

**UNA VACUNA DE ROTAVIRUS SIN TAMPÓN, DE VOLUMEN DE DOSIS BAJO
Y ESTABLE AL ÁCIDO**

CAMPO DE LA INVENCION

5

La invención se refiere al campo de las vacunas de rotavirus. Más particularmente, la presente invención se refiere al campo de las vacunas de rotavirus que están libres de tampón o que no requieren ningún antiácido antes, durante o
10 después de la administración de la vacuna de rotavirus. Esta invención se refiere también al campo de la cantidad de volumen de dosis por vacuna unitaria, particularmente de vacunas de rotavirus.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Es bien conocido que los Rotavirus son la causa principal de Gastroenteritis grave en bebés y niños en todo el mundo. Incluso las mejoras en la higiene, la calidad del agua y el
20 saneamiento que pueden controlar generalmente muchas bacterias y parásitos que son responsables de provocar otros tipos de diarrea no evitan adecuadamente la propagación de los rotavirus. Por lo tanto, la vacunación es la única estrategia capaz de reducir significativamente la carga de la enfermedad
25 provocada por infecciones de rotavirus en países subdesarrollados y en desarrollo a lo largo del globo. La vacunación es más significativa para los países que carecen del apoyo económico requerido e infraestructuras para abordar las infecciones de rotavirus en los pacientes infectados. Hasta
30 la fecha, ha habido al menos cuatro vacunas de rotavirus comercializadas en el mundo, siendo la primera entre ellas

Rotashield® suministrada por Wyeth Holdings, en el año 1999. Esta era una vacuna de rotavirus viva, oral, tetravalente producida usando 1 rotavirus de macaco, 3 vacunas de virus reordenadas de macaco-humano licenciadas en los Estados Unidos.

- 5 Sin embargo, se retiró del mercado después de 14 meses debido a su asociación a efectos adversos de intususcepción.

La Rotashield® comprendía una composición que contenía sacarosa, glutamato monosódico, monofosfato potásico, difosfato potásico, suero bovino fetal y sulfato de neomicina en medio amphotericina. La publicación de patente correspondiente de composiciones de vacuna de rotavirus WO2000006196A2, enseña que las composiciones de vacuna pueden contener sustancias farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y tamponantes y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, citrato-bicarbonato o similares.

20 Cuando la composición se administra oralmente puede ser necesario proporcionar al individuo una solución tamponada para neutralizar parcialmente el ácido del estómago y proteger el rotavirus reordenado mientras pasa al intestino. Las soluciones tamponadas apropiadas para este uso incluyen bicarbonato

25 sódico, bicarbonato citrato o similares.

RotaTeg®, es una vacuna pentavalente humana-bovina (WC3) reordenada viva atenuada oral fabricada por Merck & Co., que comprende una cepa WC3 de rotavirus bovino, P7[5]G6 que implica

30 5 reordenamientos: de los cuales 4 reordenamientos con el gen VP7 de G1, G2, G3 o G4 y 1 reordenamiento con el gen VP4 P1A[8]

de la cepa parental de rotavirus humano con el resto de los genes del parental de rotavirus bovino WC3. La formulación de la vacuna (que corresponde a las publicaciones de patente de Merck viz. WO1998/13065, WO2001/08495 y WO2002/011540)

5 contiene ciertos estabilizantes en un medio de cultivo de tejidos junto con la presencia de tampones en la propia formulación, siendo dicho tampón citrato sódico y fosfato sódico. El carboxilato de las reivindicaciones patentadas se usa y actúa como un tampón para hacer que el antígeno del
10 rotavirus aguante la acidez del estómago mientras el antígeno del virus se administra al estómago del bebé.

Además, Rotarix® es una vacuna monovalente, que comprende una cepa RIX4414 de rotavirus humano con pasajes derivada de
15 la cepa 89-12. Rotarix® (producida por GlaxoSmithKline Biologicals), es una vacuna viva que contiene la cepa de rotavirus humana G1, P[8] monovalente atenuada. La vacuna está disponible en forma liofilizada mezclada con estabilizantes, para reconstituirse con un diluyente de tampón basado en
20 carbonato cálcico antes de la administración de la vacuna en los sujetos.

Rotarix se preparó reconstituyendo el principio activo liofilizado (cepa RIX4414 + excipientes) con 1,0 ml de tampón
25 CaCO₃ de GSK contenido en una jeringa pre-cargada. Después de inyectar el tampón en el vial que contiene la vacuna liofilizada, el vial se agitó bien para resuspender la vacuna. El volumen completo del producto resuspendido se extrajo después a la misma jeringa, se descartó la aguja (o el
30 dispositivo de transferencia) de la jeringa y el producto se administró apropiadamente como una dosis oral única.

