

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 301**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2014 PCT/US2014/047164**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15010002**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2014 E 14748051 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 3021867**

54 Título: **Procedimientos de preparación de rotavirus inactivado**

30 Prioridad:

19.07.2013 US 201361856294 P

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

21.11.2019

73 Titular/es:

ELANCO TIERGESUNDHEIT AG (100.0%)

Mattenstr. 24A

4058 Basel, CH

72 Inventor/es:

DEKKER, BRENT, E.;

HERBERT, JOHN, M. y

REIMNITZ, MICHAEL, J.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 732 301 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

Procedimientos de preparación de rotavirus inactivado

Campo

5 La presente divulgación se refiere a la producción de rotavirus inactivado directamente a partir del sobrenadante de cultivo celular. También se desvelan composiciones que contienen rotavirus inactivado producido directamente a partir de sobrenadante de cultivo celular.

Antecedentes

10 Un tipo de vacuna viral contiene virus inactivados. Los virus activos o infecciosos pueden inactivarse, por lo que dejan de ser infecciosos y no pueden replicarse para producir virus de progenie. Para que sean eficaces en una vacuna, sin embargo, los virus inactivados deben seguir conservando su capacidad para estimular una respuesta inmunitaria (es decir, conservar la inmunogenicidad) cuando se administran a un sujeto.

Existen diferentes procedimientos para inactivar los rotavirus. En un procedimiento, el rotavirus se puede inactivar usando agentes químicos. En un ejemplo, puede usarse beta-propiolactona como agente químico.

15 En otro procedimiento para inactivar los rotavirus, puede usarse calentamiento del rotavirus (inactivación térmica). En procedimientos conocidos para inactivar a los rotavirus por calor, los virus se aíslan o purifican del ambiente en el que típicamente se encuentran antes de la inactivación térmica. En un ejemplo, el rotavirus propagado en células cultivadas se aísla del medio de cultivo celular o sobrenadante en el que se han desarrollado las células infectadas con el virus, antes de la inactivación térmica o por calor (Publicación PCT n.º WO2009/032913). En un ejemplo, los rotavirus aislados se suspenden posteriormente en un tampón acuoso que tiene una osmolalidad específica (por ejemplo, 200-
20 500 mOsm), una concentración específica de una sal de un catión divalente (en el intervalo de aproximadamente 1 mM a 15 mM) y una cantidad específica de azúcar y/o alcohol de azúcar (en el intervalo de aproximadamente el 1 al 20 % p/v) (Publicación PCT n.º WO2009/032913). Los rotavirus aislados, suspendidos en el tampón acuoso que tiene la osmolalidad, la concentración de cationes divalentes y la concentración de azúcar/alcohol de azúcar específicas, se inactivan después térmicamente.

Sumario

Se desvelan procedimientos para producir rotavirus inactivados a partir de sobrenadantes de cultivos celulares que contienen rotavirus activos o infecciosos calentando los sobrenadantes de cultivos celulares a 60-80 °C. En un ejemplo, los rotavirus son rotavirus bovinos. En un ejemplo, el procedimiento para producir rotavirus inactivado comprende calentar directamente un volumen de sobrenadante de cultivo celular que contiene rotavirus activo a 60-
30 80 °C, temperatura a la cual se inactiva el rotavirus. En general, el rotavirus en el sobrenadante del cultivo celular que se ha calentado directamente se prueba para garantizar que la temperatura y el tiempo de calentamiento sean suficientes y que ya no haya virus activos o infecciosos. En un ejemplo, el sobrenadante del cultivo celular no tiene uno o más de, una osmolalidad en el intervalo de 200-500 mOsm, una concentración de una sal de un catión divalente en el intervalo de aproximadamente 1 mM a 15 mM y un azúcar y/o alcohol de azúcar en el intervalo de
35 aproximadamente el 1 al 20 % en peso/volumen. El rotavirus inactivado es inmunogénico. En general, la inmunogenicidad del rotavirus inactivado por calor es superior a la inmunogenicidad del rotavirus inactivado químicamente, por ejemplo, inactivado químicamente con beta-propiolactona. En diversos ejemplos, puede filtrarse el sobrenadante antes del calentamiento. Después de la inactivación térmica, puede aislarse el rotavirus inactivado del sobrenadante del cultivo celular. La inactivación térmica de los rotavirus en el sobrenadante celular cultivado se realiza calentando a una temperatura de al menos aproximadamente 60 °C o cualquiera de 65 °C, 70 °C, 75 °C u 80 °C. La temperatura de 60-80 °C se mantiene durante una duración, tras la cual, los rotavirus están inactivados. En diversos ejemplos, esto puede ser durante 15 minutos, 60 minutos, 120 minutos, 240 minutos y otras duraciones. En general, sustancialmente todo el volumen de sobrenadante de cultivo celular se calienta a la temperatura durante el tiempo
40 dado. En un ejemplo, todo el volumen de sobrenadante de cultivo celular se calienta a la temperatura durante el tiempo dado. En un ejemplo, el procedimiento también puede incluir una etapa de congelación. La congelación del sobrenadante del cultivo celular se puede llevar a cabo durante al menos aproximadamente 12 horas o durante otras duraciones. En algunos casos, el sobrenadante de cultivo celular que se ha calentado, posteriormente congelado, puede descongelarse y calentarse nuevamente, en un ejemplo, a la misma temperatura y durante la misma duración que la etapa de calentamiento inicial. En un ejemplo, el pH del sobrenadante del cultivo celular es de 7,6 ± 0,1.

50 En otro ejemplo, el procedimiento para producir rotavirus inactivado comprende recoger sobrenadante de cultivo celular que contiene rotavirus activo de células cultivadas infectadas con rotavirus y calentar directamente un volumen del sobrenadante de cultivo celular a una temperatura a la que el rotavirus se inactiva. En diversos ejemplos, se pueden incluir una o más etapas adicionales. Por ejemplo, el sobrenadante del cultivo celular se puede filtrar antes de calentar directamente, el sobrenadante del cultivo celular puede congelarse después de haberse calentado directamente y/o
55 el rotavirus puede aislarse del sobrenadante del cultivo celular después de haberse calentado directamente. En general, el rotavirus se prueba después de calentar directamente para garantizar que no hay presencia de virus activo infeccioso.

También se desvelan composiciones que comprenden rotavirus inactivados mediante los procedimientos descritos en el presente documento. Además del rotavirus inactivado por los procedimientos desvelados, las composiciones también pueden contener uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Varias composiciones también pueden contener antígenos de uno o más agentes infecciosos además del rotavirus.

- 5 También se desvelan procedimientos para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar a los sujetos composiciones que contienen rotavirus inactivados mediante los procedimientos descritos en el presente documento. En un ejemplo, el sujeto es un animal bovino. En un ejemplo, la composición se administra al sujeto al menos dos veces. Las administraciones múltiples pueden estar separadas por varios períodos de tiempo, entre aproximadamente dos a doce semanas, en un ejemplo. En el procedimiento, Las composiciones pueden administrarse al sujeto usando una variedad de rutas, tales como subcutánea, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intranodal, intranasal y oral.

También se desvelan anticuerpos producidos administrando las composiciones reivindicadas a un sujeto. Los anticuerpos pueden usarse en procedimientos para neutralizar el rotavirus administrando los anticuerpos a un animal.

