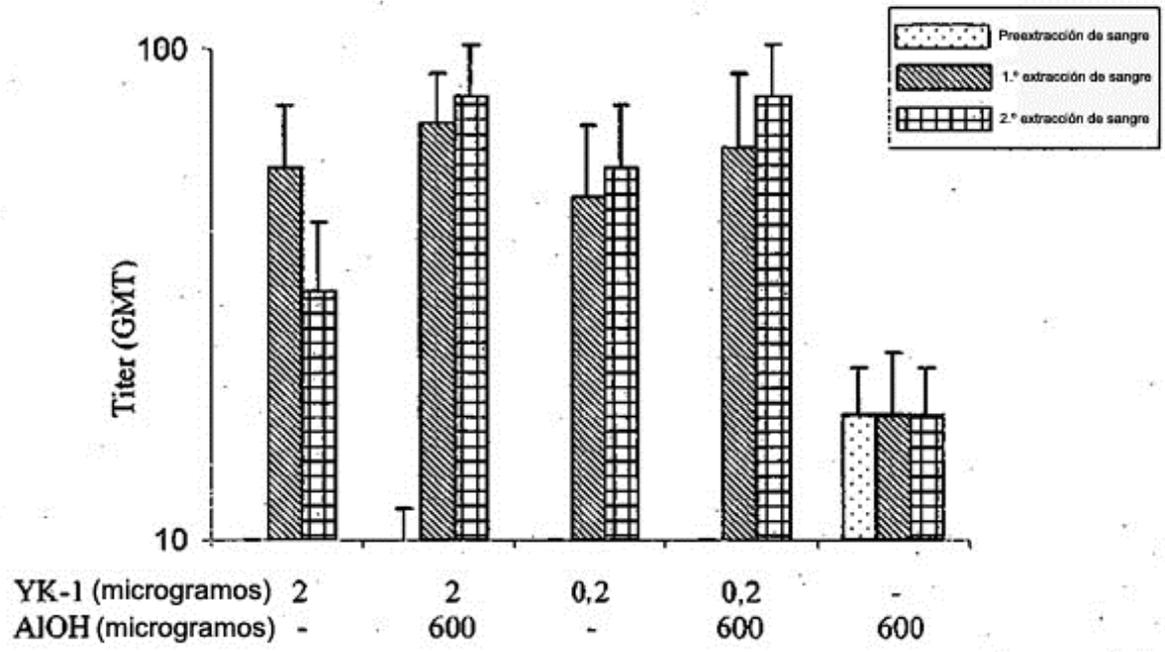
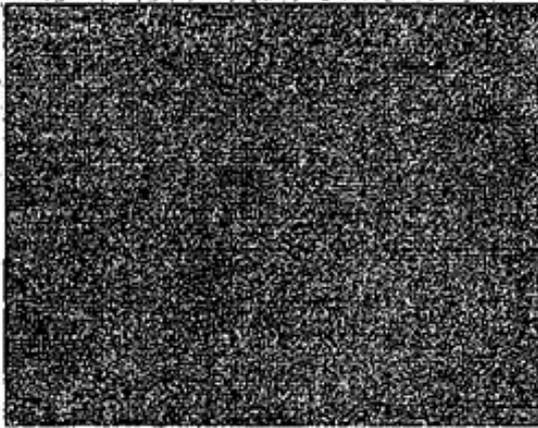