Alternativamente, la reconstitución de la vacuna liofilizada comercial seguirá los mismos procedimientos, usando un aplicador oral cargado con tampón y un adaptador de transferencia en lugar de una jeringa y una aguja. La vacuna reconstituida debe tener una apariencia que parezca blanco lechoso. Debe inspeccionarse visualmente para la materia particulada y/o decoloración y no debe administrarse si existe cualquiera de estas condiciones. Rotarix es para su administración oralmente. El bebé debe estar sentado en una posición reclinada y el contenido completo del aplicador oral que contiene la vacuna reconstituida debe administrarse en el interior de la mejilla. Rotarix no ha de administrarse por inyección. Por lo tanto, es evidente que, la reconstitución del diluyente tamponante contiene demasiadas etapas, desde asegurar que la reconstitución se ha realizado apropiadamente hasta el punto de administración de la vacuna. Todos estos factores definitivamente provocan una disminución en la conformidad de la vacuna, sumando la protección parcial de la infección de rotavirus en lugar de lograr una protección completa.

Las solicitudes de patente correspondientes de GSK de formulaciones de vacuna de rotavirus WO2001/012797, WO2005/02133, WO2006/087205, que implican una cepa P43 de rotavirus atenuada viva de pasajes en serie con mutaciones específicas también están suplementadas con un tampón antiácido para su reconstitución. La proteína G (VP4 y VP7) de dicha cepa de rotavirus es capaz de inducir la respuesta inmune a al menos otras 4 cepas de rotavirus a G1 y al menos uno de los serotipos G2 a G14.

También se han desvelado otras composiciones de vacuna de rotavirus patentadas con estabilizantes y tampones por Bharat Biotech International Limited con una cepa 116E hindú asintomática aislada de un niño humano. Estas requieren la

5 administración separada de un tampón antiácido para el receptor de la vacuna antes de recibir la vacuna para aumentar el pH del estómago, en el que el dicho tampón antiácido es un tampón citrato-fosfato, para neutralizar la acidez del estómago en el momento de la administración del antígeno de vacuna de

10 rotavirus. La Publicación de Patente WO2013160913, proporciona composiciones de vacuna de rotavirus que comprende antígenos de rotavirus, estabilizantes y ciertas combinaciones tamponantes novedosas. Los tampones en la invención se pre-

mezclan en las composiciones de vacuna de rotavirus para

15 neutralizar el pH ácido alto del estómago sin requerir la administración separada de un antiácido antes de la administración de la vacuna.

De esta manera es evidente que se han desarrollado

20 diferentes vacunas de rotavirus usando diferentes cepas, tanto de tipo de reordenamiento humano como animal. Hay unas pocas diferencias importantes en las características de estas cepas, las típicas, como se lista a continuación.

Vacunas de rotavirus con cepas humanas	Vacunas de rotavirus con cepas animales
La infección natural ofrece protección contra una posterior enfermedad de rotavirus.	Los rotavirus animales son cepas atenuadas de forma natural, que disminuye la replicación en humanos.
Los virus humanos tienen alta capacidad de replicación en el	Las vacunas de rotavirus con cepas reordenadas de animales requieren

Vacunas de rotavirus con cepas humanas	Vacunas de rotavirus con cepas animales
hospedador y por lo tanto se atenúan por múltiples pasajes en cultivo de tejido en múltiples hospedadores. Ya que estas son cepas humanas, un título de vacuna de 10 ⁴ UFF/0,5 ml es suficiente para inducir la inmunogenicidad requerida contra infecciones por retrovirus en humanos.	títulos de vacuna muy altos para ser capaces de inducir la respuesta inmune requerida.
Se adquiere amplia inmunidad a través de diversos mecanismos efectores inmunes.	Se requiere la expectación del anticuerpo neutralizante en la luz del intestino. La inmunidad obtenida no es tan alta como las vacunas con cepas humanas.
La protección heterotípica se gana a través de la amplia respuesta inmune. Esto significa que ofrece protección cruzada contra diferentes cepas.	Construcciones de vacunas reordenadas para incluir los antígenos de rotavirus humanos comunes.

Tabla 1: Diferencias entre vacunas monovalentes humanas y reordenadas animales

FUNDAMENTOS DETRÁS DE LA PRESENTE INVENCIÓN

5

De esta manera se sabe que el rotavirus es altamente sensible a ambientes ácidos (Estes, M., Graham, D., Smith, E. y Gerba, C. (1979). Rotavirus Stability and Inactivation. *Journal of General Virology*, 43(2), pp.403-409). Se ha informado también que el virus de la gastroenteritis infantil se vuelve inestable y hay un colapso de su envuelta externa y los capsómeros cuando se somete a un ambiente que tiene un pH de menos de 3,0 (Palmer, E., Martin, M. y Murphy, F. (1977). Morphology and Stability of Infantile Gastroenteritis Virus: Comparison with Reovirus and Bluetongue Virus. *Journal of*

