

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 913**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

**A61P 31/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2009 PCT/JP2009/059671**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2009 WO09147980**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2009 E 09758247 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2298344**

54 Título: **Uso de una partícula vírica de encefalitis japonesa como adyuvante**

30 Prioridad:

**04.06.2008 JP 2008147328**

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

**07.11.2016**

73 Titular/es:

**THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH  
INSTITUTE (100.0%)  
1-6-1 Okubo, Kita-ku  
Kumamoto-shi, Kumamoto 860-8568, JP**

72 Inventor/es:

**MORIYAMA, MAKOTO;  
KAMINAKA, KAZUYOSHI;  
MATSUDA, JUNICHI y  
NOZAKI, CHIKATERU**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 588 913 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

Uso de una partícula vírica de encefalitis japonesa como adyuvante

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a un método para utilizar partículas del virus inactivado de la de encefalitis japonesa (al que también se hace referencia de aquí en adelante como "VEJ") como un adyuvante para varias vacunas mixtas o vacunas polivalentes.

10

**Técnica antecedente**

La vacunación contra las enfermedades infecciosas debería terminarse preferentemente durante la infancia. Con este fin, se tienen que inocular muchas clases de vacunas en un periodo de tiempo fijo. Como plan para la vacunación eficaz contra las distintas enfermedades infecciosas, se han desarrollado vacunas mixtas en las que se mezclan juntas varias vacunas. Una vacuna mixta tiene muchas ventajas que incluyen: (i) puede proporcionar protección contra una pluralidad de agentes patógenos simultáneamente, (ii) se pueden eliminar los problemas del calendario de vacunación por una pluralidad de vacunaciones, (iii) puede reducir los costes de vacunación (tasa técnica) y la pérdida de tiempo de los individuos que reciben las vacunaciones por el aumento en la frecuencia de vacunación que se espera, (iv) puede reducir la carga del equipo médico, y (v) puede reducir la carga medioambiental por la disminución de materiales de desecho por la reducción de la frecuencia de vacunación. Por lo tanto, en cuanto a una vacuna mixta, cuanto más antígenos vacunales estén contenidos en ella, mejor.

15

20

25

Sin embargo, el número de antígenos vacunales que se van a mezclar juntos para preparar una vacuna mixta es limitado. A saber, cuanto mayor es el número de antígenos vacunales que se mezclan, menor es la cantidad de cada uno de los antígenos vacunales que se pueden administrar. Además, algunos tipos de antígenos pueden interferir entre ellos dando lugar de esta manera a la reducción de su capacidad de inducción de anticuerpos, lo que da como resultado una reducción del título de anticuerpos de una vacuna y hace que sea difícil una protección eficaz contra la infección.

30

Las vacunas mixtas por separado que se han publicado hasta el día de hoy incluyen una preparación vacunal mixta de difteria/tos ferina/tétanos (DPT) "COMPOSICIÓN VACUNAL" (cf. por ejemplo, en la Referencia de patente 1), una vacuna mixta que contiene el antígeno del virus del papiloma (VPH) "Nueva composición" (cf. por ejemplo, en la Referencia de patente 2), una vacuna polivalente DPT polio "VACUNAS MULTIVALENTES DPT-POLIO" (cf. por ejemplo, en la Referencia de patente 3), un método para inducir una actividad inmunitaria celular de una vacuna viva y en una vacuna inactivada y en una vacuna mixta obtenida por dicho método (cf., por ejemplo en la Patente de referencia 4), y similares. Además de estas, ya se han publicado vacunas mixtas con numerosas combinaciones. En cuanto a vacunas del virus de la encefalitis japonesa, se ha informado de vacunas mixtas con la vacuna DPT, la vacuna de la hepatitis B (HepB), vacuna de la hepatitis A (HepA), y similares (cf. por ejemplo, en la Referencia No patente 1). Es deseable el desarrollo de una vacuna mixta con más combinaciones pero existe el problema de la reducción del efecto de la vacuna como se ha descrito anteriormente. Con el fin de resolver este problema, se desea el desarrollo de dicho adyuvante que permita un título de anticuerpos más alto con la menor cantidad de antígeno que sea posible.

40

45

En general, se sabe que cuando se añade un adyuvante a un antígeno vacunal aumenta la inmunogenicidad del antígeno vacunal e incluye una partícula de gel de aluminio (una sal de aluminio), un adyuvante oleoso que comprende un aceite mineral como componente principal, un adyuvante tipo tensioactivo tal como saponina purificada de la semilla del jacinto blanco, y un adyuvante que induce TH-1 derivado de toxinas intracelulares (LPS, etc.). En cuanto al adyuvante para su uso en una vacuna para un animal, se puede utilizar a menudo un adyuvante oleoso que sea localmente más reactivo que el adyuvante de aluminio. En cuanto a un adyuvante que se va a utilizar en una vacuna para seres humanos, sin embargo, se necesita seguridad además de eficacia.

50

En cuanto a un adyuvante que se utiliza en una vacuna para seres humanos, hasta ahora se ha utilizado principalmente un gel de aluminio y se ha demostrado su eficacia, pero recientemente se han desarrollado nuevos MPL y ARN de doble cadena que se han escogido para su uso. Las composiciones de adyuvante que ya se conocen incluyen "vacunas" que consisten en un agente inmunoestimulante (MPL) y una sal metálica (cf. por ejemplo, Referencia de Patente 5), una emulsión de aceite en agua "Composición Adyuvante" (cf. por ejemplo, Referencia de Patente 6) que comprende un aceite tal como el 3D-MPL, escualeno, alfa-tocoferol, monooleato de sorbitan polioxi-etileno, y similares, un compuesto adyuvante sintético "Compuesto adyuvante inmunológico" (cf. por ejemplo, la Referencia de Patente 7), "Preparación vacunal" (cf., por ejemplo, en la Referencia de Patente 8) que utiliza la toxina del cólera, "Uso de una partícula tipo virus como adyuvante" (cf. por ejemplo, en la Referencia de Patente 9) que utiliza partículas tipo virus (VLP) que se forman a partir de un polipéptido que forma una partícula de un antígeno de superficie del virus de la hepatitis, y muchos otros.

60

65

En cuanto a la vacuna del virus de encefalitis japonesa, se utiliza actualmente una vacuna inactivada que se prepara por inoculación del virus de la encefalitis japonesa (VEJ) en el cerebro de ratones, se purifica el virus del cerebro con

síntomas de encefalitis y se inactiva el virus con formalina. Se han desarrollado vacunas de VEJ inactivadas que utilizan células epiteliales de mono verde africano (Vero) en lugar de cerebros de ratones (cf. por ejemplo, Referencias de Patente 10, 11 y 12). Sin embargo no se sabía que estas partículas del VEJ tenían una actividad adyuvante.

5 Anteriormente, se había descrito una vacuna mixta que comprendía como componente esencial un antígeno del virus de rabia y un antígeno de virus inactivado de hepatitis A y opcionalmente un toxoide tetánico detoxicado o un antígeno del virus inactivado de la encefalitis japonesa; Referencia de Patente 13.

10 Además, se había descrito un aumento de la capacidad de inducción de anticuerpos neutralizantes de una vacuna ADN tetravalente de Dengue en ratones por la administración con una vacuna proteica; Referencia No patente 1. El presente documento también desvela el efecto sinérgico por la administración de una mezcla de una vacuna ADN tetravalente de Dengue y una vacuna de encefalitis japonesa inactivada.