Descripción detallada

15 Definiciones

En el presente documento, "rotavirus" significa cualquiera de los rotavirus de la familia. *Reoviridae*. Los rotavirus pueden infectar a especies humanas o animales (por ejemplo, cualquier rotavirus de los grupos A, B, C, D; E, F y/o G), incluyendo cualquier cepa, serotipo, genotipo y/o reordenación de los mismos. En un ejemplo, el rotavirus infecta a animales bovinos. Las vacunas ejemplares disponibles en el mercado para uso humano que pueden prepararse utilizando los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir Rotarix® (GlaxoSmithKline), RotaTeq® (Merck Sharp & Dohme Corp.) y/o ROTOVAC (Bharat Biotech International). Las vacunas ejemplares disponibles en el mercado para uso humano que pueden prepararse utilizando los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir vacuna para el rotavirus equino (Pfizer), vacuna contra la diarrea por rotavirus de ternera (Inactivate), Rotavec® Corona (Merck Sharp & Dohme Animal Health), Calf-Guard (Pfizer Animal Health) y similares. Los procedimientos descritos en el presente documento también se pueden usar para preparar vacunas para su uso en animales no humanos tales como individuos/poblaciones bovinas, equinas y porcinas.

En el presente documento, "rotavirus activo" o "rotavirus vivo" se refiere a rotavirus que son infecciosos o que pueden multiplicarse para producir virus de progenie.

30 En el presente documento, "rotavirus inactivo" o "rotavirus muerto" significa rotavirus que no son infecciosos o no pueden multiplicarse para producir virus de progenie. Dichos virus en ocasiones pueden denominarse muertos o inactivados. En el presente documento, los rotavirus inactivos se producen a partir de rotavirus activos mediante tratamiento térmico.

35 En el presente documento, "sobrenadante de cultivo celular" o "sobrenadante de cultivo" significa medio que se ha utilizado para apoyar el crecimiento de células cultivadas. En general, en el presente documento, las células se han infectado con rotavirus y el sobrenadante del cultivo celular contiene rotavirus de progenie activo producido por las células infectadas.

40 En el presente documento, "calentando directamente un volumen de sobrenadante de cultivo celular", con respecto a los rotavirus, se refiere generalmente a calentar el sobrenadante del cultivo celular a una temperatura y durante un tiempo para producir la inactivación completa del rotavirus, sin ningún aislamiento o purificación previa del rotavirus del sobrenadante de cultivo celular. Por lo tanto, no se ha producido ningún aislamiento o purificación del rotavirus del sobrenadante del cultivo celular antes de la inactivación térmica del virus en el sobrenadante del cultivo celular.

45 En el presente documento, "rotavirus aislado" significa rotavirus que se ha aislado o purificado a partir del sobrenadante del cultivo celular. En un ejemplo, el rotavirus puede aislarse del sobrenadante del cultivo celular mediante centrifugación a alta velocidad (para sedimentar el virus) y luego puede suspenderse en un tampón acuoso. El tampón acuoso que contiene el rotavirus puede entonces calentarse para inactivar térmicamente el rotavirus en el mismo. Los procedimientos de la invención descritos en el presente documento no requieren del aislamiento del rotavirus del sobrenadante de cultivo celular.

Rotavirus directamente del sobrenadante de cultivo celular

50 En el presente documento se desvelan procedimientos para producir rotavirus inactivados calentando directamente un volumen de sobrenadante de cultivo que contiene rotavirus activo a una temperatura a la que se inactiva el rotavirus (por ejemplo, inactivación térmica) y composiciones que contienen rotavirus inactivados de esta manera. "Calentar directamente un volumen de sobrenadante de cultivo celular que comprende rotavirus vivo" significa típicamente que el sobrenadante de cultivo contiene rotavirus activo (por ejemplo, vivo, infeccioso, capaz de multiplicarse para producir virus de progenie) no se trata o manipula (por ejemplo, sin "pretratamiento"), aparte de recogerse para su procesado, antes de la aplicación de calor para la inactivación del rotavirus. El virus no se aísla o purifica del sobrenadante del cultivo antes del tratamiento térmico. El rotavirus inactivado generalmente se refiere a un virus que no está activo, no

es infeccioso y no puede multiplicarse para producir virus de progenie (por ejemplo, no es productivo). El rotavirus inactivado puede citarse como neutralizado, muerto y/o no productivo. En general, al menos con el fin de ser incluido en una vacuna, es deseable que el rotavirus inactivado retenga la inmunogenicidad (por ejemplo, la capacidad para estimular una respuesta inmunitaria) cuando se administra a un sujeto. En general, los procedimientos descritos en el presente documento dan como resultado la inactivación completa del rotavirus activo contenido en el sobrenadante del cultivo celular; no queda ningún rotavirus activo.

El rotavirus inactivado resultante de los procedimientos desvelados es inmunogénico, lo que significa que su administración a un sujeto estimulará o producirá una respuesta inmunitaria en el sujeto. En general, el rotavirus inactivado usando los procedimientos descritos en el presente documento estimula una mejor respuesta inmunitaria en el sujeto en comparación con la administración de una cantidad equivalente de rotavirus inactivado químicamente, usando beta-propiolactona en un caso (es decir, el rotavirus inactivado térmicamente es más inmunogénico). Por lo tanto, la inmunogenicidad del rotavirus inactivado térmicamente es superior a la inmunogenicidad del rotavirus inactivado químicamente. Por lo tanto, la inmunogenicidad del rotavirus inactivado térmicamente puede ser superior a la inmunogenicidad del rotavirus inactivado químicamente, por ejemplo. Las respuestas inmunitarias en un sujeto pueden medirse utilizando una variedad de procedimientos conocidos en la técnica.

En un ejemplo de calentamiento directo de un volumen de sobrenadante celular (por ejemplo, que también puede denominarse sobrenadante celular cultivado) que comprende rotavirus, el sobrenadante de cultivo se puede filtrar (por ejemplo, utilizando un filtro de jeringa de 70, 1,0 y/o 0,45 μm o similar antes del procesamiento para la inactivación (por ejemplo, calentamiento, etc.) pero, en determinadas realizaciones, esto no se consideraría como tratamiento previo del sobrenadante del cultivo. El filtrado en general puede retirar los residuos celulares, pero no aísla ni purifica el virus del sobrenadante de cultivo. Normalmente, sin embargo, de llevar a cabo una filtración, esta se produce después de al menos una etapa de calentamiento (por ejemplo, como en el ejemplo 1). Los procedimientos de la técnica anterior típicamente requieren algún tipo de etapa de aislamiento, etapa de purificación o de concentración del virus, antes de inactivar el rotavirus. Los procedimientos descritos en el presente documento no requieren normalmente de una etapa de aislamiento antes de la inactivación. Por lo tanto, en los procedimientos desvelados en el presente documento, el rotavirus no necesita estar "aislado" (por ejemplo, separado del entorno en el que se encuentran normalmente, tal como del sobrenadante celular cultivado) antes de la inactivación por calor.

En un ejemplo del procedimiento desvelado, se recolecta medio de células cultivadas que han sido infectadas con rotavirus y, opcionalmente, se retiran los restos celulares (por ejemplo, por filtración o centrifugación a baja velocidad), pero el rotavirus no se aísla o purifica del medio de cultivo celular. Después, se trata el medio que contiene el rotavirus para inactivar térmicamente al rotavirus.