10

15

General Virology, 35(3), pp.403-414). También se ha informado que muchas cepas de rotavirus se han inactivado en un minuto cuando se exponen a un ambiente que tiene pH 2 y se obtuvieron resultados similares con jugos gástricos humanos que tienen pH 1,8 (Weiss, C. y Clark, H. (1985). Rapid Inactivation of Rotaviruses by Exposure to Acid Buffer or Acidic Gastric Juice. *Journal of General Virology*, 66(12), pp.2725-2730). Se ha informado además que el rotavirus de serotipo 1 humano se inactiva completamente cuando se somete a un ambiente de pH 2,5 (Meng, Z., Birch, C., Heath, R. y Gust, I. (1987). Physicochemical Stability and Inactivation of Human and Simian Rotaviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(4), pp.727-730). En general, se sabe que el rotavirus es altamente inestable cuando se somete a ambientes ácidos y se vuelve inactivo rápidamente. Las tasas de inactivación de tres rotavirus bovinos y varios de origen primate se determinaron durante la exposición a tampones ácidos a pH 2,0, pH 3,0 o pH 4,0. Cada rotavirus se inactivó a pH 2,0 (la acidez más parecida al estómago en ayunas normal) muy rápidamente, con vidas medias para la infectividad determinadas ser 1 min o menos. Cada rotavirus se inactivó a una velocidad mucho más lenta a pH 3,0: la inactivación a pH 4,0 fue mínima. Se detectaron algunas diferencias en la resistencia entre diferentes cepas de rotavirus. Aunque estas determinaciones se realizaron a temperatura ambiente (23 °C), los experimentos a diversas temperaturas indicaron una velocidad incluso más rápida de inactivación vírica por ácido a la temperatura corporal normal (37 °C). Los estudios de rotavirus expuestos a jugo gástrico humano natural a pH 1,8 o pH 2,1 revelaron una velocidad de inactivación del virus similar a aquella observada con tampón glicina de idéntico pH (Ref: Geigy Scientific Tables, volumen

1, 1981, página 126).

La inactivación de los rotavirus tiene lugar entre pH 2,0 y pH 3,0 pero a pH 4,0 no tiene lugar inactivación o es mínima.

5 Ya que el estómago contiene un ambiente gástrico altamente ácido, ha sido imperativo añadir tampones en las formulaciones de vacunas de rotavirus hasta la fecha. Los tampones en las formulaciones de rotavirus ayudan a retener un pH constante de las formulaciones de vacuna de rotavirus permitiendo de esta
10 manera una capacidad antiácida o tamponante de las formulaciones de vacuna. La capacidad antiácida (también denominada capacidad de neutralización de ácido) de las vacunas de rotavirus se ha medido por ensayos de arroz Baby Rossett en las patentes de GSK. La capacidad de neutralización ácida de
15 una formulación dada se define como el tiempo medido para mantener el pH por encima de 4,0 y se evalúa por el ensayo de arroz Baby Rossett. El ensayo de Baby Rossett ha alegado simular el ambiente gástrico del estómago humano. La última patente de GSK US8821891B2 aboga por disminuir la concentración
20 de fosfatos y con una concentración aumentada de un carboxilato preferentemente adipato que varía de 100 nM a 1 M, preferentemente de 40 mM a 700 mM en un volumen de dosis tan bajo como 1,5 ml por dosis humana de vacuna de rotavirus. El adipato actúa como un tampón capaz de soportar la alta acidez
25 del estómago (pH 1 a 2). La capacidad de soportar la alta acidez del estómago humano se mide por el ensayo de arroz Baby Rossett, que tiene un valor de 8 a 23 minutos que se dice que es capaz y suficientemente bueno de evitar la inactivación del antígeno del rotavirus en la formulación de vacuna después de
30 la administración de la vacuna de rotavirus al bebé humano.

De esta manera, para administrar eficazmente una vacuna de rotavirus que sea capaz de provocar una respuesta inmunogénica suficiente para conferir protección contra infecciones de rotavirus, se necesitan al menos 1,5 a 2 ml de la vacuna de rotavirus o la formulación de vacuna reconstituida por dosis humana para administración oral para permitir eficazmente que el antígeno de rotavirus pase a través del ambiente altamente ácido del estómago. Por lo tanto, mediante las anteriores descripciones del estado de la presente naturaleza de las vacunas de rotavirus disponibles hasta la fecha, también se entenderá fácilmente y se reconocerá por las personas expertas en la materia, que el antígeno del rotavirus es un antígeno altamente lábil a ácido, y la administración de la vacuna de rotavirus siempre requiere un componente antiácido o tamponante aumentando de esta manera la cantidad requerida (en términos de dosificación en volúmenes por unidad de vacuna) de administración de vacuna.

También es un hecho que el antígeno del rotavirus es un virus altamente inestable y considerando la situación de un antígeno de vacuna de rotavirus atenuado vivo sería más inestable: por lo tanto los antígenos de rotavirus se suplementan con estabilizantes de vacuna propietarios respectivos para estabilizar las formulaciones de vacuna, que se añadirían a la cantidad de la dosis de vacuna en términos de volumen por unidad de vacuna. Por lo tanto, proporcionar una vacuna de rotavirus sin un tampón/antiácido reducirá definitivamente el volumen de dosificación por vacuna unitaria. Al mismo tiempo, es imperativo que dicha vacuna de rotavirus sin un tampón no deba comprometer la efectividad así como la estabilidad de la vacuna de rotavirus.