15 Referencia de patente 1: documento WO2002/080965  
Referencia de patente 2: Publicación de patente japonesa N° 2004-67696  
Referencia de patente 3: WO98/00167  
Referencia de patente 4: Publicación de patente japonesa N° 2001-253833  
Referencia de patente 5: Publicación de patente japonesa N° 2007-262097  
20 Referencia de patente 6: Publicación de patente japonesa N° 2007-231029  
Referencia de patente 7: Publicación de patente japonesa N° 2002-535411  
Referencia de patente 8: documento WO00/23107  
Referencia de patente 9: documento WO98/08146  
Referencia de patente 10: documento WO00/20565  
25 Referencia de patente 11: Publicación de patente japonesa N° 2000-83657  
Referencia de patente 12: Publicación de patente japonesa N° 2004-65118  
Referencia de patente 13: documento JP08231422

30 Referencia No patente 1: RESEARCH DISCLOSURE n° 329, Septiembre 1991, HAVANT GB POLYVALENT ANTIGEN VACCINE FOR HUMAN USE' 32975  
Referencia No patente 2: Eiji Konishi, Heisei 17 Nendo Kenkyu Hokousho: 70-77 (2006).

### Divulgación de la invención

#### 35 Problema técnico a resolver por la invención

Como se ha descrito anteriormente, aunque se desea el desarrollo de una vacuna mixta que haga posible la inmunización contra más enfermedades infecciosas en un intervalo, cuanto mayor es el número de antígenos vacunales que se mezclan, se fuerza una menor cantidad de cada uno de los antígenos vacunales. Por lo tanto, con el fin de superar este obstáculo, es deseable que el desarrollo de dicho adyuvante permita un título de anticuerpos más alto incluso con una cantidad menor de antígeno.

#### Medios para resolver los problemas

45 En estas circunstancias, los presentes inventores han continuado seriamente las actividades de investigación y como resultado han descubierto que, añadiendo partículas de VEJ inactivado a una solución vacunal que contenga todos o una parte de antígenos protectores contra enfermedades infecciosas, es decir, difteria, tos ferina, tétanos, polio, hepatitis B y hepatitis A, se induce la inmunización con un nivel más alto y más rápidamente al compararse con la solución vacunal correspondiente que no contiene dichas partículas de VEJ inactivado, es decir, que las partículas de VEJ inactivado poseen actividad como adyuvante, y por lo tanto se completa la presente invención. Hasta la presente invención, no había ninguna idea para utilizar la actividad adyuvante ejercida por las partículas de VEJ inactivado per se, si no que las partículas de VEJ inactivado eran un antígeno vacunal en una vacuna mixta. La idea de los presentes inventores se ha descubierto. Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para utilizar una partícula de VEJ inactivado como adyuvante para varias vacunas mixtas y una vacuna mixta que contiene el VEJ.

La presente invención se refiere a las realizaciones como se caracterizan en las reivindicaciones. Por lo tanto, se refiere a los siguientes puntos:

- 60 1. Un método para preparar una vacuna que comprende una etapa de dejar el virus inactivado de encefalitis japonesa que se obtiene por cultivo de células Vero para que esté contenido como adyuvante añadiendo el virus de la encefalitis japonesa a una vacuna, donde el virus de la encefalitis japonesa inactivado tiene una estructura de partícula.
- 65 2. El método del punto 1 en el que la vacuna es una vacuna mixta en la que se mezclan juntas dos o más vacunas diferentes.

3. El método del punto 2 donde dicha vacuna se selecciona de entre el grupo que consiste en una vacuna de difteria, una vacuna de tos ferina, una vacuna de tétanos, una vacuna de polio, una vacuna de hepatitis A, una vacuna de hepatitis B, una vacuna de rabia, una vacuna de sarampión, una vacuna de rubeola, una vacuna de gripe, una vacuna de paperas, una vacuna de varicela, una vacuna de rotavirus, una vacuna de viruela menor, una vacuna de fiebre amarilla, una vacuna de encefalitis mediada por ácaros, una vacuna Hib, una vacuna tifoidea, una vacuna de cólera, una vacuna BCG, una vacuna de neumococos y una vacuna contra la meningitis producida por *Neisseria meningitidis*.

4. El método de uno cualquiera de los puntos 1 a 3 donde las partículas de virus de encefalitis japonesa inactivado están a 250 ng/ml o 34 µg/ml.

#### Más efectos eficaces que en la técnica anterior

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para preparar una vacuna que comprende partículas de VEJ inactivado como un adyuvante y una vacuna que se prepara por dicho método. Por ejemplo, añadiendo partículas de VEJ inactivado a una vacuna mixta como adyuvante, se puede inducir la inmunización a un nivel más alto y más rápidamente en comparación con la correspondiente vacuna sin la adición de dichas partículas de VEJ inactivado. A saber, como el título de un determinado anticuerpo que es capaz de conseguir una protección contra la infección se puede obtener con una cantidad menor de antígeno, puede reducirse la cantidad de cada uno de los antígenos que están contenidos en una vacuna mixta de forma que permita que estén contenidas más clases de antígenos en una vacuna mixta.

Además, de acuerdo con el método de la presente invención, no solo se puede producir la inmunización con una vacuna mixta sino que también se aumentará el título de anticuerpos para prevenir la infección por el virus de encefalitis japonesa. Por lo tanto, la vacuna mixta de la invención también se utiliza como una vacuna para la encefalitis japonesa.

#### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra los resultados del ELISA que se lleva a cabo con los sueros de ratones inmunizados con una mezcla de una vacuna DPT y partículas de VEJ. a: títulos de anticuerpo anti-TT; b: título de anticuerpos anti-PT; c: título de anticuerpos anti-DT; d: títulos de anticuerpos anti-VEJ

La Fig. 2 muestra los resultados del ELISA que se lleva a cabo con los sueros de ratones inmunizados con una mezcla de una vacuna DPT y partículas de VEJ a varias concentraciones. a: títulos de anticuerpo anti-TT; b: título de anticuerpos anti-PT; c: título de anticuerpos anti-DT

La Fig. 3 muestra los resultados del ELISA que se lleva a cabo con los sueros de ratones inmunizados con una mezcla de una vacuna DPT y partículas de VEJ a varias concentraciones. a: títulos de anticuerpo anti-TT; b: título de anticuerpos anti-PT; c: título de anticuerpos anti-DT

La Fig. 4 muestra los resultados del ELISA que se lleva a cabo en sueros de ratas inmunizadas con una mezcla de vacuna IPV y partículas de VEJ. a: título de anticuerpos anti-PV-1; b: título de anticuerpos anti-PV-2; c: título de anticuerpos anti-PV-3

La Fig. 5 muestra los resultados del ELISA que se lleva a cabo en sueros de ratones inmunizados con una mezcla de una vacuna HepB y partículas de VEJ (título de anticuerpos anti-HB).

La Fig. 6 muestran los resultados del ELISA que se lleva a cabo en sueros de ratones inmunizados con una mezcla de vacuna HepA y partículas de VEJ (título de anticuerpos anti-HVA)

#### Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se caracteriza por un método para preparar una vacuna que comprende una etapa de adición de un VEJ inactivado como adyuvante.