Además, los procedimientos descritos en el presente documento no requieren que el rotavirus esté en ningún tampón diluyente en particular antes de la inactivación. En general, el rotavirus puede estar en cualquier ambiente líquido en el que el virus pueda permanecer activo (por ejemplo, condiciones que no inactivan al virus), antes del tratamiento térmico. Por ejemplo, no es necesario que el sobrenadante de cultivo celular (o sobrenadante celular cultivado) muestre cualquier osmolalidad particular, tipo y/o concentración de sal (por ejemplo, cualquier tipo y/o cantidad particular de una sal de un catión divalente, tal como CaCl_2 , MgCl_2 y/o MgSO_4), azúcar o alcohol de azúcar (por ejemplo, sorbitol, manitol, glicerol, glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa y/o trehalosa) para que el sobrenadante sirva como material de partida adecuado (aunque pueden estar presentes uno o más de estos componentes, dependiendo del tipo de medio de cultivo celular que se use). Los procedimientos descritos en el presente documento proporcionan la inactivación del rotavirus sin preparar primero el rotavirus en un tampón diluyente que tiene una osmolalidad, sal y/o concentración de sal, azúcar o alcohol de azúcar predefinidos en el mismo (aunque, nuevamente, pueden estar presentes uno o más de estos componentes, dependiendo del tipo de medio de cultivo celular que se esté usando). Por ejemplo, un tampón diluyente tal como un tampón acuoso como un tampón fosfato, tampón Tris, tampón citrato, tampón borato, tampón de glicina, tampón acetato, tampón succinato, tampón HEPES, tampón maleato, tampón PIPES, tampón MOPS, tampón MOPSO, tampón de histidina y/o tampón de NaHCO_3 , con o sin un pH particular (por ejemplo, pH 5-9), no es necesario, pero puede estar presente, antes de la inactivación por calor. Además, estos procedimientos no requieren la presencia o ausencia de ningún aminoácido, vitamina y/o similares particulares o cualquier cantidad particular de los mismos. En algunas realizaciones, por lo tanto, los procedimientos descritos en el presente documento permiten calentar directamente un volumen de cualquier tipo de sobrenadante de cultivo celular que comprenda rotavirus vivo (por ejemplo, rotavirus bovino) sin definir particularmente ninguna osmolalidad, sal o concentración de sal, azúcar y/o alcohol de azúcar, tampón, aminoácido y/o vitamina, pH que se muestre y/o esté presente en el sobrenadante de cultivo celular. Por lo tanto, en diversas realizaciones, el rotavirus que se va a inactivar puede estar contenido o estar presente en cualquier medio de cultivo celular adecuado para cultivar células de mamíferos (por ejemplo, especialmente aquellas que soportan la infección y la producción de rotavirus (por ejemplo, rotavirus bovino) por dichas células).

En un ejemplo del procedimiento desvelado, el sobrenadante celular cultivado que contiene el rotavirus que se va a inactivar térmicamente no tiene uno o más de una osmolalidad en el intervalo de 200-500 mOsm, una concentración de una sal de un catión divalente en el intervalo de aproximadamente 1 mM a 15 mM y un azúcar y/o alcohol de azúcar en el intervalo de aproximadamente el 1 al 20 % p/v. Los ejemplos de sales de cationes divalentes pueden incluir, pero sin limitación, CaCl_2 , MgCl_2 y MgSO_4 . Los azúcares pueden ser monosacáridos o disacáridos. Los ejemplos de azúcares y alcoholes de azúcar pueden incluir, pero sin limitación, sorbitol, manitol, glicerol, glucosa, sacarosa, lactosa,

maltosa y trehalosa.

Por lo tanto, una ventaja de los procedimientos descritos en el presente documento es que el experto en la materia puede simplemente obtener el sobrenadante del cultivo celular y comenzar a procesarlo sin ningún tratamiento inicial y/o etapas de purificación previas. Dichas etapas pueden, por supuesto, realizarse después y/o entre las etapas de inactivación por calor para proporcionar finalmente rotavirus aislados inactivados y/o antígenos inmunogénicos de los mismos.

Inactivación térmica de rotavirus

La inactivación se puede lograr obteniendo un sobrenadante de cultivo celular que comprende un rotavirus activo y calentándolo a una temperatura a la que el rotavirus se vuelve inactivo. Un rotavirus vivo, infeccioso y/o productivamente infeccioso es típicamente uno que es capaz de infectar una célula y producir progenie en la misma. Un rotavirus no infeccioso y/o no productivamente infeccioso es un rotavirus que no es capaz de infectar a una célula y/o no es capaz de producir progenie en la misma. En algunas realizaciones, la temperatura hasta y/o a la cual se calienta el sobrenadante del cultivo celular es una temperatura a la que se inactiva el rotavirus (la "temperatura de inactivación", por ejemplo, aproximadamente 70 °C, tal como, por ejemplo, 65 °C, 67 °C, 69 °C, 70 °C, 72,5 °C, 75 °C, 77,5 °C u 80 °C). La etapa de calentamiento tiene lugar típicamente dentro de un recipiente (por ejemplo, tubo o matraz). Después de calentar, el sobrenadante del cultivo celular puede transferirse a un nuevo recipiente. En algunas realizaciones, se utilizan múltiples etapas de calentamiento. En dichas realizaciones, la primera etapa de calentamiento puede denominarse la etapa de calentamiento inicial. La etapa de calentamiento inicial puede, opcionalmente, ir seguida de una etapa de congelación en la que se congela el sobrenadante del cultivo celular a una temperatura adecuada (por ejemplo, aproximadamente -80 °C) durante un periodo de tiempo adecuado (por ejemplo, de una hora a una noche (por ejemplo, ocho horas) o más). La etapa de congelación opcional se realiza típicamente en un nuevo recipiente. Esta etapa de congelación puede ir seguida de una segunda etapa de calentamiento, por ejemplo, utilizando aproximadamente las mismas condiciones que la etapa de calentamiento inicial (por ejemplo, la temperatura de inactivación) para producir una preparación de rotavirus inactivado. La preparación de rotavirus inactivado se puede congelar hasta que se necesite (por ejemplo, para su prueba y/o uso en una vacuna).

En algunas realizaciones, la etapa de calentamiento inicial puede ser la única etapa de calentamiento requerida para inactivar el rotavirus (por ejemplo, la segunda etapa de calentamiento puede no ser necesaria). En dichas realizaciones, la etapa de calentamiento inicial se puede llevar a cabo elevando la temperatura de todo el volumen de sobrenadante del cultivo a la temperatura de inactivación e inmediatamente llevando a cabo la siguiente etapa (por ejemplo, congelación). Por lo tanto, en dichas realizaciones, el sobrenadante del cultivo celular se procesa adicionalmente (por ejemplo, se llevan a cabo las etapas siguientes) tan pronto como el volumen completo alcanza la temperatura de inactivación. En otras realizaciones, el sobrenadante del cultivo se puede mantener a una temperatura de inactivación durante un tiempo adecuado (por ejemplo, aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 o 150 minutos) antes del procesamiento adicional (por ejemplo, llevar a cabo las etapas posteriores)). La segunda etapa de calentamiento puede llevarse a cabo como se describe para la etapa de calentamiento inicial (por ejemplo, se procesa adicionalmente tan pronto como el volumen completo alcanza la temperatura de inactivación o después de que la temperatura de inactivación se mantenga durante un periodo de tiempo adecuado). La etapa de congelación típicamente separa las etapas de calentamiento primera y segunda. La congelación también se puede usar para el almacenamiento del sobrenadante de cultivo que se ha calentado de manera que el rotavirus en él se inactiva.

En determinadas realizaciones, el procedimiento puede incluir elevar la temperatura del sobrenadante de cultivo celular a una temperatura adecuada (por ejemplo, aproximadamente 70 °C) durante un periodo de tiempo adecuado (por ejemplo, aproximadamente dos horas), opcionalmente, posteriormente, congelar el sobrenadante del cultivo celular después de calentar durante un periodo de tiempo adecuado (por ejemplo, aproximadamente ocho horas) y luego opcionalmente recalentar el sobrenadante del cultivo celular a una temperatura adecuada (por ejemplo, aproximadamente 70 °C) durante un periodo de tiempo adecuado (por ejemplo, unas dos horas). Después, puede filtrarse el sobrenadante de cultivo a través de un filtro adecuado (por ejemplo, un filtro de 10 o 70 µm).