Ya que el sujeto del receptor de la vacuna de rotavirus es siempre un bebé en el grupo de edad entre 6 semanas y 6 meses de edad, hay siempre posibilidad de que una cantidad considerable de formulación de vacuna de rotavirus administrada a la boca del bebé se salpique fuera. Esto crea una probabilidad de administración parcial de la vacuna reduciendo de esta manera el cumplimiento de la vacuna y no protegiendo la carga de la enfermedad en lugar de recibir la vacuna. Por lo tanto, siempre es deseable que la cantidad de dosificación en términos de volumen por vacuna de rotavirus unitaria se reduzca tanto como sea posible sin comprometer la efectividad de la formulación de vacuna. Actualmente el menor volumen de dosificación desvelado en el estado de la técnica para la vacuna de rotavirus varía del 1,5 ml-2,5 ml. Las vacunas contienen estabilizantes de vacuna y tampones de vacuna que se añaden al total del volumen de dosis de vacuna. De esta manera, la disminución en el volumen de dosificación por vacuna de rotavirus unitaria teniendo la misma capacidad de elevar la inmunogenicidad requerida para la profilaxis contra infecciones de rotavirus en bebés disminuirá la posibilidad de salpicar fuera la formulación de vacuna administrada al bebé. Sería por lo tanto altamente no obvio hacer disponible una formulación de vacuna de rotavirus de baja dosis de hasta 1 ml, preferentemente solo 0,8 ml o lo más preferentemente 0,5 ml solo por dosis humana sin un tampón que es igualmente o incluso más eficaz que la vacuna o vacunas de rotavirus fabricadas disponibles con tampones o antiácidos que tienen alto volumen de dosificación por vacuna unitaria.

La técnica anterior desvela todas las formulaciones de

vacuna de rotavirus todas las cuales han de estabilizarse en formulaciones líquidas a temperaturas refrigeradas entre 5 ± 3 °C o como polvos liofilizados que requieren reconstitución de la vacuna antes de la administración de la vacuna con un diluyente adecuado. Ya se ha analizado que la reconstitución de la vacuna para el polvo liofilizado requiere habilidad específica y cuidado. Además, los requisitos de fabricación separados para los diluyentes junto con la vacuna dobla los costes de fabricación de la vacuna así como los costes de transporte. La deficiencia en la habilidad, el cuidado y la infraestructura apropiada para los requisitos de almacenaje se añaden al problema del suministro de vacuna de rotavirus liofilizada. Para vacunas líquidas a 5 ± 3 °C, la vida útil de las vacunas se limita solamente hasta 2 años. También hay una pérdida del título asociada a las vacunas fabricadas disponibles a $2-8$ °C, durante el almacenamiento y el transporte que es indeseable. Pero con formulaciones de vacunas de rotavirus a -20 °C, se ha descubierto que no hay del todo pérdida de transporte y almacenamiento. Las probabilidades de la contaminación de la vacuna también se reducen en un grado mucho mayor para vacunas a -20 °C. Además, las instalaciones de suministro de vacunas a -20 °C ya se han establecido en casi 120 países a lo largo del mundo para los suministros de la vacuna de la polio. Por lo tanto, de acuerdo con las instalaciones existentes para el almacenamiento de vacunas y los proveedores de vacunas similares a los suministros de vacuna de la polio ayudaría a reducir la carga de enfermedad de rotavirus en el mundo. Es deseable que se desarrollen estrategias alternativas en las que la estabilidad de la vacuna del rotavirus se aumente adicionalmente, de manera que la vacuna puede hacerse disponible para las esquinas más remotas

del globo. Por lo tanto, se desvelan formulaciones novedosas de vacuna de rotavirus en la presente solicitud de patente, en las que las formulaciones de vacuna de rotavirus son estables durante al menos 5 años, siendo absolutamente nuevas y no citadas del todo en el estado actual de la técnica.

OBJETO DE LA PRESENTE INVENCION

El objeto primario es proporcionar una vacuna de rotavirus libre de tampón y estable al ácido.

Un objeto primario más de la invención es proporcionar una vacuna de rotavirus de bajo volumen de dosis de hasta 1 ml o incluso solamente 0,8 ml, preferentemente una baja dosis de volumen de 0,5 ml.

Otro objeto de la invención es proporcionar una composición de vacuna de rotavirus estable con un volumen de vacuna tan bajo como 0,5 ml por dosis.

Otro objeto de la invención es reducir el salpicado de la vacuna de rotavirus y minimizar el malgasto de vacuna asociado por el receptor de la vacuna y aumentar de esta manera el cumplimiento de la vacuna.

Otro objeto de la invención es fabricar una composición de vacuna de rotavirus que no requiera ninguna técnica específica de dilución o reconstitución antes de o durante la administración de la vacuna.

Un objeto más de la invención es proporcionar una vacuna

de rotavirus que sea estable durante al menos 5 años a -20 °C.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar una vacuna de rotavirus de bajo volumen de dosis que sea estable
5 durante 2 años a 5 ± 3 °C y 6 meses a 25 °C y 1 semana a 37 °C.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar una composición de vacuna de rotavirus sin tampón, de bajo volumen de dosis de hasta 1 ml que sea estable en el estómago de pH 2
10 a pH 4 durante al menos 20 minutos.