Las cepas de VEJ para su uso en el presente documento pueden ser cualquiera sin limitación específica. La cepa Beijin-1 se utilizó para la invención. El VEJ se puede obtener por dos métodos como se describe a continuación. Uno es un método en el que el VEJ se inocula en el cerebro de ratones y los virus se propagan en el cerebro y luego se purifican a partir del mismo. El otro es un método en el que el VEJ se inocula en cultivos celulares, las células infectadas con virus se cultivan y los virus se purifican a partir de las células infectadas con VEJ y el sobrenadante del cultivo. Desde el punto de vista de la protección animal, es preferible el método de propagación con las células cultivadas. Como célula huésped para la propagación de VEJ se pueden utilizar células Vero que permiten una buena propagación de VEJ y la producción de un antígeno con una mayor antigenicidad. Se puede seleccionar adecuadamente un medio de cultivo para la expansión de las células cultivadas de entre los que se utilizan habitualmente para cultivos celulares tales como un medio M199, medio MEM de Eagle, y similares, preferentemente el medio MEM Dulbecco suplementado opcionalmente con aminoácidos, sales, un agente anti-fúngico/anti-bacteriano, suero animal, y similares. Se puede llevar a cabo a veces un cultivo de alta densidad utilizando un microportador para obtener una gran cantidad de partículas de VEJ. Se conocen varios microportadores para este fin. Un microportador adecuado para el crecimiento de células Vero incluye el Cytodex (Cytodex I, Amersham Pharmacia Biotech) a una concentración de 5 g/l o menos.

La temperatura y duración del cultivo puede ajustarse dependiendo de la combinación de tipos celulares, la cantidad de virus inoculados, la escala y el procedimiento del cultivo y similares. Por ejemplo, cuando se propaga el VEJ por cultivo estático o por cultivo en botella rotatoria con células Vero, las células se pueden cultivar en un medio de cultivo que consista en medio MEM Dulbecco suplementado con aminoácidos no esenciales y suero bovino con una temperatura de cultivo de 32 °C a 38 °C para una duración del cultivo de 2 a 7 días. Para la propagación del VEJ, el medio de cultivo se retira por aspiración cuando el crecimiento alcanza un estadio estable y, después de lavar con tampón fosfato/solución salina varias veces, el VEJ se inocula en las células con una multiplicidad de infección (M.O.I) de 0,01 a 0,0001. Como medio de mantenimiento después de la inoculación vírica, se puede utilizar preferentemente un medio libre de suero con nivel bajo de proteínas. Por ejemplo, se puede utilizar un medio VP-SFM (GIBCO) suplementado con ácido L-glutámico. Las células se pueden cultivar a la temperatura descrita anteriormente durante 4 a 7 días. Tras completar el cultivo, el cultivo resultante, es decir la solución de ruptura celular o el sobrenadante del cultivo, se puede recuperar, añadir formalina y dejarlo en reposo a alrededor de 4 °C durante 1 a 3 meses o más para inactivar los virus.

Para la purificación de partículas de VEJ a partir de la solución que se obtiene que contiene el VEJ, se pueden utilizar los procedimientos de purificación que se utilizan comúnmente en química proteica, por ejemplo, centrifugación, desalación, filtración normal, ultrafiltración, precipitación isoelectrica, electroforesis, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía hidrofóbica, cromatografía en hidroxiapatita, y similares. Entre estas, el procedimiento adecuado puede seleccionarse y usarse una combinación de las mismas. En los ejemplos del presente documento, las partículas de VEJ se purificaron sometiendo la solución que contiene VEJ a una centrifugación con un gradiente de sacarosa, se fracciona y se agrupan las fracciones de partículas de VEJ, y se lleva a cabo una cromatografía de afinidad en gel de éster sulfato de celulosa. La solución que contiene el VEJ inactivado tras la purificación se puede diluir con, por ejemplo, un tampón fosfato o solución salina hasta conseguir un contenido vírico adecuado para su uso como un adyuvante. La solución obtenida de esta manera que contiene las partículas de VEJ inactivado se puede añadir a varias vacunas como adyuvante.

El método que se desvela en el presente documento se puede utilizar tanto para una vacuna contra enfermedades infecciosas víricas como para una vacuna frente a enfermedades infecciosas bacterianas. Una vacuna contra enfermedades infecciosas víricas incluye, por ejemplo, una vacuna contra hepatitis A, hepatitis B, rabia, polio, sarampión, rubeola, gripe, fiebre amarilla, encefalitis mediada por ácaros, paperas, varicela, rotavirus, viruela menor, y similares. Una vacuna contra enfermedades infecciosas bacterianas incluye, por ejemplo, tos ferina, difteria, tétanos, fiebre tifoidea, cólera, meningitis producida por *Neisseria meningitidis*, Hib (*Haemophilus influenzae* tipo B), BCG, neumococos y similares. Una vacuna que se seleccione de entre estas se puede utilizar sola o puede ser una vacuna mixta en la que dos o más vacunas se mezclan juntas. Sin embargo, como la cantidad de antígeno que contiene la vacuna puede reducirse cuando se utilizan las partículas de VEJ inactivado se utiliza como adyuvante, la vacuna puede utilizarse preferentemente como una vacuna mixta en la que la cantidad de antígenos está restringido.

La forma de dosificación puede ser por inyección, en jeringa, agentes transdérmicos y pulverizadores, estando la vacuna en una preparación líquida en la que los productos líquido-líquido están ya mezclados en una etapa a granel, una preparación sistémica en la que un producto líquido-líquido y un producto líquido-liofilizado se colocan en envases para el mezclado por un toque cuando se utilizan, o una preparación en la que un producto líquido-líquido y un producto líquido-liofilizado se mezclan manualmente cuando se utilizan. Una vía de administración incluye la inyección intramuscular, inyección subcutánea, administración transdérmica, y similares, que se pueden seleccionar adecuadamente dependiendo de los fines. Una vía de administración puede ser también tal que se pueden utilizar o el mismo sitio de administración o diferentes sitios de administración.

En cuanto a las vacunas descritas anteriormente, se puede añadir un adyuvante adecuado a una solución de antígeno para aumentar la inmunogenicidad. Una cantidad de adyuvante que se puede añadir se fija dependiendo del tipo, número y cantidad del antígeno. El tipo de adyuvante incluye gel de hidróxido de aluminio, gel de fosfato de aluminio, gel de sulfato de aluminio, aceite mineral, aceite no mineral, y similares. Se utiliza sobre todo un gel de aluminio, que se haya utilizado en varias vacunas para seres humanos y haya probado bien que es seguro. Aunque se ha probado que el gel de aluminio es seguro, si no se tiene cuidado con su dosis, se pueden ver efectos secundarios adversos tales como encefalopatía por aluminio o enfermedad ósea por aluminio. Por lo tanto, se tiene que utilizar el gel de aluminio preferentemente en la cantidad más baja posible. Como las partículas de VEJ inactivado de acuerdo con la presente invención permiten la reducción de la cantidad de gel de aluminio en una vacuna que contiene aluminio, la vacuna de la presente invención puede utilizarse eficazmente en combinación con un gel de aluminio.

Las partículas de VEJ inactivado se puede utilizar en un intervalo de 250 ng a 34 µg/ml donde la actividad adyuvante se ejerce, preferentemente con 1 a 16 µg/ml, más preferentemente con 2 a 8 µg/ml. En cuanto a la programación de la adición de las partículas de VEJ inactivado a una vacuna, las partículas de VEJ inactivado se pueden añadir mientras o después de prepararse la vacuna. Por ejemplo, se puede añadir una cantidad adecuada de partículas de VEJ inactivado a una solución de reserva de una vacuna viva atenuada o a una solución de reserva de una vacuna inactivada o una mezcla de las mismas y luego la solución se puede diluir adecuadamente con un tampón fosfato o solución salina. Antes de la adición de las partículas de VEJ inactivado, se puede utilizar gel de aluminio si la

ocasión lo demanda. Se puede utilizar una vacuna y un gel de aluminio con un intervalo de 50 ng a 80 µg/ml y de 100 a 400 µg/ml, respectivamente.