Pruebas de rotavirus calentados para asegurar la inactivación

Normalmente, las preparaciones de rotavirus que se han tratado para inactivar el virus, se prueban para asegurarse de que no haya presencia del virus activo en la preparación (es decir, para garantizar que la preparación contenga solo virus inactivados). Las pruebas utilizadas generalmente detectarán virus activos (por ejemplo, vivos, infecciosos, capaces de multiplicarse para producir virus de progenie). En un ejemplo de una prueba, las preparaciones o una parte de las preparaciones que se han tratado para inactivar el virus, se usan para infectar cualquier célula que sea permisiva para la infección por rotavirus. La presencia de virus activo en la preparación puede determinarse, por ejemplo, fijando las células y tiñéndolas con un reactivo para identificar el rotavirus en las células, como se ha descrito anteriormente. Otros procedimientos de detección de virus activos pueden ser mediante el uso de ensayos de centros infecciosos o ensayos para determinar si las células producen virus de progenie. Se puede usar una variedad de procedimientos.

Por ejemplo, las células a partir de las cuales se puede obtener el sobrenadante del cultivo celular pueden incluir cualquier célula permisiva para la infección y la replicación de rotavirus (por ejemplo, MA104, MDBK, VERO y otras

células). Las células pueden crecer, por ejemplo, sobre placas, en matraces rodantes, en biorreactores o usando cualquier medio conocido en la técnica. Para producir un sobrenadante de cultivo celular adecuado, las células pueden cultivarse en presencia de una cantidad adecuada (por ejemplo, MOI de 0,003) de rotavirus bovino vivo durante un tiempo adecuado (por ejemplo, dos horas) en condiciones adecuadas (por ejemplo, 37 °C, CO₂ al 5 %). Después, puede filtrarse cada muestra (por ejemplo, usando un filtro de jeringa (por ejemplo, 1,0 µm)) y depositarse en un nuevo recipiente. Después puede tratarse la muestra mediante, por ejemplo, calor como se describe en el presente documento y opcionalmente transferirse a un nuevo vaso. Ya que las muestras normalmente se congelan después del tratamiento, puede descongelarse cada una junto con muestras no inactivadas (por ejemplo, muestras de control positivo). Las muestras de ensayo pueden entonces concentrarse (por ejemplo, 10X). Después, pueden prepararse diluciones en serie (por ejemplo, diluciones en serie de factor diez) de cada muestra de ensayo. Después, pueden lavarse células de ensayo establecidas (cultivo de tres días, monocapa, confluencia del 100 % (por ejemplo, células MA104) y el medio se reemplaza con un medio adecuado (por ejemplo, DME al 0 % (HyClone)). Luego se pueden agregar muestras de prueba a cada pocillo/biorreactor (por ejemplo, Fibra hueca de GE, RFP-50-C-3MA) que contiene celdas de ensayo, seguido de un período de incubación adecuado (por ejemplo, dos horas a 37 °C, CO₂ al 5 %) para permitir la adsorción del rotavirus a las células. Después, pueden lavarse las células y volver a alimentarse con medio (por ejemplo, DME (HyClone) que contiene 20 ml/l de L-glutamina (ASL 31012) y 2 ml/l de tripsina). Después de un período de tiempo adecuado (por ejemplo, tres días), las células pueden fijarse (por ejemplo, utilizando acetona al 80 %) y teñirse con un reactivo para identificar rotavirus (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal contra rotavirus bovino seguido de un reactivo de detección (por ejemplo, un anticuerpo secundario)) y se analiza la presencia de anticuerpos anti-rotavirus en las células. Normalmente, el rotavirus no se detectaría en ningún control negativo o en muestras en las que se haya inactivado el rotavirus. En cambio, las muestras de control positivo y aquellas en las que el rotavirus no haya sido inactivado se teñirían positivamente.

Usos de rotavirus inactivados térmicamente

Los procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse para producir vacunas para su administración a un sujeto. Como se usa en el presente documento, "un sujeto" o "un hospedador" normalmente significa un individuo. Un sujeto u hospedador puede incluir animales domesticados, tales como gatos y perros, ganado (por ejemplo, vacas, caballos, cerdos, ovejas y cabras), animales de laboratorio (por ejemplo, ratones, conejos, ratas, cobayas) y aves. En algunas realizaciones, el sujeto u hospedador puede ser un mamífero, tal como un primate o un ser humano.

Por lo tanto, la presente divulgación también describe procedimientos para estimular una respuesta inmunitaria específica para el rotavirus en un sujeto y/o inmunizar a un sujeto contra el rotavirus mediante la administración al mismo de una composición que comprende un rotavirus inactivado como se describe en el presente documento. La presente divulgación también describe los rotavirus inactivados y composiciones que comprenden los rotavirus que se usan en la administración. Dichos procedimientos y composiciones pueden incluir la combinación de dichos rotavirus inactivados (o preparación que comprende rotavirus inactivado) con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para producir una formulación adecuada para su administración. Pueden describirse vehículos farmacéuticos ejemplares adecuados y sus formulaciones en, por ejemplo, Remington's: The Science and Practice of Pharmacy, 21^a Edición, David B. Troy, ed., Lippicott Williams & Wilkins (2005). Se puede usar una cantidad adecuada de una sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para hacer que la formulación sea isotónica. Los ejemplos de los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, agua estéril, solución salina, soluciones tamponadas, tales como solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es generalmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 o de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir portadores, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes tensioactivos, adyuvantes, inmunoestimulantes. Será evidente para los expertos en la materia que ciertos portadores pueden ser más preferibles dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración y la concentración de la composición que se administra.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más principios activos, tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios y anestésicos. Además de rotavirus inactivado, las composiciones farmacéuticas pueden incluir antígenos adicionales de otros agentes. Dichas composiciones, que contienen antígenos de múltiples agentes, pueden denominarse vacunas de combinación.

También se pueden incluir adyuvantes para estimular o mejorar la respuesta inmunitaria. Los ejemplos no limitantes de clases adecuadas de adyuvantes incluyen los del tipo de gel (es decir, hidróxido/fosfato de aluminio ("adyuvantes de alumbre")), fosfato de calcio, de origen microbiano (dipéptido de muramilo (MDP)), exotoxinas bacterianas (toxina del cólera (TC), subunidad B de la toxina del cólera nativa (CTB), Toxina lábil de *E. coli* (LT), toxina tosferínica (PT), oligonucleótidos de CpG, secuencias BCG, toxide tetánico, monofosforil lípido A (MPLA) de, por ejemplo, *E. coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium*, o *Shigella exseri*), adyuvantes en partículas (microesferas de polímero biodegradables), complejos inmunoestimulantes (ISCOM), adyuvantes a base de emulsión de aceite y tensioactivo (adyuvante incompleto de Freund (FIA), emulsiones microfluidizadas (MF59, SAF), saponinas (QS-21), Emulsigen® (por ejemplo, Emulsigen® D)), sintéticos (derivados del péptido de muramilo (murabutida, Treoni-MDP), copolímeros de bloque no iónicos (L121), polifosfazeno (PCCP), polinucleótidos sintéticos (poli A:U, poli I:C), derivados de talidomida (CC-4407/ACTIMID), ligando de RH3 o microesferas de polilactida glicolida (PLGA), lípido A monofosforilo 3-des-O-acilado (3D-MPL), entre otros. También son adecuados fragmentos, homólogos, derivados y fusiones con cualquiera de estas toxinas, a condición de que conserven actividad adyuvante.