Otro objeto de la invención es proporcionar una composición de vacuna de rotavirus sin tampón, de bajo volumen de dosis de hasta 1 ml que sea estable a un pH ácido de 2-4 sin ningún
15 suplemento o tampón o agente estabilizante del ácido.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar una composición de vacuna de rotavirus sin tampón, de bajo volumen de dosis que no requiera la administración de ningún antiácido
20 o tampón, pre o post o durante la administración de la vacuna al sujeto.

Alternativamente, es también un objeto de la invención proporcionar una vacuna de rotavirus de bajo volumen de dosis de 0,5 ml junto con la presencia de un tampón, que sea
25 igualmente eficaz contra infecciones de rotavirus en humanos.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar una vacuna de rotavirus de bajo volumen de dosis sin un tampón, que sea capaz de generar una respuesta inmune equivalente o
30 bien mayor que las vacunas de rotavirus que se suplementan con antiácidos o tampones en composiciones de vacunas.

SUMARIO DE LA INVENCION

De acuerdo con una realización de la invención proporciona
5 una composición de vacuna en la que la pérdida en el título de
la vacuna de rotavirus no es más de 0,55 UFF por 0,5 ml entre
un pH de 2-4 durante un periodo de al menos una hora.

En una realización adicional, la invención proporciona una
10 composición de vacuna en la que la pérdida en el título de la
vacuna de rotavirus no es más de 0,68 UFF por 0,5 ml entre un
pH de 2-4 durante un periodo de al menos 20 minutos.

Una realización más de la invención, proporciona diversas
15 composiciones de vacuna de rotavirus a un volumen de dosis que
varía de 1 ml a 0,5 ml, en la que las formulaciones de vacunas
son sin ningún tampón o antiácido, y ejemplifica la caída
nominal en el título de la vacuna a pH 2 y pH durante un espacio
de tiempo de 30 minutos.

20

Una realización distinta de la invención proporciona
capacidades de neutralización de ácido de una composición de
rotavirus de bajo volumen de dosis entre 0,5 ml y 1 ml por
vacuna unitaria en comparación con la composición de vacuna de
25 rotavirus en presencia de tampones establecidos a través de
ensayos de arroz Baby Rossett.

Una realización adicional de la invención, proporciona una
vacuna de rotavirus sin tampón de volumen de dosis de solamente
30 0,5 ml que es capaz de generar una respuesta inmune equivalente
o bien mayor en términos de cuatro veces la seroconversión post

vacunación de forma similar a aquella de la seroconversión lograda con la formulación de vacuna bien en presencia de tampones o bien de la administración de antiácidos.

5 En otra realización, la invención proporciona un método de profilaxis contra la diarrea rotavírica en humanos, comprendiendo el método las etapas de administrar una cantidad eficaz de una formulación de vacuna de rotavirus estabilizada que comprende la cepa 116E de rotavirus, una combinación de
10 azúcares seleccionados de sacarosa, lactosa y trehalosa, hidrolizado de lactalbúmina, albúmina de suero humano recombinante, sin presencia de ninguna formulación de tampón en dicha formulación de rotavirus.

15 Una realización más de la invención proporciona composiciones de vacuna de rotavirus estables, que son estables a -20 °C durante al menos 5 años.

Una realización adicional de la invención proporciona
20 composiciones de vacuna de rotavirus estables a 2-8 °C, 25 °C y 37 °C durante 2 años, 6 meses y 3 semanas respectivamente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

25 **Realización 1: Formulaciones de rotavirus tamponadas y acidez gástrica**

Se ha mencionado anteriormente en los antecedentes de la invención que el uso de tampones es una práctica común de
30 estrategias de formulación de vacunas de rotavirus, que se ha estado llevando a cabo por diversos fabricantes de vacunas de

rotavirus hasta la fecha, y de esta manera la formulación de vacuna Rota que comprende la cepa 116E a -20 °C (SPG y DMEM) se ha probado con tampón citrato-bicarbonato e inicialmente condiciones de salinidad normales.

5

Bharat Biotech International Limited obtuvo las cepas de rotavirus humanas 116E del National Institute of Health bajo un acuerdo de transferencia de material con el National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH,
10 Bethesda, USA. La secuencia genómica completa de las cepas 116E de rotavirus ya se ha informado en la bibliografía.

Se tomaron tres formulaciones de vacuna de Rotavirus con el rotavirus 116E almacenadas a -20 °C en 3 grupos (Grupo I,
15 II y III) como se detalla a continuación. Las composiciones de vacuna de rotavirus en los tres grupos a continuación comprenden el antígeno de Rotavirus atenuado vivo de la cepa 116E disuelto en SPG al 10 % (sacarosa, dihidrogenofosfato potásico e hidrogenofosfato dipotásico) y Medio esencial mínimo
20 de Dulbecco. Las dichas formulaciones de vacunas se trataron separadamente como se detalla a continuación:

Grupo I: 0,5 ml de formulación A de Rotavirus 116E a -20 °C.

25

Grupo II; 2 ml (equivalentes 4 dosis humanas de 0,5 ml por dosis humana) de formulación A de Rotavirus 116E mezclada con 5 ml de solución salina normal.