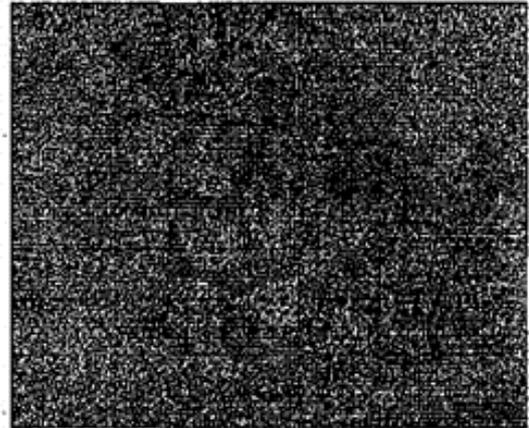
Figura 4B

Inactivación de vacuna de rotavirus humano cepa CDC-9



Vivo

Figura 5A



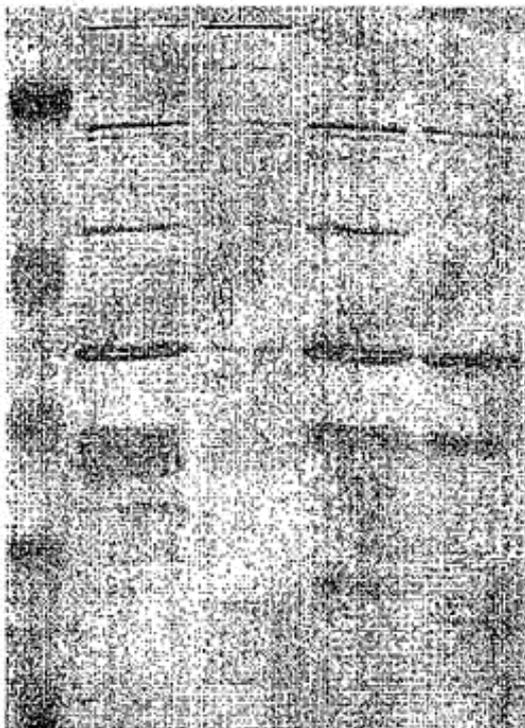
Destruido

Figura 5B

Análisis de IRV CDC-9 mediante SDS-PAGE y transferencia Western

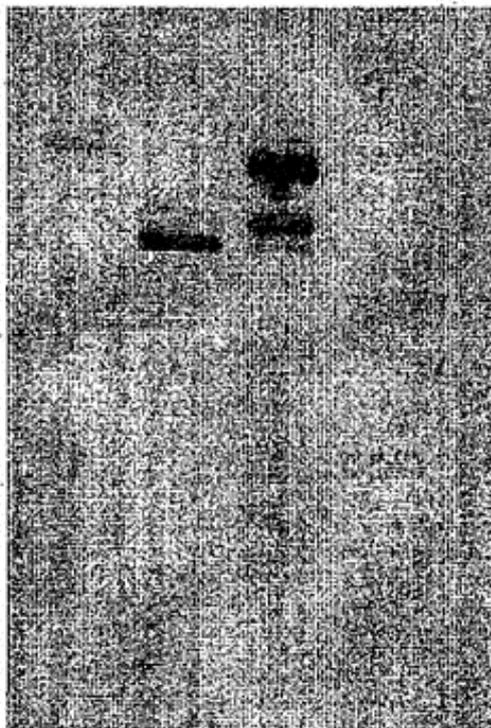
37°C 10 min 97°C 5 min

37°C 10 min 97°C 5 min



1 vivo destruido vivo destruido
2 3 4 5

Figura 6A