Una composición inmunológica puede ser, por ejemplo, una composición y/o formulación farmacéutica que, tras su administración a un hospedador (por ejemplo, un animal), induce o mejora una respuesta inmunitaria dirigida contra antígenos de rotavirus (por ejemplo, inmunógeno) contenidos en la composición (por ejemplo, rotavirus inactivado). Dichas respuestas pueden incluir la generación de anticuerpos (por ejemplo, mediante la estimulación de linfocitos B) o una respuesta basada en linfocitos T (por ejemplo, una respuesta citolítica), como se ha descrito anteriormente, que puede ser protectora o neutralizante (por ejemplo, o no). Una respuesta inmunitaria protectora o neutralizante puede ser una que sea perjudicial para el rotavirus (o las células que lo contienen) y beneficiosa para el hospedador (por ejemplo, reduciendo o previniendo la infección). Como se usa en el presente documento, los anticuerpos protectores o neutralizantes y/o las respuestas celulares pueden ser reactivos con el rotavirus preparado como se describe en el presente documento y/o una célula que los alberga. Esos anticuerpos y/o respuestas celulares pueden reducir o inhibir la severidad, el tiempo y/o la letalidad de la infección por rotavirus cuando se prueba en animales. Una composición inmunológica puede ser una que, tras su administración a un hospedador, da como resultado una respuesta inmunitaria terapéutica (por ejemplo, administrada típicamente durante una infección activa) y/o protectora (por ejemplo, administrada típicamente antes o después de una infección activa) y/o neutralizante. Dicha composición inmunológica también puede considerarse una vacuna.

Por lo tanto, también se desvelan procedimientos para tratar y/o prevenir la infección por rotavirus. También se desvelan procedimientos para tratar una o más enfermedades causadas por lo que involucran rotavirus en un mamífero hospedador que comprenden administrar al mamífero al menos una o más dosis efectivas de rotavirus inactivado preparadas como se describe en el presente documento (por ejemplo, y/o una o más composiciones y/o formulaciones que comprenden el mismo). En general, la administración del rotavirus inactivado a un sujeto estimula una respuesta inmunitaria específica para el rotavirus en el sujeto. El rotavirus inactivado puede administrarse en una cantidad de dosificación adecuada. El rotavirus inactivado se puede administrar una vez o más; en los casos en los que se produce la administración más de una vez, cada una puede ser con dosis iguales o diferentes. En determinadas realizaciones, el rotavirus inactivado y/o los antígenos del mismo pueden administrarse al sujeto por cualquier vía y en una cantidad de dosificación adecuada aproximadamente una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más veces. Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intranodal, Intranasal y/u oral. Las dosis también pueden separarse en el tiempo entre sí por intervalos iguales o diferentes. Por ejemplo, las dosis se pueden estar separadas por aproximadamente 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 o 96 horas, una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 1,5 años, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años o cualquier período de tiempo antes, después y/o entre cualquiera de estos períodos de tiempo. En algunos ejemplos, el rotavirus inactivado se puede administrar solo o junto con otros agentes (por ejemplo, antibióticos, otras vacunas, nutrientes, etc.). Dichos otros agentes pueden administrarse de forma simultánea o en un momento y/o frecuencia diferentes. Otros ejemplos de dichos procedimientos también pueden ser adecuados, como puede comprobarse fácilmente por un experto en la materia.

También se desvelan procedimientos para provocar la producción de anticuerpos, que pueden ser protectores y/o neutralizantes y/o pueden ser reactivos contra el rotavirus inactivado preparado como se describe en el presente documento. Las composiciones y procedimientos para usar dichos anticuerpos también se describen en el presente documento. Los procedimientos de preparación y utilización de diversos tipos de anticuerpos son bien conocidos por los expertos en la materia y serían adecuados para su uso (véase, por ejemplo, Harlow, y col. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Harlow, y col. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Portable Protocol n.º 1, 1998; Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975)); Jones y col. *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col. *Nature*, 332: 323-329 (1988); Presta (Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992); Verhoeven y col. (*Science*, 239:1534-1536 (1988); Hoogenboom y col., *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991); Cole y col., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner y col., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991); Marks y col., *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg y col., *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368 812-13 (1994); Fishwild y col., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995); así como las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.816.567; 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y, 5.661.016). En ciertas aplicaciones, los anticuerpos pueden estar contenidos en el sobrenadante de hibridoma o ascitis y utilizarse directamente como tal o después de la concentración utilizando técnicas convencionales. En otras aplicaciones, los anticuerpos pueden purificarse adicionalmente usando, por ejemplo, fraccionamiento salino y cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de afinidad usando ligandos de proteína A, proteína G, proteína A/G y/o proteína L acoplados covalentemente a un soporte sólido, tal como perlas de agarosa o combinaciones de estas técnicas. Los anticuerpos pueden almacenarse en cualquier formato adecuado, incluyendo como una preparación congelada (por ejemplo, a aproximadamente -20 °C o -70 °C), en forma liofilizada o en condiciones de refrigeración normales (por ejemplo, aproximadamente 4 °C). Cuando se almacena en forma líquida, se prefiere que la utilización de un tampón adecuado, tal como solución salina tamponada con Tris (TBS) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los anticuerpos y sus derivados pueden incorporarse en composiciones descritas en el presente documento para su uso *in vitro* o *in vivo*. En algunos ejemplos, el anticuerpo, los anticuerpos y/o la mezcla de anticuerpos pueden ser reactivos con el rotavirus y podrían usarse para prevenir y/o tratar la infección por rotavirus (por ejemplo, mediante inmunización pasiva). Otros procedimientos para fabricar y usar anticuerpos (por ejemplo, para detectar rotavirus) están disponibles para un experto en la materia y también pueden ser adecuados para su uso, como lo podría determinar fácilmente un experto en la materia.

La utilidad (por ejemplo, inmunogenicidad) de cualquiera de los materiales descritos en el presente documento puede analizarse mediante cualquiera de los diversos procedimientos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo los descritos en el presente documento (por ejemplo, ensayo de neutralización en suero de virus utilizando células de mamífero). Puede usarse uno o más de los ensayos descritos en el presente documento o cualesquiera uno o más ensayos adecuados para determinar la idoneidad de cualquiera de los materiales descritos en el presente documento para un fin previsto. Debe entenderse que estos procedimientos son ejemplares y no limitativos; también pueden ser adecuados otros ensayos. En determinadas realizaciones, se prefiere que una composición y/o formulación que comprenda un rotavirus inactivado como se describe en el presente documento muestre propiedades inmunogénicas (por ejemplo, induciendo una respuesta inmunitaria detectable y/o neutralizante y/o protectora después de la administración a un hospedador). La presencia de una respuesta inmunitaria neutralizante y/o protectora se puede demostrar demostrando que está afectada la infección por un rotavirus (por ejemplo, disminuida) en individuos (por ejemplo, un ser humano u otro animal) a los que se ha administrado el rotavirus inactivado, en comparación con los sujetos a quienes no se les han administrado los materiales. Los modelos animales adecuados que pueden usarse para efectuar dicha determinación pueden incluir, por ejemplo, los conejos y/o el ganado como se describe en el presente documento en los ejemplos. Por ejemplo, puede administrarse a uno o más animales de ensayo (por ejemplo, conejos, ganado o un modelo similar) (por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular, intradérmica, intranasal) un rotavirus inactivado preparado como se describe en el presente documento y después, después de un tiempo adecuado (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 semanas), se ensayarán para identificar el producto de anticuerpos anti-rotavirus y/o células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos T) y/o exponiéndose al rotavirus vivo para determinar si los animales están protegidos contra la infección y/o si la gravedad de la infección disminuye. Puede monitorizarse la función inmunitaria de los animales (por ejemplo, actividad de linfocitos T, producción de anticuerpo) después de la administración y/o la exposición usando técnicas convencionales (por ejemplo, ensayo de neutralización de virus, ELISA). Los sueros pueden analizarse para determinar la respuesta total de anticuerpos o la expresión de subtipos particulares. Pueden efectuarse análisis estadísticos (por ejemplo, prueba exacta de Fisher, prueba de Wilcoxon, pruebas de Mann-Whitney u otras pruebas) en los datos resultantes. Por lo tanto, puede usarse el rotavirus inactivado y/o composiciones y/o formulaciones que comprenden al mismo, como se describen en el presente documento (por ejemplo, composiciones inmunogénicas) para prevenir y/o tratar enfermedades causadas por rotavirus.