30

Grupo III: 0,570 ml de formulación A de Rotavirus 116E + mezcla de [1,42 ml de tampón Citrato - Bicarbonato + 8 ml de

HCl 34,8 meq].

Como se da anteriormente, el Grupo I incluye la formulación de vacuna de rotavirus a -20 °C en el que no se añadió tampón ni solución salina a la formulación de vacuna y el título de la vacuna se midió durante los siguientes 120 minutos. En el Grupo II, se tomaron 2 ml de vacuna 116E de rotavirus (almacenada a -20 °C) y se añadieron 5 ml de solución salina normal y se midió el título de la vacuna a un alto título de 10⁶ UFF/ml hasta 120 minutos. En el Grupo III, se tomaron 0,57 ml de formulación de vacuna 116E de rotavirus (almacenada a -20 °C) y se añadieron 1,42 ml de Tampón Citrato Bicarbonato y 8 ml de Ácido clorhídrico 34,8 meq.

N.º de grupo	0 min en UFF/0,5 ml	60 min en UFF/ml	120 min en UFF/ml	Observaciones
Grupo I	10 ^{6,35}	10 ^{6,17}	10 ^{6,32}	Altamente estable
Grupo II	10 ^{5,76}	10 ^{5,84}	10 ^{5,69}	Bastante estable
Grupo III	10 ^{4,61}	10 ^{5,30}	10 ^{5,11}	Bastante estable

Tabla 2: Títulos de vacuna de la formulación de vacuna de rotavirus (a temperatura de almacenamiento: -20 °C) en presencia de tampones a 0 minutos, 60 minutos y 120 minutos.

Por lo tanto, la tabla anterior establece que tanto para la exposición del virus a condiciones de solución salina normales o en presencia de soluciones tamponantes, el título del antígeno del rotavirus es estable y por lo tanto la vacuna es estable.

Realización 2: Ensayo de inmunoperoxidasa de formulaciones de

Ejemplo 1: El ensayo de inmunoperoxidasa se realizó después de someter las formulaciones de vacuna de rotavirus directamente al ambiente ácido por adición directa de los 34,8 meq de ácido clorhídrico (HCl) a la formulación de vacuna de rotavirus. El pH de las formulaciones de vacuna se llevó directamente desde pH 7 a diversos valores de pH menores de pH 2 y pH 4 por adición directa de ácido y posteriormente se midió el título del antígeno de la vacuna a los valores de pH menores dados de pH 2 y pH 4. Después de esto, el título de la vacuna se midió durante hasta 1 hora a diversos pH menores de 2 y 4. Después se realizaron observaciones. La mezcla de reacción se estudió en diversos puntos de tiempo y a diversos niveles de pH. Los detalles se muestran a continuación en la tabla a continuación. Las dichas formulaciones de vacuna de rotavirus (a temperatura de almacenamiento de -20 °C) contienen el antígeno 116E de rotavirus atenuado vivo, SPG (fosfato glutamato sódico) al 10 % disuelto en medio esencial mínimo de Dulbecco.

Detalles de la muestra	Título en UFF/0,5 ml de dosis					Observaciones
	Titulación real en 0 minutos	Título corregido o con factor de dilución en 0 minutos	Título real después de 1 hora	Título corregido o con factor de dilución después de 1 hora	Pérdida log después de 1 hora	
Formulación	104,95	NA	104,94	104,94	-	-

Detalles de la muestra	Título en UFF/0,5 ml de dosis					Observaciones
	Titulación real en 0 minutos	Título corregido o con factor de dilución en 0 minutos	Título real después de 1 hora	Título corregido o con factor de dilución después de 1 hora	Pérdida log después de 1 hora	
de vacuna de Rotavirus 116E 0,5 ml a pH 7,4						
Formulación de vacuna de Rotavirus 116E 0,5 ml + 34,8 meq de HCl a pH 4,0	10 ^{3,58}	10 ^{5,05}	10 ^{3,58}	10 ^{5,05}	Nil	Sin efecto del pH
Formulación de vacuna de Rotavirus 116E 0,5 ml + 34,8 meq de HCl a pH 2,0	10 ^{3,54}	10 ^{5,01}	10 ^{2,93}	10 ^{4,40}	0,55	Efecto marginal del pH

Tabla 3: el ensayo de la inmunoperoxidasa resulta a un título diana de 10^{5,0} UFF/0,5 ml de dosis a 0 minutos y 60 minutos por adición directa de ácido a formulaciones de vacuna de rotavirus (temperatura de almacenamiento: -20 °C).