La evaluación de las partículas de VEJ inactivado como adyuvante se puede hacer comparando la respuesta inmunitaria inducida cuando una vacuna o una vacuna mixta que contiene las partículas de VEJ inactivado se inyecta a animales por vía subcutánea, intramuscular o administración intradérmica con la respuesta inmunitaria inducida cuando la vacuna no contiene las partículas de VEJ inactivado se inyecta a los animales. Para la evaluación, se puede utilizar un animal pequeño tal como una rata, ratón, cobaya o conejo. Por ejemplo, se puede sacar sangre de los animales inmunizados con una vacuna que contiene las partículas de VEJ inactivado, se puede aislar el suero de los mismos y se mide el anticuerpo (el título) en el suero obtenido por comparación con un anticuerpo (el título) en el suero de animales inmunizados con una vacuna que no contiene las partículas de VEJ inactivado para evaluar de esta manera las partículas de VEJ inactivado como adyuvante. Un método para medir un anticuerpo (el título) incluye el ELISA, EIA, un ensayo de neutralización con una toxina y una línea celular, y similares, se puede utilizar cualquiera de ellos.

La presente invención se puede explicar con más detalle por medio de los siguientes Ejemplos de referencia y Ejemplos pero no se debería considerar que se limite a estos.

#### Ejemplo de referencia 1

Las partículas del virus de encefalitis japonesa se prepararon como se describe en la Publicación de patente japonesa Nº 2000-83657. En resumen, se inoculó el virus (Beijin-1) a una M.O.I. de 0,01 en células Vero cultivadas por cultivo en suspensión con medio MEM Dulbecco y, tras la absorción a 37 °C durante 90 minutos, las células se cultivaron a la misma temperatura durante 3 a 5 días mientras se suplementaba el medio. La solución de cultivo se sometió a centrifugación en un gradiente de sacarosa para recuperar las fracciones víricas y las partículas víricas se purificaron en gel de éster sulfato de celulosa. En cuanto a la inactivación de las partículas de víricas, las partículas víricas se dejaron en reposo en condiciones de 0,08 % por volumen de formalina en un refrigerador durante aproximadamente medio año. Las partículas de virus de encefalitis japonesa que se obtuvieron de esta manera se utilizaron en los Ejemplos. Se midió la cantidad de proteína en las partículas del virus de encefalitis japonesa por el método Lowry.

#### Ejemplo de referencia 2

(1) ELISA utilizado para la medición del título de anticuerpos

Para inmovilizar un antígeno, se utilizaron, toxoide pertussis (PT9) a 2,5 µg/ml, toxoide diftérico (DT) a 5 µg/ml, toxoide tetánico (TT) a 5 µg/ml, antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBs) a 5 µg/ml, poliovirus tipo 1 a 1,9 Du/ml, poliovirus tipo 2 a 0,975 Du/ml, poliovirus tipo 3 a 1,5 Du/ml, y partículas de VEJ inactivado a 5 µg/ml. Para HBs y partículas de VEJ inactivado, se midió la cantidad de proteína por el método Lowry. Para cada DPT, se midió la cantidad de nitrógeno proteico por el método de Kjeldahl y se convirtió en cantidad de proteína. Para los poliovirus, se midió la cantidad de antígeno D. El antígeno que se iba a inmovilizar se añadió a una placa de 96 pocillos (Nunc, Maxisorp) a 100 µl/pocillo y la placa se dejó en reposo a 4 °C para la inmovilización. Al día siguiente, cada pocillo se lavó tres veces con 350 µl de PBS que contenía un 0,05 % de Tween 20 (PBST) y se añadieron 350 µl/pocillo de Block Ace (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd., abreviado a partir de aquí como "BA") se diluyó 4 veces con PBS y la placa se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras las 2 horas, se retiró suficientemente el BA diluido 4 veces y se lavaron los pocillos tres veces con 350 µl/ml de PBST. Luego se diluyeron las muestras con BA diluido 10 veces con PBS que contenía un 0,05 % de Tween 20 y se añadieron 100 µl/pocillo de cada una de las muestras diluidas. Tras la reacción a 37 °C durante 2 horas, se lavaron los pocillos tres veces con 350 µl/pocillo de PBST. Tras el lavado se retiró la solución suficientemente, se añadieron en cada uno de los pocillos 100 µl/pocillo de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con HRP (american Qualax, A131PS) o anticuerpos de rata anti-IgG de ratón marcado con HRP (Zymed, 04-6020), anticuerpo de cabra (H + L) anti-IgG de rata marcado con HRP (Zymed, 81-9520), cada uno diluido 2000 veces con la solución utilizada para la disolución de las muestras, para la reacción a 37 °C durante 1 hora. Tras 1 hora, se desechó la solución suficientemente y los pocillos se lavaron con 350 µl/pocillo de PBST cuatro veces y con la misma cantidad de agua destilada dos veces. Se añadió un sustrato cromogénico TMB+ (Dako) a 100 µl/pocillo para la reacción en penumbra a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se añadió ácido sulfúrico 1 N a 100 µl/pocillo para parar el desarrollo y se midió la absorbancia a 450 nm.

(2) Preparación de un suero de referencia y cálculo del título de anticuerpos

El suero, cuando se probaba un título suficiente de anticuerpos por el sistema de medición de título de anticuerpo como se describe posteriormente de dos a cuatro semanas tras la inmunización de un animal con un antígeno para la protección contra una enfermedad infecciosa, se utilizó como suero de referencia. A modo de ejemplo, el suero de referencia de cada antígeno de DPT era una muestra de un animal inmunizado durante 2 semanas por administración intraperitoneal con 0,5 ml de la preparación de DPT actual diluida 5 veces. Para el título de anticuerpos de los respectivos antígenos, se diluyeron los sueros de 26 a 30 ratones no inmunizados 50 veces o 200

veces con una solución de dilución para las muestras y cada una de las muestras diluidas se sometió a ELISA por duplicado como se ha descrito anteriormente para medir la DO a 450 nm. Se fijó el valor de corte como el valor medio de la DO 450 nm más dos veces la desviación estándar. Los sueros de referencia se diluyeron en serie y se midió la DO 450 nm. Se utilizaron las veces de dilución en exceso del valor de corte (PT: 12.800 veces, DT: 96.000 veces, TT: 320.000 veces, VEJ: 1.024.000 veces) como un título de suero de referencia. A saber, el suero a las veces de dilución se fijó como 1 EU del título de anticuerpo respectivo para la medición de las muestras. Para el ELISA del anticuerpo anti-poliovirus, se utilizó para la medición de la DO, la muestra diluida 100 veces.

(3) Medición del título de anticuerpo del anticuerpo anti-HBs y determinación de la tasa de cambio a positivo

Para el título de anticuerpos anti-HBs se utilizaron no solo el ELISA sino también el Sistema IMx Ausab Assay (abbott, 2262-83) para medir el título de anticuerpo y una tasa de cambio a positivo.