1 vivo destruido vivo destruido
2 3 4 5

Figura 6B

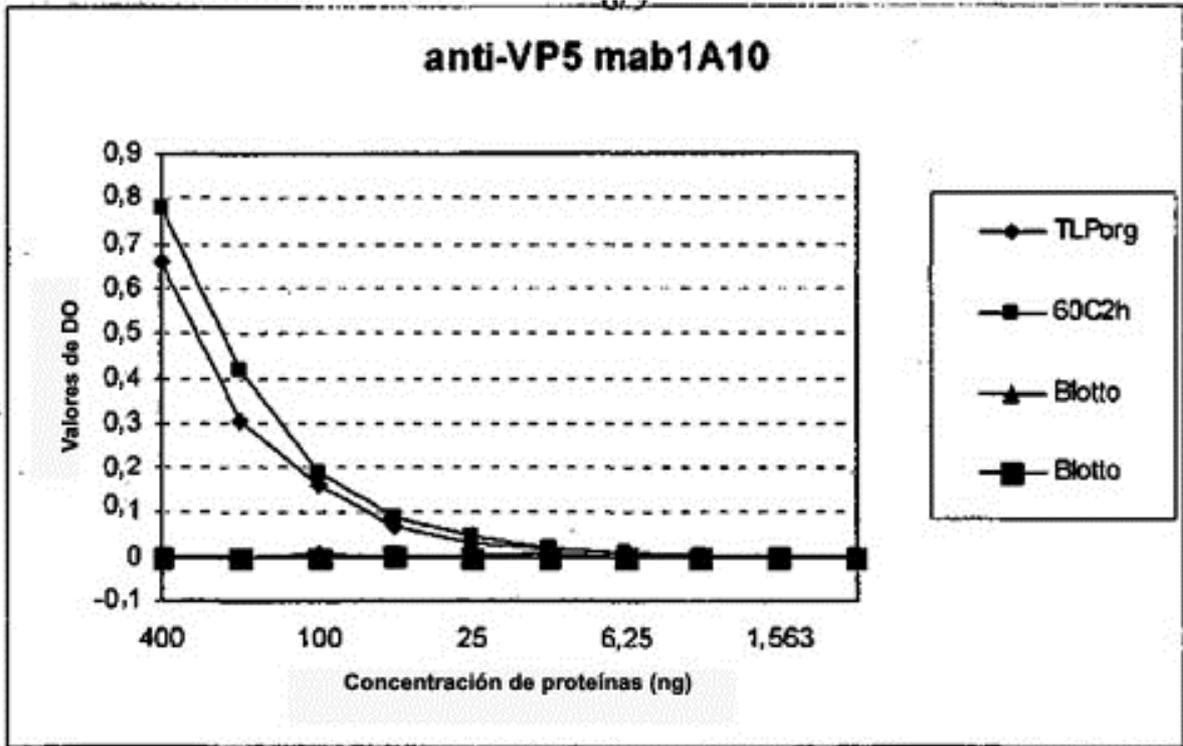


Figura 7

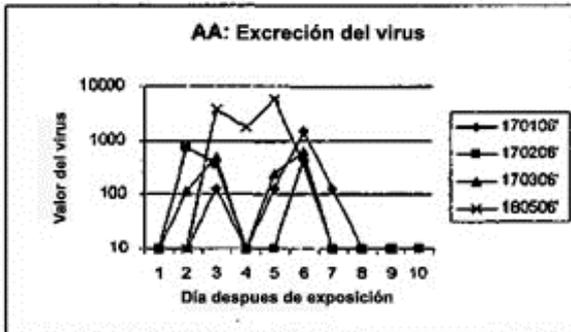


Figura 8A

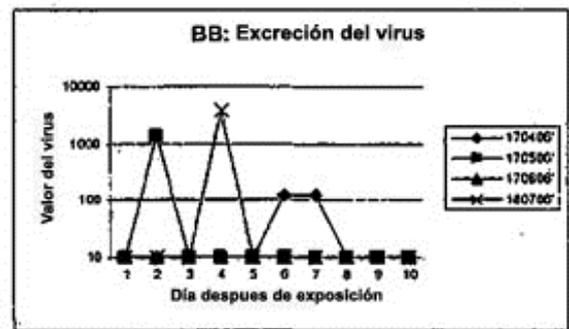


Figura 8B

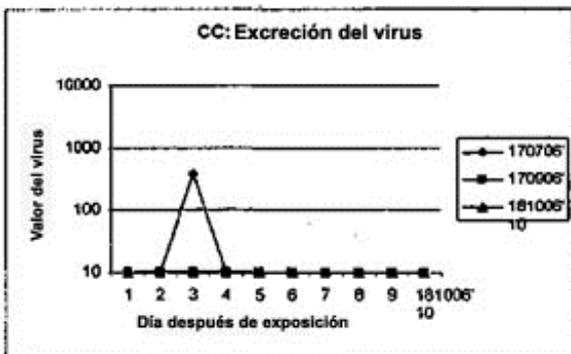


Figura 8C

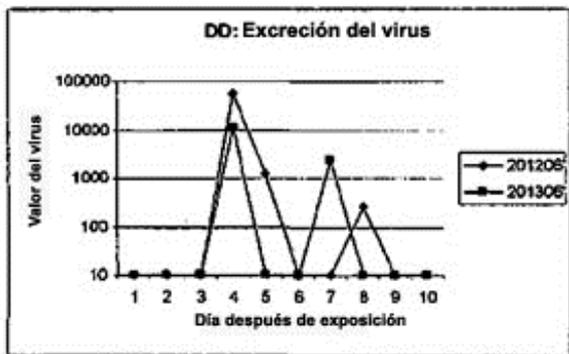


Figura 8D

IRV es protector frente a infección en lechones

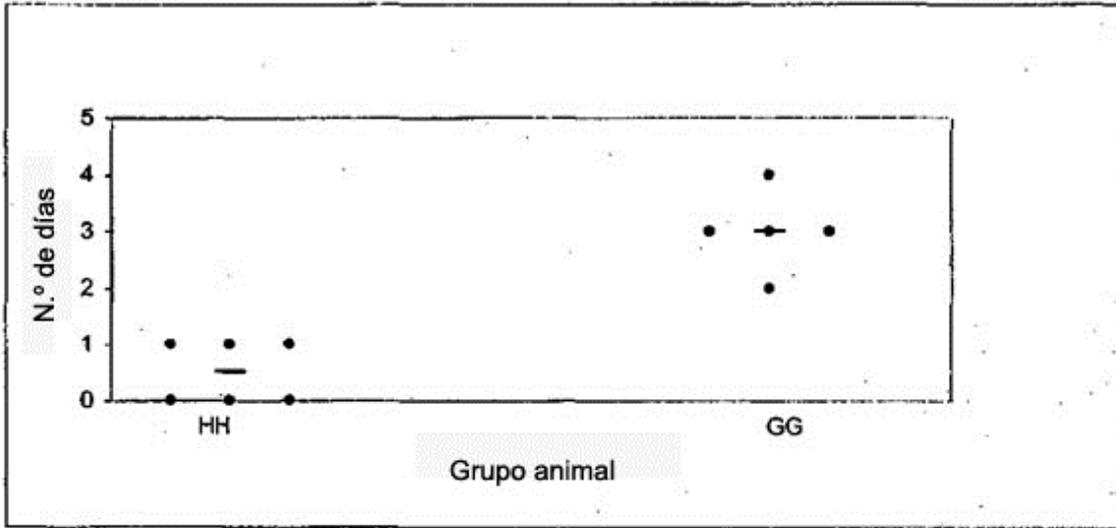


Figura 9