Nota: Reducción calculada en el valor del título de

ineficacia debido a la dilución = $10^{1,47}$ UFF. Por lo tanto el título de la vacuna real después de la dilución es $10^{2,93}$ a pH 2. Todas las muestras se titularon por triplicado por el Ensayo de la inmunoperoxidasa. La vacuna de rotavirus oral (título diana de $10^{5,0}$ UFF / 0,5 ml) fue estable a pH 4,0. El título diana significa la concentración mínima del antígeno 116E del rotavirus en el vial de la vacuna que se pretende que se mantenga en el vial dado. El título original a pH neutro de la vacuna es $10^{4,95}$ UFF/0,5 ml en 0 minutos. El título de la vacuna a pH 2 en 0 minutos es $10^{3,54}$ UFF/ml y el título cayó a $10^{2,93}$ UFF/0,5 ml en 1 hora. De esta manera, después de añadir el valor del factor de dilución de 1,47 debido a la adición del ácido, con el valor de título real ($10^{2,93}$ UFF/0,5 ml), el título de vacuna corregido a pH 2 después de 1 hora desde la adición del ácido es $10^{4,40}$ en comparación con el título de la vacuna original de $10^{4,95}$ a pH 7 en 0 minutos. Por lo tanto, la vacuna experimentó una pérdida log total en el título de la vacuna de solamente 0,55 a pH 2,0 en un periodo de 1 hora. Esto establece que, incluso a un menor valor de pH de 2, es decir en un ambiente ácido específico como aparece en el estómago humano, la formulación de vacuna de rotavirus es capaz de sostener su título de vacuna en un valor de $10^{4,40}$ UFF/0,5 ml. En dicho título de vacuna, la vacuna es capaz de elevar suficiente respuesta inmune contra posteriores infecciones por rotavirus. En una prueba clínica llevada a cabo con la vacuna Rota 116E a un título de $10^{4,0}$, la vacuna produjo una sero-conversión de 4 veces alrededor del 62 %, que es bastante alentador (Nita Bhandari et al, J Infect Dis 2009, 200, 421-9).

Ejemplo 2: Se ha repetido el mismo experimento con una vacuna diferente (a temperatura de almacenamiento de -20°C),

en el que el título diana es $10^{6,0}$ UFF/0,5 ml (dosis). Los valores de título calculados junto con el factor de dilución se proporcionan en la siguiente tabla a diversos valores de pH en 0 minutos y después de 1 hora. Las dichas formulaciones de vacuna de rotavirus (a temperatura de almacenamiento de -20 °C) contienen el antígeno de rotavirus atenuado vivo 116E, SPG al 10 % disuelto en DMEM.

Detalles de muestra de vacuna	pH	Título corregido con factor de dilución a 0 h en UFF/0,5 ml	Título corregido con factor de dilución después de 1 h en UFF/0,5 ml	Pérdida log después de 1 hora	Observaciones
Formulación de vacuna 0,5 ml Rotavirus 116E	7,2	$10^{5,35}$	$10^{5,30}$	0,05 (sin pérdida)	Sin efecto del pH
Formulación de vacuna 0,5 ml Rotavirus 116E + 34,8 meq HCl	4,0	$10^{5,33}$	$10^{5,09}$	0,24 (pérdida marginal)	Sin efecto del pH
Formulación de vacuna 0,5 ml Rotavirus 116E + 34,8 meq HCl	2,0	$10^{4,89}$	$10^{4,21}$	0,68 (pérdida marginal)	Efecto marginal del pH

Tabla 4: Resultados del ensayo de inmunoperoxidasa a un título diana de $10^{6,0}$ UFF/0,5 ml de dosis en 0 minutos y 60 minutos por adición directa de ácido a las formulaciones de vacuna de rotavirus (temperatura de almacenamiento: -20 °C).

Conclusión: Solo hubo pérdida en 0,24 log de pérdida en el título de vacuna en las muestras de vacuna a pH 4,0, que se

considera que no es efecto en el pH en circunstancias prácticas mantenido durante 1 hora. A pH 2,0, hubo una pérdida de título de 0,46 log en el título en 0 horas y una pérdida de 0,68 log₁₀ de UFF en 1 hora. Esto se dice que está teniendo un efecto muy

5 marginal en el pH de los valores de título de vacuna a un valor de pH menor tan ácido de 2.

De acuerdo con la tabla anterior, los presentes inventores han visto que el título de vacuna de $10^{4,89}$ UFF/0,5 ml a pH 2

10 se retiene hasta un valor de título de $10^{4,21}$ UFF/0,5 ml; un título log de 4,89-4,21 es lo suficientemente bueno para la replicación del rotavirus en el intestino del estómago de un bebé a una edad de 6 semanas a 2 años. La acidez del estómago de un bebé también es pH 2, representando un ambiente gástrico

15 simulado. La vacuna todavía es capaz de sobrevivir teniendo un título de 4,89 log₁₀ UFF/0,5 ml, que es suficiente para cruzar el estómago y después establecerse en los vellos del intestino y para la replicación adicional del rotavirus, responsable de

20 generar la respuesta inmune en el bebé, confiriendo de esta manera protección y prevención de la gastroenteritis rotavírica. Por lo tanto, la vacuna se descubrió ser estable a un pH ácido de 2 durante al menos 1 hora de duración sin tener ninguna pérdida considerable del todo en el título de la

vacuna.

25

Realización 3: Experimento *in vitro* para demostrar que la vacuna de Rotavirus 116E no requiere antiácido:

Aparte de las conclusiones de los resultados de las pruebas

30 clínicas que siguen después en la memoria descriptiva de la patente, también se demostró *in vitro* la estimulación de

condiciones similares de la acidez del estómago administrando la vacuna directamente sin tampón.