**Ejemplo 1: Actividad adyuvante de las partículas de VEJ para el antígeno vacunal DPT**

Las partículas de virus de la encefalitis japonesa (VEJ) que se obtuvieron en el Ejemplo de referencia 1 y cada uno de los antígenos de DPT se mezclaron juntos en una composición como se muestra en la Tabla 1. La mezcla obtenida (0,5 ml) se inoculó por vía intraperitoneal en ratones SPF (C57BL/6s; 4 ratones/grupo) de 10 semanas de edad (machos). Se extrajo sangre de los animales antes de la inoculación y en las semanas 2, 3, y 4 después de la inoculación primaria. Tras la extracción de la Semana 4, se administró un refuerzo con la misma mezcla. Se extrajo sangre de los animales las Semanas 1 y 2 tras la segunda inoculación y se midió el título de anticuerpos de los sueros respectivos según se ha descrito en el Ejemplo de referencia 2-(1). Como resultado, no se observó una interferencia negativa de antígeno entre ellos debido a la adición de VEJ. Se descubrió que el título contra los respectivos antígenos de DPT (PT, DT, TT) en el grupo con adición de VEJ era mayor que en el grupo con DPT solo (Fig. 1a, b, c). La actividad adyuvante de las partículas de VEJ se podía ver la semana 2 tras la inoculación primaria.

Tabla 1

	Vacuna DPT	Partículas VEJ
Grupo 1	PT: 0,24 µg/cabeza, DT: 0,41 Lf/cabeza, TT: 0,043 Lf/cabeza, Alum: 0,006 mg/ml	-
Grupo 2		1 µg/cabeza

**Ejemplo 2: Efecto de la concentración de partículas de VEJ sobre la actividad adyuvante**

(1) Las partículas de VEJ que se obtuvieron en el Ejemplo de referencia 1 y cada uno de los antígenos DPT se mezclaron juntos en una composición como se muestra en la Tabla 2. La mezcla obtenida (0,5 ml) se inoculó por vía intraperitoneal a ratones SPF (C57BL/6s; 5 ratones/grupo) de 9 semanas de edad (machos). Se extrajo sangre de los animales antes de la inoculación y la semana 4 después de la inoculación primaria. El título de anticuerpos de los sueros respectivos se midió según el método para medición de títulos de anticuerpos que se describe en el Ejemplo de referencia 2-(1). Los resultados de la medición del título de anticuerpos se muestran como la media geométrica. Como resultado, se descubrió que el título de anticuerpos contra los antígenos respectivos de DPT (PT, DT, TT) en los grupos 2 a 7 era mayor que en el Grupo 1 en el que no se habían añadido las partículas de VEJ (Fig. 2).

Tabla 2

Grupo	Vacuna DPT	Partículas VEJ
1	PT: 0,24 µg/cabeza, DT: 0,41 Lf/cabeza, TT: 0,043 Lf/cabeza, Alum: 0,006 g/ml	-
2		0,25 µg/cabeza
3		0,5 µg/cabeza
4		1 µg/cabeza
5		2 µg/cabeza
6		4 µg/cabeza
7		8 µg/cabeza

(2) Las partículas de VEJ que se obtuvieron en el Ejemplo de referencia 1 y cada uno de los antígenos DPT se mezclaron juntos en una composición como se muestra en la Tabla 3. La mezcla obtenida (0,5 ml) se inoculó por vía intraperitoneal en ratones BDF-1 (4 ratones/grupo) de 9 semanas de edad (hembras). Se extrajo sangre de los animales antes de la inoculación y en la Semana 4 después de la inoculación primaria. Se midió el título de anticuerpos de los sueros respectivos según el método de medición de títulos de anticuerpos que se describe en el Ejemplo de referencia 2-(1). Se descubrió que el título de anticuerpos en los Grupos con adición de partículas VEJ era mayor que el del Grupo sin adición de las partículas VEJ (Fig. 3).

Tabla 3

Grupo	Vacuna DPT	Partículas VEJ
1	PT: 3,6 µg/cabeza, DT: 6,25 Lf/cabeza, TT: 0,65 Lf/cabeza, Alum: 0,1 mg/ml	-
2		1 µg/cabeza
3		8 µg/cabeza

**Ejemplo 3: Actividad adyuvante de partículas de VEJ en la vacuna IPV**

- 5 Las partículas de VEJ que se obtuvieron en el Ejemplo de referencia 1 y la vacuna IPV disponible en el mercado (IMOVAX POLIO Sanofi Pasteur) diluida 2 veces y 4 veces se mezclaron juntas en una composición como se muestra en la Tabla 4. La mezcla obtenida (0,5 ml) se inyectó por vía intramuscular a ratas SPF (Wister; 3 ratas/grupo) de 8 semanas de edad (hembras) en el muslo de la extremidad trasera. Se extrajo sangre de los animales antes de la inoculación y las Semanas 4 y 8 después de la inoculación primaria. Se midió el título de anticuerpo de los respectivos sueros según el método de medición del título de anticuerpos como se describe en el
- 10 Ejemplo de referencia 2-(1). Se descubrió que el título de anticuerpos en los Grupos con adición de partículas de VEJ era mayor que el del Grupo sin adición de las partículas de VEJ (Fig. 4).

Tabla 4

Grupo	Vacuna IPV	Partículas VEJ
1	Dilución de 2 veces (I: 20 UD, II: 4 UD, III: 16 UD)	-
2		1 µg/cabeza
3	Dilución de 4 veces (I: 10 UD, II: 2 UD, III: 8 UD)	-
4		1 µg/cabeza

15

**Ejemplo 4: Actividad adyuvante de partículas de VEJ en una vacuna HepB**

- Las partículas de VEJ que se obtuvieron en el Ejemplo de referencia 1 y el antígeno HBs de la vacuna HepB se mezclaron juntos en una composición como se muestra en la Tabla 5. La mezcla obtenida (1 ml) se inoculó por vía intraperitoneal a ratones BALB/c (5 ratones/grupo) de 5 semanas de edad (machos). Se extrajo sangre de los animales antes de la inoculación y las semanas 3, 5 y 6 después de la inoculación primaria. El título de anticuerpos de los sueros respectivos se midió según el método de medición del título de anticuerpos que se describe en el
- 20 Ejemplo de referencia 2-(1). Se encontró que el título de anticuerpos de los Grupos con adición de las partículas de VEJ era mayor que en el Grupo sin adición de las partículas de VEJ (Fig. 5). Cuando se añadía VEJ a una vacuna HepB a una dosis de 0,25 µg/cabeza, el título de anticuerpos se recuperaba al mismo o mayor nivel que la vacuna HepB a la dosis de 0,5 µg/cabeza. El título de anticuerpos de los respectivos sueros se midió también según el
- 25 método descrito en el Ejemplo de referencia 2-(3). El grupo 4 con adición de las partículas de VEJ mostraba una tasa más alta de positivos que el Grupo 3 sin adición de las partículas de VEJ (Tabla 6).