Esta divulgación proporciona uno o más procedimientos para producir rotavirus inactivado calentando directamente un volumen de sobrenadante de cultivo celular que comprende rotavirus vivo a una temperatura a la que el rotavirus se inactiva. El sobrenadante del cultivo celular puede incluir o exhibir o carecer de, cualquier tampón osmolalidad, concentración de sal, azúcar, alcohol de azúcar, pH, aminoácido y/o vitamina particulares. No es necesario que el sobrenadante de cultivo celular muestre un tampón, osmolalidad, concentración de sal, azúcar, alcohol de azúcar, pH, aminoácido y/o vitamina predefinidos para que sea adecuado para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento. El sobrenadante del cultivo celular comprende y/o procede normalmente de un medio de cultivo celular que es permisivo para producir rotavirus bovino vivo a partir de células de mamífero. Como se ha explicado anteriormente, "calentar directamente un volumen de sobrenadante de cultivo celular que comprende rotavirus vivo" típicamente significa que el sobrenadante de cultivo que comprende rotavirus activo (por ejemplo, vivo) no se trata (por ejemplo, sin "tratamiento previo"), aparte de ser recolectado para su procesamiento o al menos de cualquier manera que pueda dar como resultado la inactivación del rotavirus, antes de la aplicación de calor para la inactivación del rotavirus. En algunos procedimientos, el rotavirus inactivado se aísla del sobrenadante del cultivo celular después de la inactivación. En algunas realizaciones, sustancialmente todo el volumen (por ejemplo, 70, 80, 90, 95 o 99 %) del sobrenadante de cultivo se puede calentar a la temperatura y, en algunos, se calienta el volumen íntegro del sobrenadante de cultivo a la temperatura. La temperatura es de al menos aproximadamente 60 °C a aproximadamente 80 °C (por ejemplo, aproximadamente cualquiera de 60 °C, 61 °C, 62 °C, 63 °C, 64 °C, 65 °C, 66 °C, 67 °C, 68 °C, 69 °C, 70 °C, 71 °C, 72 °C, 73 °C, 74 °C, 75 °C, 76 °C, 77 °C, 78 °C, 79 °C u 80 °C). En algunas realizaciones, la temperatura del sobrenadante del cultivo (por ejemplo, sustancialmente todo el volumen o todo el volumen) se mantiene durante al menos aproximadamente 15 minutos hasta al menos aproximadamente cualquiera de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce horas. Ciertas realizaciones comprenden además congelar el sobrenadante de cultivo después del calentamiento, aunque esto es opcional. Ciertas realizaciones comprenden además calentar posteriormente el sobrenadante del cultivo al menos una vez más (por ejemplo, después de una etapa inicial de calentamiento y/o congelación). La temperatura de los calentamientos inicial y posteriores puede ser aproximadamente la misma. En algunas realizaciones, el pH del sobrenadante del cultivo es de $7,6 \pm 0,1$. También se desvelan composiciones que comprenden antígenos de rotavirus (por ejemplo, rotavirus bovino) inactivados y/o rotavirus (por ejemplo, rotavirus bovino) preparados mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. También se desvelan procedimientos para inmunizar a un animal con dichas composiciones. En algunos ejemplos, el animal es bovino. En algunos ejemplos, la composición puede administrarse al animal al menos dos veces y dichas administraciones pueden estar separadas en el tiempo (por ejemplo, aproximadamente cualquiera de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once y/o doce semanas). Las composiciones pueden administrarse al animal por cualquier vía adecuada, tal como subcutánea, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intranodal, intranasal y/u oral. También se desvelan procedimientos para producir anticuerpos, un anticuerpo o anticuerpos producidos mediante dichos procedimientos (por ejemplo, que comprenden además aislar el anticuerpo o anticuerpos) y composiciones que comprenden dichos anticuerpos. También se desvelan procedimientos para usar dichos anticuerpos (por ejemplo, procedimientos para neutralizar el rotavirus (por ejemplo, el rotavirus bovino) *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, administrando dicho anticuerpo o anticuerpos a un animal

(por ejemplo, bovino).

El término "alrededor de", "aproximadamente" y similares, cuando precede a una lista de valores numéricos o un intervalo, se refiere a cada valor individual en la lista o intervalo de manera independiente, como si cada valor en la lista o intervalo estuviese precedido por dicho término. El término significa que los valores a los que se refiere son exactamente, próximos o similares a los mismos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, "alrededor de", "aproximadamente" un valor particular puede indicar un valor del 99 %, 95 % o 90 % de dicho valor. A modo de ejemplo, en los casos en los que el volumen del sobrenadante de cultivo es 1l, "aproximadamente" 1l puede ser igual a 0,99, 0,95 o 0,9 l. Como otro ejemplo, en los casos en los que la temperatura es 70 °C, "alrededor de", "aproximadamente" 70 °C puede ser igual a 69 °C, 66 °C o 63 °C. Debe entenderse que estos son meramente ejemplos.

Opcional u opcionalmente significa que el evento o circunstancia que se describe posteriormente puede o no producirse y que la descripción incluye casos en los que se produce el evento o circunstancia y casos en los que no se produce. Por ejemplo, la frase "opcionalmente, la composición puede comprender una combinación" significa que la composición puede comprender una combinación de diferentes moléculas o puede no incluir una combinación, de tal forma que la descripción incluye tanto la combinación como la ausencia de la combinación (es decir, de miembros individuales de la combinación).

Los intervalos pueden expresarse en el presente documento como de aproximadamente un valor particular y/o a aproximadamente otro valor particular. Cuando se expresa dicho intervalo, otro aspecto incluye desde el un valor particular y/o al otro valor particular. De forma similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente alrededor de, aproximadamente, se entenderá que el valor particular forma otro aspecto. Se comprenderá además que los extremos de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro extremo como independientemente del otro extremo. Se pretende que los intervalos (por ejemplo, 90-100 %) incluyan el intervalo *per se*, así como cada valor independiente dentro del intervalo, como si cada valor se listase de manera individual.

Cuando se usan en el presente documento los términos "previene", "prevenir" y "prevención" en relación con un tratamiento dado para una afección dada (por ejemplo, prevenir una infección), se pretende transmitir que el paciente tratado no desarrolla en absoluto un nivel clínicamente observable de la afección o lo desarrolla más lentamente y/o en menor grado de lo que él/ella habría tenido sin el tratamiento. Estos términos no se limitan únicamente a una situación en la que el paciente no experimenta aspecto alguno de la afección. Por ejemplo, se dirá que un tratamiento ha prevenido la afección si se administra durante la exposición de un paciente a un estímulo que se esperaría que produjera una manifestación dada de la afección y da como resultado que los pacientes experimenten menos síntomas y/o más leves de la afección de lo que se esperaría de otro modo. Un tratamiento puede "prevenir" una infección haciendo que el paciente muestre solo síntomas manifiestos leves de la infección; esto no implica que no haya penetrado ninguna célula del microorganismo infectante.