30

Tabla 5

Grupo	Vacuna HepB	Partículas VEJ
1	HBs: 0,5 µg/cabeza, Alum: 0,01 mg/ml	-
2		1 µg/cabeza
3	HBs: 0,25 µg/cabeza, Alum: 0,006 mg/ml	-
4		1 µg/cabeza

Tabla 6

Grupo	Título medio de anticuerpos (mUI/ml)	Tasa de cambio a positivo
1	80	100 % (5/5)
2	118	100 % (5/5)
3	26	60 % (3/5)
4	19	80 % (4/5)

**Ejemplo 5: Actividad adyuvante de partículas VEJ para una vacuna HepA**

- Las partículas de VEJ que se obtuvieron en el Ejemplo de referencia 1 y el antígeno HAV de la vacuna HepA se mezclaron juntos en una composición como se muestra en la Tabla 7. La mezcla obtenida (1 ml) se inoculó por vía intraperitoneal a ratones BALB/c (5 animales/grupo) de 5 semanas de edad (machos). Se extrajo sangre de los animales antes de la inoculación y las Semanas 2 y 7 después de la inoculación primaria. El título de anticuerpos de los respectivos sueros se midió por ELISA. Para la fase sólida primaria, se utilizó un antisuero anti-HAV de conejo. Tras lavar tres veces con PBST, se inmovilizó un antígeno HAV a 1,25 ng/50 µl/pocillo. Las muestras se aplicaron para la reacción a 4 °C durante una noche. Tras lavar tres veces con PBST, se hizo reaccionar un anticuerpo secundario conjugado con HRP. Tras lavar cuatro veces con PBST, se hizo reaccionar un sustrato y se midió la absorbancia. La medición también se hizo para 30 muestras de sueros no inmunizados, se calculó un valor de corte (3 SD) y se obtuvo una tasa de cambio a positivo (valor de corte a las 2 sem.: 0,061, valor de corte a las 7 sem.: 0,065).
- Se descubrió que el título de anticuerpos en los Grupos con adición de las partículas VEJ era mayor que en el Grupo sin adición de las partículas VEJ (Fig. 6). No había distinción en la tasa de cambio a positivo entre los Grupos 1 y 2 la Semana 2 tras la inoculación y entre los Grupos 3, y 4 en la Semana 2 y 7 tras la inoculación (Tabla 8).

Tabla 7

Grupo	vacuna HepA	Partículas VEJ
1	antígeno HAV: 0,05 µg/cabeza	-
2		1 µg/cabeza
3	antígeno HAV: 0,025 µg/cabeza	-
4		1 µg/cabeza

Tabla 8

Grupo	Tasa de cambio a positivo	
	2 sem.	7 sem.
1	60 % (3/5)	80 % (4/5)
2	80 % (4/5)	80 % (4/5)
3	20 % (1/5)	20 % (1/5)
4	40 % (2/5)	60 % (3/5)

**Aplicabilidad industrial**

- Las partículas de VEJ inactivado de la presente invención son útiles como adyuvantes para aumentar la respuesta inmunitaria de varias vacunas, en particular, una vacuna mixta.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para preparar una vacuna que comprende una etapa de dejar el virus inactivo de encefalitis japonesa que se obtiene por un cultivo de células Vero en el que está contenido como adyuvante añadiendo el virus de encefalitis japonesa inactivado a una vacuna, donde el virus de encefalitis japonesa inactivado tiene una estructura de partícula.
- 10 2. El método de la reivindicación 1 donde la vacuna es una vacuna mixta en la que dos o más vacunas diferentes se mezclan juntas.
- 15 3. El método de la reivindicación 2 donde dicha vacuna se selecciona de entre el grupo que consiste en vacuna de difteria, una vacuna de tos ferina, una vacuna de tétanos, una vacuna de polio, una vacuna de hepatitis A, una vacuna de hepatitis B, una vacuna de rabia, una vacuna de sarampión, una vacuna de rubeola, una vacuna de gripe, una vacuna de paperas, una vacuna de varicela, una vacuna de rotavirus, una vacuna de viruela menor, una vacuna de fiebre amarilla, una vacuna de encefalitis mediada por ácaros, una vacuna Hib, una vacuna tifoidea, una vacuna de cólera, una vacuna BCG, una vacuna de neumococos y una vacuna contra la meningitis producida por Neisseria meningitidis.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde las partículas de virus inactivado de encefalitis japonesa están a 250 ng/ml o 34 µg/ml.