De forma similar, reducir, reduciendo y reducción, como se usan en el presente documento en relación con el riesgo de infección con un tratamiento dado (por ejemplo, reducir el riesgo de una infección por rotavirus) típicamente se refiere a un sujeto que desarrolla una infección más lentamente o en menor grado en comparación con un control o nivel basal de desarrollar una infección en ausencia de un tratamiento (por ejemplo, administración o vacunación utilizando los polipéptidos desvelados). Una reducción en el riesgo de infección puede dar como resultado que el paciente muestre solo síntomas manifiestos leves de la infección o síntomas retardados de la infección; esto no implica que no haya penetrado ninguna célula del microorganismo infectante.

Ciertas realizaciones se describen con más detalle en los siguientes ejemplos. Estas realizaciones se proporcionan solo como ejemplos y no pretenden limitar de modo alguno el alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1: Inactivación por calor del rotavirus

Para preparar el rotavirus, se cultivaron MA104 (células de riñón de mono) en biorreactores utilizando microportadores Cytodex-3 a 4,0 g/l. Se sembraron en los biorreactores $1,5 \times 10^5$ células/ml a un volumen de trabajo de 15 l. Después de tres a siete días o cuando las perlas microtransportadoras alcanzaron más del 95 % de confluencia, cada biorreactor se preparó para la infección por rotavirus bovino (RVB) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,003 (determinada llevando a cabo un recuento de núcleos). Antes de infectar las células, se incubó el RVB a 37 °C durante una a tres horas en medio DMEM fresco (14,85 l) que incluía tripsina de tipo IX (22,5 ml de solución madre de tripsina de tipo IX, que también incluye L-glutamina y gentamicina/anfotericina B) para producir medios de RVB. Antes de la adición de medios de RVB al biorreactor, se dejaron reposar las perlas microtransportadoras durante un mínimo de cinco minutos y se retiró aproximadamente un 90 % del medio agotado. Después, se bombeó medio fresco calentado (12,5 l de medio DMEM que incluía tripsina de tipo IX) al interior de los biorreactores. Después, se añadieron dos litros y medio (2,5 l) de medio de RVB a los mismos. Una vez que se completó la infección (por ejemplo, dentro de las 24 horas después de que el PO₂ se desviase por encima del punto de referencia del 20 % sin recuperación), se llevó a cabo agitación a aproximadamente 75 rpm durante aproximadamente 15 a 20 minutos antes de la recogida.

El virus recogido se usó posteriormente para estudios de inactivación por calor. En estos estudios, el material recogido se calentó a 70 °C y se retiraron muestras de 10 ml cada 15 minutos a lo largo de ocho horas. Después de cuatro horas, el material calentado se transfirió a otro recipiente para completar la segunda incubación de cuatro horas a 70 °C. Cada muestra se filtró a través de un filtro de jeringa de 1,0 µm y se depositó en un nuevo recipiente. Después, se colocó cada muestra filtrada en un baño de agua en circulación a 70 °C durante dos horas (con agitación dos veces durante el período de dos horas) y se transfirió a un nuevo recipiente (un vial estéril de 10 ml). En estos experimentos, cada muestra se colocó en un congelador a -80 °C durante una noche. Después, las muestras se colocaron en un baño de agua en circulación a 70 °C durante dos horas (con agitación dos veces durante el período de dos horas) y se transfirieron a un nuevo recipiente. Después, se almacenaron estas muestras en un congelador a -80 °C hasta el ensayo.

El RVB también se inactivó químicamente utilizando beta-propiolactona (BPL). Se prepararon aproximadamente 500 ml de sobrenadante de cultivo celular de MA104 infectadas con RVB. En este procedimiento, se agregaron dos ml de solución BPL (10 %) a 18 ml de agua estéril enfriada por cada litro de sobrenadante de cultivo celular que contiene rotavirus para inactivarlo. La mezcla se mezcló luego a 4 °C durante un máximo de 24 horas. La mezcla se almacenó luego a 4 °C (típicamente proporcionando un tiempo total de inactivación de menos de 52 horas). Se retiraron de uno a dos ml para realizar pruebas para determinar si el rotavirus se había inactivado usando los mismos procedimientos utilizados o las muestras inactivadas por calor.

Para probar las muestras, se descongeló cada una junto con muestras no inactivadas (por ejemplo, muestras de control positivo). Después, se prepararon diluciones en serie de factor diez de cada muestra. Las células de ensayo MA104 establecidas (tres días de cultivo, monocapa, confluencia del 100 %) se lavaron y se reemplazó el medio con DME (HyClone) que no contenía suero. Después se añadió un ml de cada muestra de ensayo a cada pocillo que contenía células de ensayo, seguido de un período de incubación de dos horas (37 °C, CO₂ al 5 %) para permitir la adsorción. Después, se agregaron dos ml de medio DME de realimentación que no contenía suero y que contenía 20 ml/l de L-glutamina (ASL 31012) y 2 ml/l de tripsina. Después de tres días de cultivo, las células se fijaron usando acetona al 80 % y se tiñeron con un anticuerpo monoclonal específico para RVB (82x100 NAH diluido a 1:1000 en PBS durante dos horas a 37 °C, se tiñeron con anticuerpo de cabra anti-ratón-FITC, n.º 55493, diluido a 1:1000 en PBS durante dos horas a 37 °C) y se analizaron detectando la fluorescencia. El rotavirus no se detectó en ninguno de los pocillos de control negativo y rara vez se detectó en los pocillos que contenían diluciones de las muestras inactivadas por calor. Los pocillos de las muestras de control positivo fueron todos positivos para rotavirus. Solo se usó virus completamente inactivado en experimentos adicionales.

En otra prueba, se prepararon cultivos de uno a dos días de células MA104 (≥70 % de confluencia) como se describe para la prueba anterior (por ejemplo, medios de cultivo retirados y reemplazados con DME que no contenía suero). Las muestras de ensayo de rotavirus se prepararon calentando el sobrenadante del cultivo que contenía rotavirus vivo a 70 °C durante una o dos horas, seguido de congelación a -80 °C hasta la prueba de inactivación (por ejemplo, un procedimiento de inactivación en una sola etapa). Otras muestras de ensayo de rotavirus se prepararon calentando el sobrenadante del cultivo que contenía rotavirus vivo a 70 °C durante una o dos horas, seguido de congelación a -80 °C, seguido de una segunda etapa de inactivación por calor a 70 °C durante una o dos horas y congelación a -80 °C hasta la prueba de inactivación (por ejemplo, procedimiento de inactivación en dos etapas). Las células MA104 de ensayo se incubaron posteriormente con las diversas muestras de ensayo de rotavirus durante un mínimo de tres días y se observaron para determinar el efecto citopático (CPE). No se observó CPE en ninguna de las muestras de control negativo o inactivadas por calor (una hora, dos horas, procedimiento de inactivación de una o dos etapas), indicando que cada procedimiento inactivó completamente el rotavirus presente en el medio de cultivo celular. En cambio, se observó CPE en todas las muestras de control positivo.

Ejemplo 2: Inmunogenicidad del rotavirus inactivado por calor

A. estudios en conejos

Este estudio comparó la respuesta serológica de conejos (no expuestos previamente a antígenos de rotavirus bovinos (BR)) inmunizados con BR preparado utilizando el protocolo de inactivación de beta-propiolactona (BPL-BR) convencional o los procedimientos de inactivación por calor descritos en el ejemplo 1 (denominado "HI-BR"). Se probaron seis vacunas adyuvadas con Emulsigen (Emulsigen D al 30 %). Antes de administrar los antígenos, se extrajo sangre de los conejos para obtener la media geométrica del título (GMT) basal. Los conejos recibieron una dosis de cebado subcutáneo de 1,25 ml en el día 0(± 2) y una dosis de refuerzo subcutánea en el día 20(± 2). Los grupos de tratamiento se organizaron como se muestra en la **tabla 1**:

Tabla 1

Grupo	Antígeno	Numero de conejos
1	3X HI-BR*	10
2	1X HI-BR	10
3	0,5X HI-BR	10
4	3X BPL-BR	10

5	1X BPL-BR	10
6	0,5X BPL-BR	10
*X=dosis convencional de RVB en producto comercial.		