Fig. 1

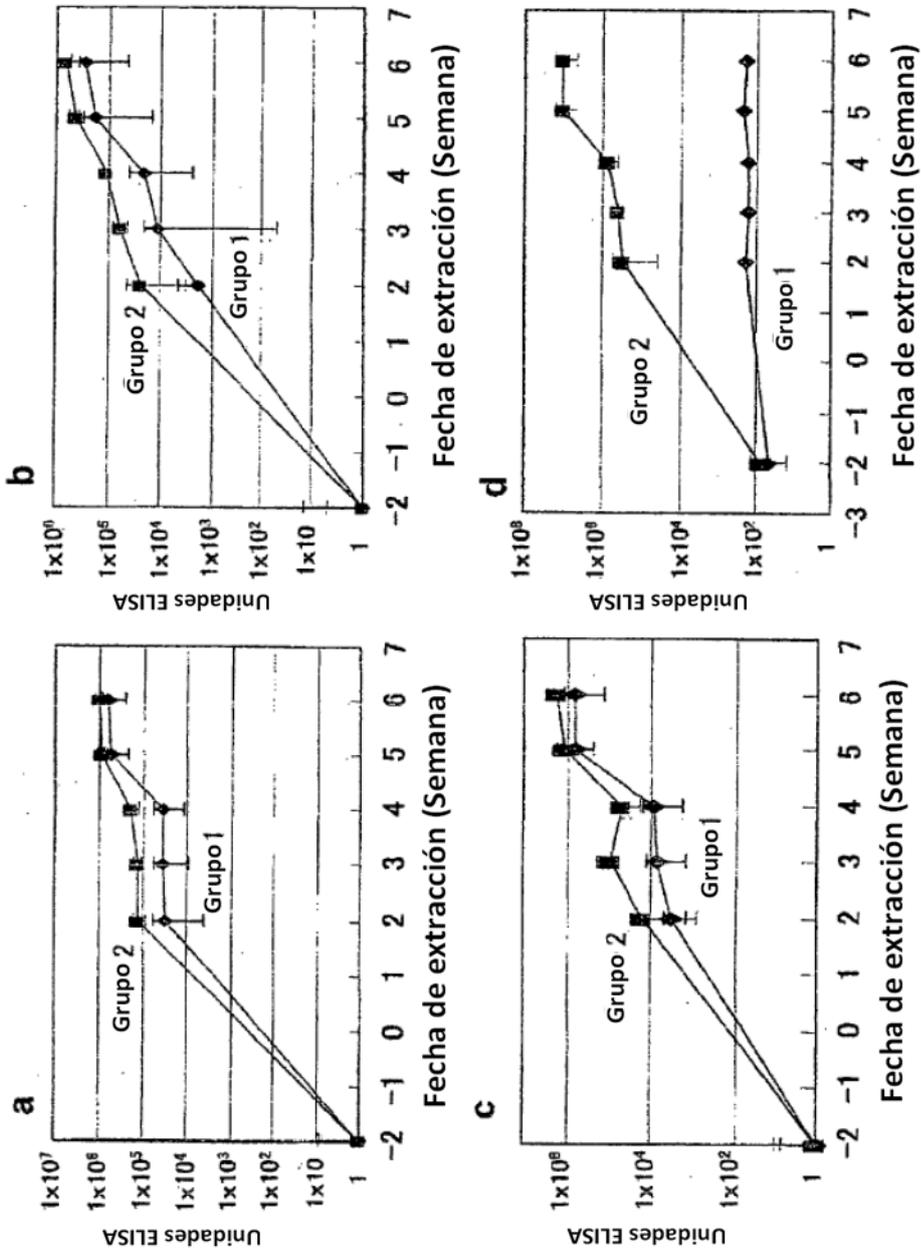


Fig. 2

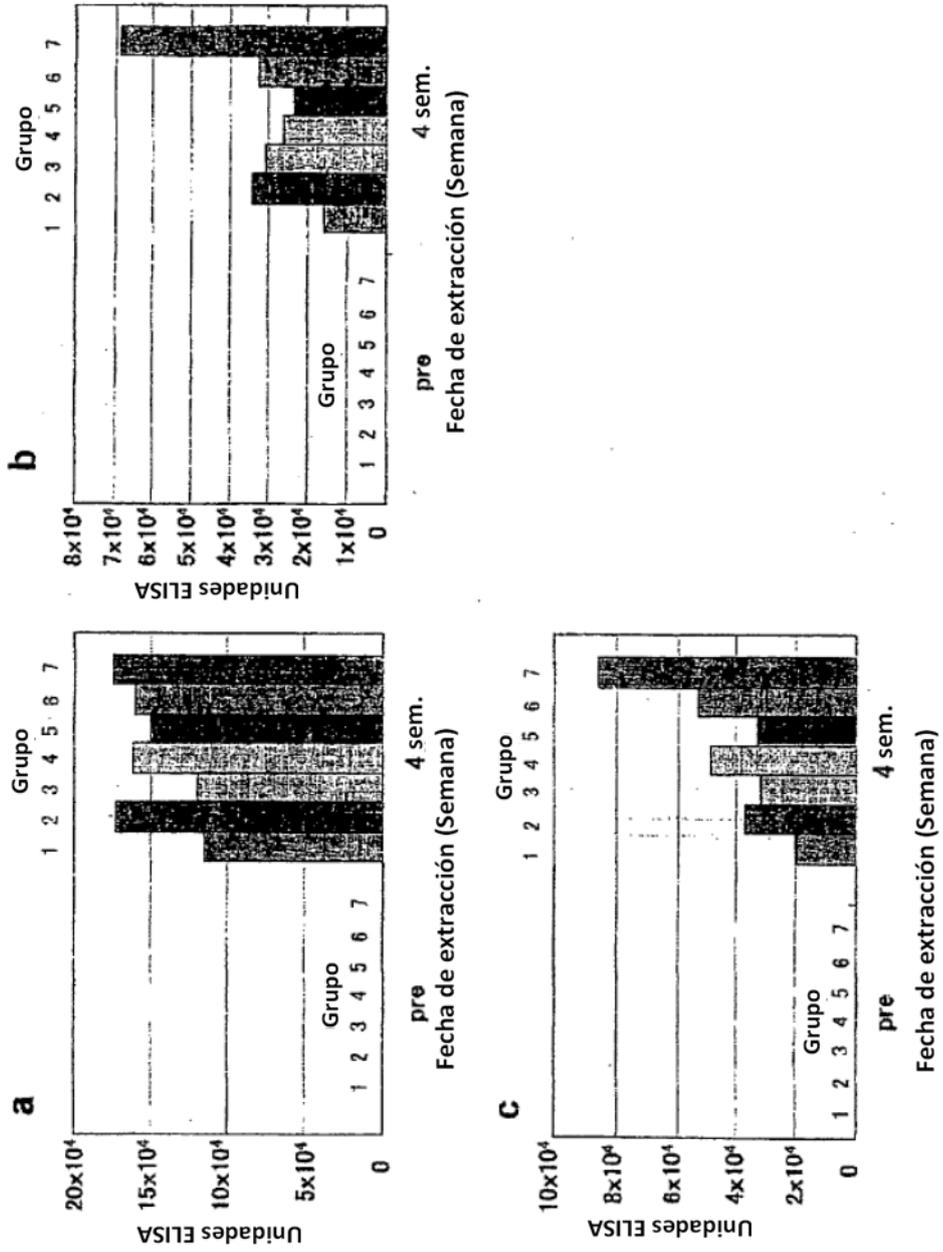


Fig. 3

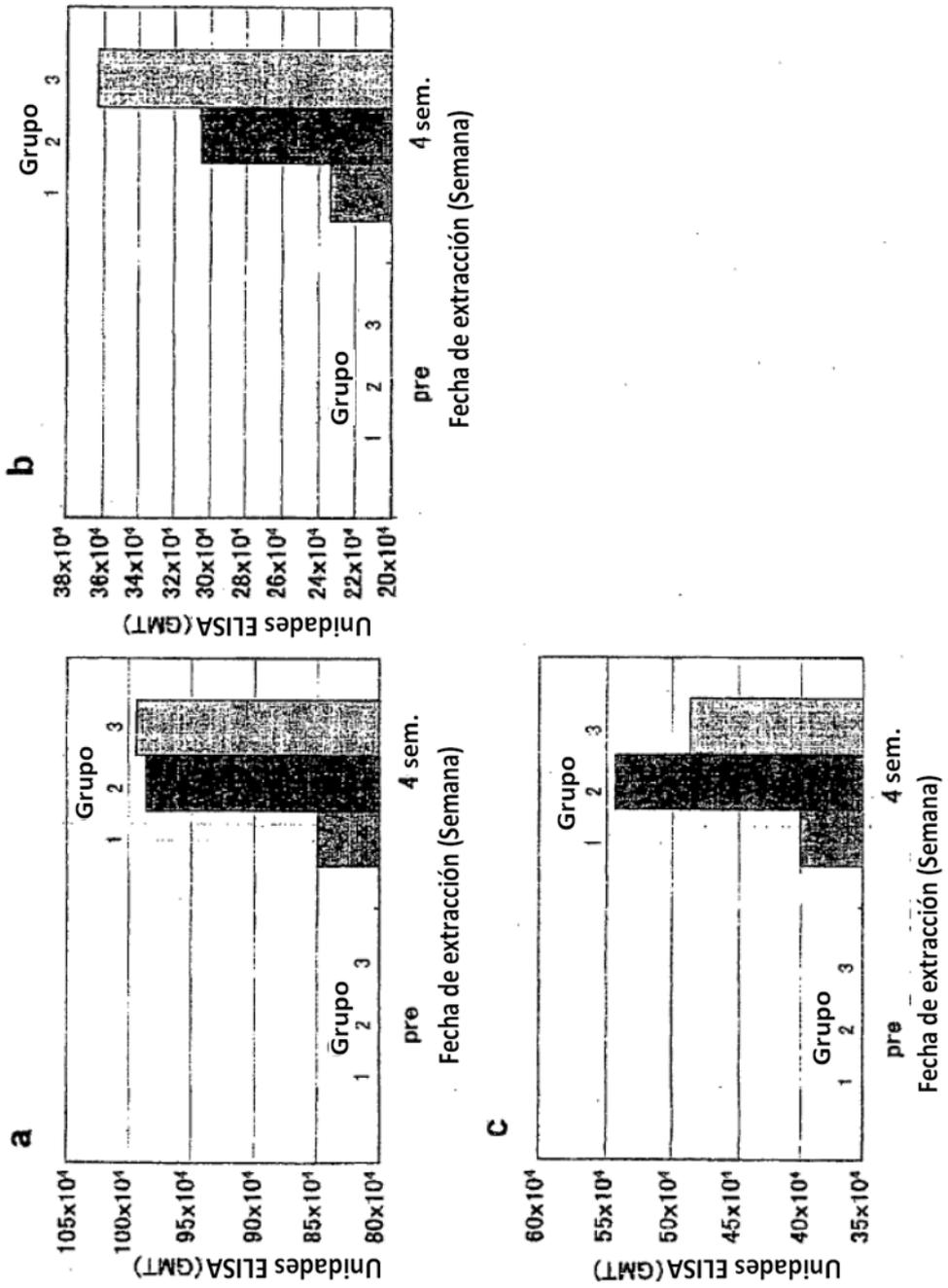


Fig. 4

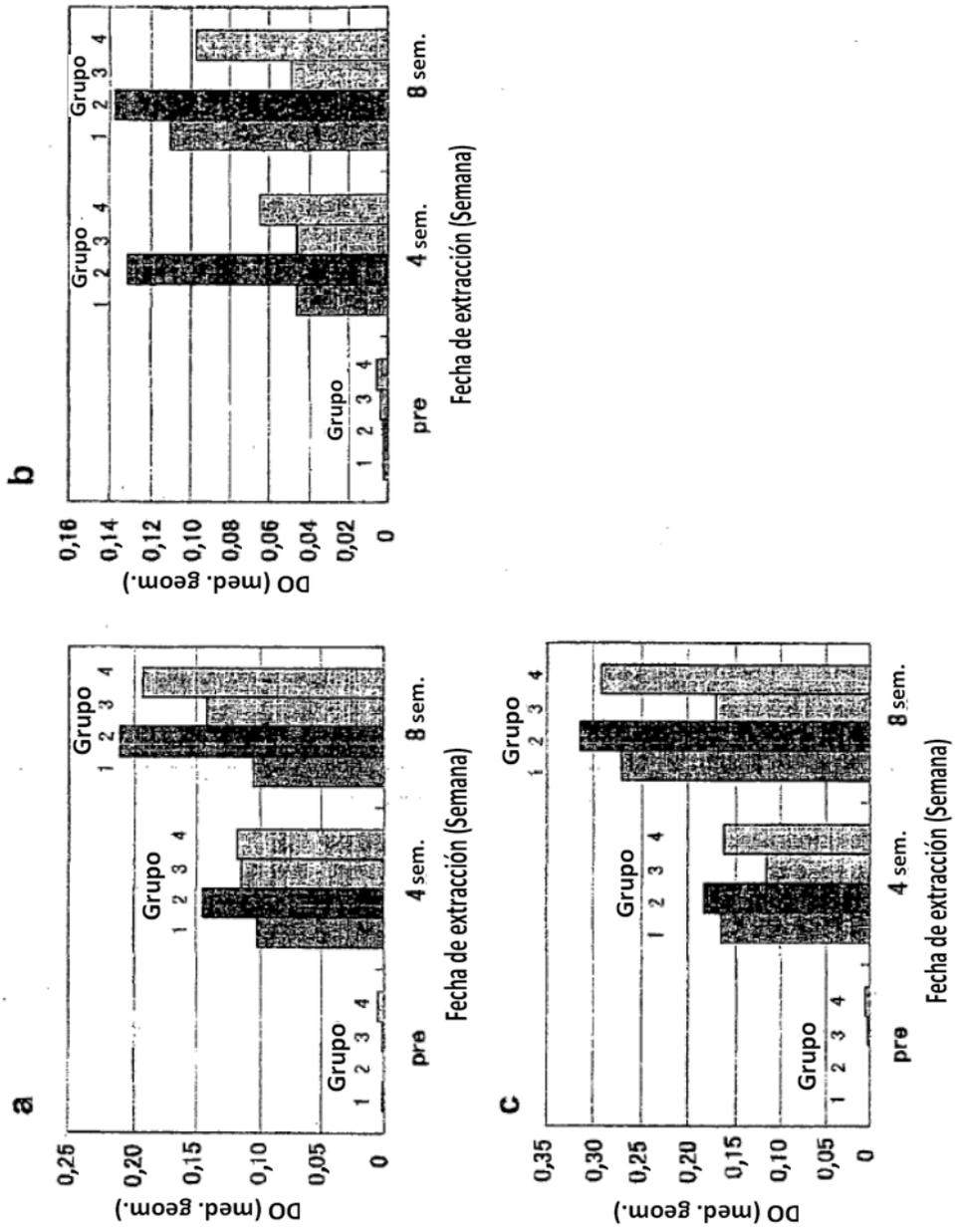


Fig. 5

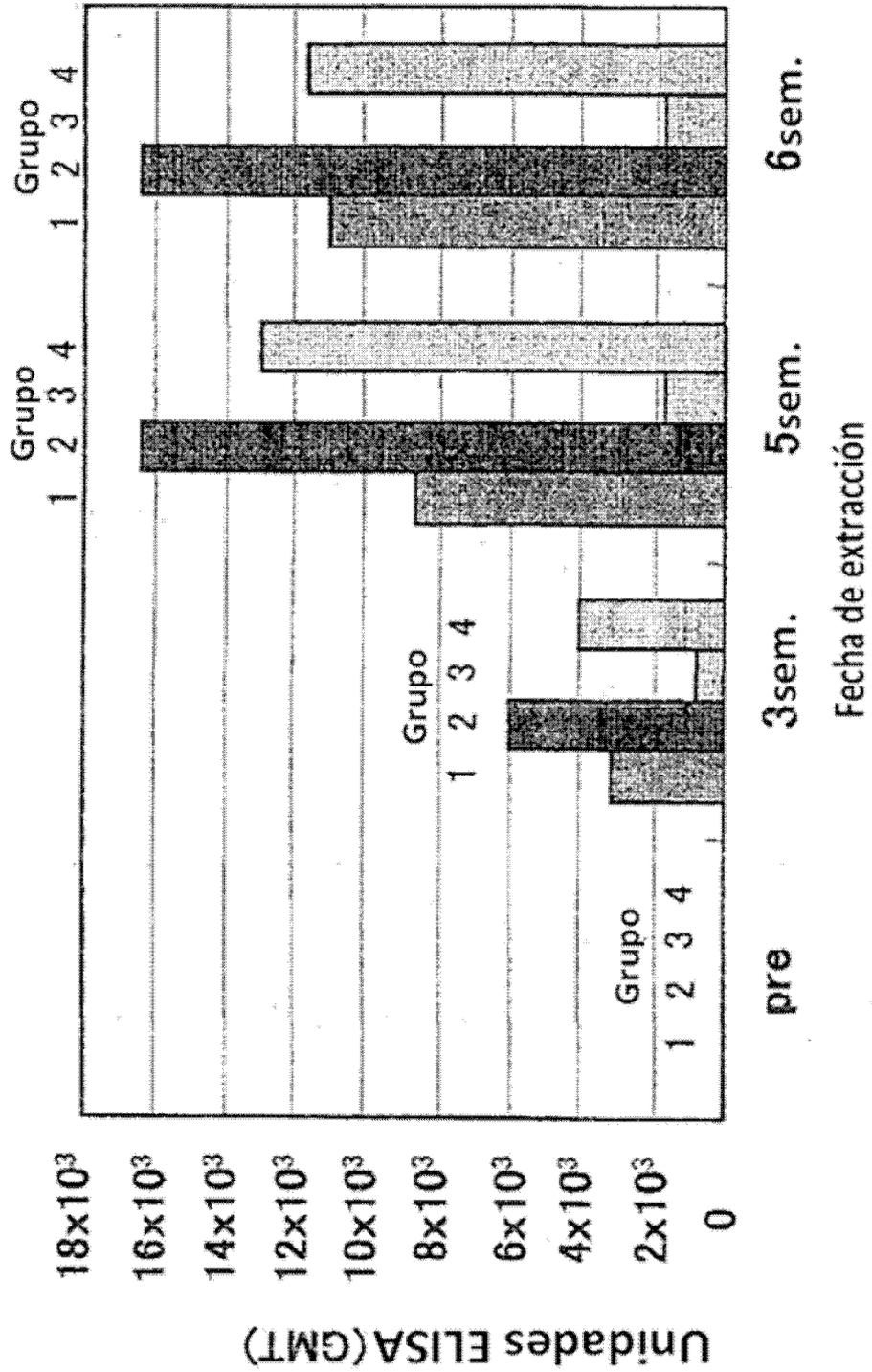


Fig. 6