El suero de ensayo se obtuvo el día 35 (por ejemplo, aproximadamente 14 días después de la vacunación (DPV)). Se analizó el GMT del día 35 en suero para determinar el contenido de anticuerpos anti-rotavirus utilizando un ensayo de neutralización de virus (VNA) y ELISA. El VNA se llevó a cabo mediante la prueba de inactivación por calor de muestras de suero en un baño de agua a 56-58 °C durante 30-60 minutos. Las células MA104 (monocapas de cuatro a seis días) se pusieron en contacto con diluciones en serie del suero de prueba en medio de dilución (DMEM, L-glutamina al 2 %, FBS al 5 %, 0,2 ml/l de gentamicina, 0,2 ml/l de anfotericina B). La solución madre de rotavirus se preparó en medio de dilución de virus (DMEM, L-glutamina al 2 %, 700 ml/l de tripsina de tipo IX, 0,2 ml/l de gentamicina, 0,2 ml/l de anfotericina B) para contener 50-500 FAID₅₀/ml de virus (FAID₅₀/ml = 50 % de la dosis infecciosa de anticuerpo fluorescente por ml) y se mezcló durante 45-60 minutos a temperatura ambiente. Esta solución de virus se diluyó en serie a 1:20.000-25.000 en medio de dilución y las diluciones en serie se incubaron con muestras de suero durante 50-70 minutos. La mezcla de virus y suero (junto con los controles positivos y negativos) se aplicó posteriormente a las células MA104 y las células se cultivaron durante dos a tres días a 37 °C (incubadora de CO₂ al 5 %). Después se lavaron las células, se fijaron usando acetona al 80 % (30±5 minutos) y se incubaron con un anticuerpo primario anti-RVB, seguido de un anticuerpo fluorescente secundario. Los títulos se calcularon utilizando el procedimiento de Spearman-Kärber y se informaron como el recíproco de la dilución del suero que inhibe el crecimiento viral en más del 50 % de los pocillos indicadores de la dilución dada. El ELISA se llevó a cabo usando procedimientos estándar. Los resultados de estos cálculos se resumen en la **tabla 2**:

Tabla 2

Grupo	GMT promedio (día 0)	GMT VNA promedio (día 35/+14DPV2 (= día 14))	Intervalo de GMT VNA (día 35/+14DPV2 (= día 14))	ELISA promedio (día 35/+14DPV2 (= día 14))	Intervalo de ELISA (día 35/+14DPV2 (= día 14))
1 (3X HI-BR)	2	3520	1218-19484	609	512-1024
2 (1X HI-BR)	2	3189	1218-5793	323	128-1024
3 (0,5X HI-BR)	2	4240	1722-8192	416	256-512
4 (3X BPL-BR)	2	11	3-64	2	2
5 (1X BPL-BR)	2	9	6-45	2	2-4
6 (0,5X BPL-BR)	2	5	3-10	3	2-32

Tal como se muestra en la **tabla 2**, el BR inactivado por calor proporcionó una respuesta de anticuerpo mucho más fuerte, medida mediante un ensayo de neutralización de virus o ELISA, que el BR inactivado por BPL.

B. Estudios en bovinos

Este estudio comparó las respuestas serológicas de animales bovinos (el hospedador natural del RVB) que no habían sido vacunados previamente contra el rotavirus, a la administración de antígenos de rotavirus bovinos (BR) preparados utilizando el protocolo de inactivación de beta-propiolactona (BPL-BR) convencional o los procedimientos de inactivación por calor descritos en el ejemplo 1 (HI-BR). Se probaron seis vacunas adyuvadas con Emulsigen (Emulsigen D al 30 %) (**tabla 3**). Los animales recibieron una dosis intramuscular de 5 ml (dosis de cebado IM (en el cuello)) en el día 0 y una dosis de refuerzo (también IM) en el día 84 del estudio (12 semanas después de la inmunización). Los niveles de anticuerpos se determinaron a partir de muestras de suero obtenidas en los días del estudio 0 (antes de la extracción de sangre; los animales típicamente tienen algunos anticuerpos anti-RVB debido a la transferencia pasiva del calostro), 14, 28, 56, 84, 98 y 112. Una vez recogido, el suero se almacenó a -20 °C. Los ensayos de neutralización del virus se realizaron esencialmente como se ha descrito anteriormente, excepto que la solución del virus se diluyó en serie a 1:2 y luego a 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵ en medio de dilución.

Los grupos de tratamiento se organizaron como se muestra en la **tabla 3**:

Tabla 3

Grupo	Antígeno	Número de animales
1	3X HI-BR*	10-15
2	1X HI-BR	10-15
3	0,5X HI-BR	10-15
4	3X BPL-BR	10-15

*X=dosis convencional de BR en producto comercial

Los resultados de este estudio se presentan en la **tabla 4**:

Tabla 4

Grupo	GMT promedio (día 0)	Intervalo de GMT (día 0)	GMT VNA promedio (día 98/+14DPV2 (= día 112))	Intervalo de GMT VNA (día 98/+14DPV2 (= día 112))
1 (3X HI-BR)	225	32-1448	9255	2263-30444
2 (1X HI-BR)	175	45-861	11536	3805-25600
3 (0,5X HI-BR)	193	91-1448	6321	1131-18102
4 (3X BPL-BR)	186	91-1448	162	71-566

Tal como se muestra en la **tabla 4**, El BR inactivado por calor proporcionó una respuesta de anticuerpo mucho más fuerte, medida mediante un ensayo de neutralización de virus, que el BR inactivado por BPL.

- 5 Aunque se han descrito ciertas realizaciones en términos de realizaciones preferidas, se entiende que los expertos en la materia idearán variaciones y modificaciones. Por lo tanto, se pretende que las reivindicaciones adjuntas abarquen todas estas variaciones equivalentes que se encuentran dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de rotavirus inactivado, que comprende calentar directamente un volumen de sobrenadante de cultivo celular que contiene rotavirus activo a una temperatura a la que el rotavirus se inactiva, en el que dicha temperatura es de 60-80 °C.
- 5 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sobrenadante de cultivo celular no tiene uno o más de, una osmolalidad en el intervalo de 200-500 mOsm, una concentración de una sal de un catión divalente en el intervalo de 1 mM a 15 mM y un azúcar y/o alcohol de azúcar en el intervalo del 1 al 20 % en peso/volumen.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el rotavirus inactivado es inmunogénico.
- 10 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la inmunogenicidad del rotavirus inactivado es superior a la inmunogenicidad del rotavirus inactivado químicamente.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el rotavirus es un rotavirus bovino.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la temperatura es de 70 °C.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la temperatura del sobrenadante de cultivo se mantiene durante 15 minutos a 240 minutos.
- 15 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la temperatura del sobrenadante de cultivo se mantiene durante 15 minutos a 60 minutos.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la temperatura del sobrenadante de cultivo se mantiene durante 60 minutos.
- 20 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende además congelar el sobrenadante de cultivo celular.
11. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, que comprende calentar el sobrenadante de cultivo celular en al menos dos etapas separadas.
12. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que el pH del sobrenadante de cultivo celular es $7,6 \pm 0,1$.