Ejemplo 3.1: Se tomó 1 ml de vacuna (formulación 3A) que
5 contiene rotavirus 116E, combinación de sacarosa (50 %),
lactosa (0,5 %) y trehalosa (0,5 %), hidrolizado de
lactalbúmina (1 %), albúmina de suero humano (0,4 %) y se
añadieron 1,25 ml de HCl 0,1 N y se mezcló bien. Se tomó una
10 muestra y se ensayó el contenido de virus a diversos niveles
de pH a diferentes intervalos de tiempo. Los resultados se
muestran en la tabla 5.1 a continuación.

N.º de M	Detalles de la muestra	Contenido de virus (UFF/ml)
1	pH 2,0-0 minutos	5,72
2	pH 2,0-10 minutos	4,78
3	pH 2,0-30 minutos	3,84
4	pH 3,0-0 minutos	5,96
5	pH 3,0-10 minutos	5,96
6	pH 3,0-30 minutos	5,91
7	Control	6,10

Tabla 5.1: Ensayo de inmunoperoxidasa de 1 ml de vacuna
15 con rotavirus 116E (formulación 3A)

Ejemplo 3.2: Se tomaron 0,8 ml de vacuna que contiene
rotavirus 116E, combinación de sacarosa (40 %) y trehalosa (0,5
%), hidrolizado de lactalbúmina (20 %), polivinilpirrolidona
20 (0,5 %) (formulación 3B) y se añadieron 1,25 ml de HCl 0,1 N y
se mezcló bien. Se tomó una muestra y se ensayó el contenido
de virus a diversos niveles de pH a diferentes intervalos de
tiempo. Los resultados se muestran en la tabla 5.2 a

continuación.

N.° de M	Detalles de la muestra	Contenido de virus (UFF/ml)	Contenido de virus (UFF/0,8 ml)
1	pH 2,0-0 minutos	4,71	4,62
2	pH 2,0-10 minutos	4,69	4,60
3	pH 2,0-30 minutos	4,41	4,32
4	pH 3,0-0 minutos	5,97	5,88
5	pH 3,0-10 minutos	5,94	5,85
6	pH 3,0-30 minutos	5,93	5,84
7	Control	6,10	

Tabla 5.2: Ensayo de inmunoperoxidasa de 0,8 ml de vacuna con rotavirus 116E (formulación 3B)

Ejemplo 3.3: Se tomaron 0,5 ml de vacuna de rotavirus 116E que contiene combinación de sacarosa (60 %) y trehalosa (0,5 %), proteína de soja (20 %), piridoxina-HCl (0,1 %), polivinilpirrolidona (0,25 %) (formulación 3C) y se añadieron 1,25 ml de HCl 0,1 N y se mezcló bien. Se tomó una muestra y se ensayó el contenido de virus a diversos niveles de pH a diferentes intervalos de tiempo. Los resultados se muestran en la tabla 5.3 a continuación.

N.° de M	Detalles de la muestra	Contenido de virus (UFF/0,5 ml)
1	pH 2,0-0 minutos	4,29
2	pH 2,0-10 minutos	4,21
3	pH 2,0-30 minutos	3,39
4	pH 3,0-0 minutos	5,20
5	pH 3,0-10 minutos	5,17

N.º de M	Detalles de la muestra	Contenido de virus (UFF/0,5 ml)
6	pH 3,0-30 minutos	5,08
7	Control	5,80

Tabla 5.3: Ensayo de inmunoperoxidasa de 0,8 ml de vacuna con rotavirus 116E (formulación 3C)

5 **Ejemplo 3.4:** Se tomaron 0,5 ml de vacuna de rotavirus 116E que contiene SPG al 10 % disuelto en DMEM (formulación 3D) y se añadieron 1,25 ml de HCl 0,1 N y se mezcló bien. Se tomó una muestra y se ensayó el contenido de virus a diversos niveles de pH a diferentes intervalos de tiempo. Los resultados se

10 muestran en la tabla 5.4 a continuación.

N.º de M	Detalles de la muestra	Contenido de virus (UFF/0,5 ml)
1	pH 2,0-0 minutos	4,78
2	pH 2,0-10 minutos	4,48
3	pH 2,0-30 minutos	4,29
4	pH 3,0-0 minutos	5,22
5	pH 3,0-10 minutos	5,17
6	pH 3,0-30 minutos	4,70
7	Control	5,80

Tabla 5.4: Ensayo de inmunoperoxidasa de 0,8 ml de vacuna con rotavirus 116E (formulación 3D)

15

Ejemplo 3.5: Se tomaron 0,5 ml de vacuna de rotavirus 116E que contiene sacarosa (40 %), trehalosa (0,5 %), lactosa (5 %), rHSA (0,5 %), LAH (1 %) y tampón mixto (acetato de amonio + bicarbonato de amonio + ortofosfato de diamonio) (formulación

20 3D) y se añadieron 1,25 ml de HCl 0,1 N y se mezcló bien. Se

tomó una muestra y se ensayó el contenido de virus a diversos niveles de pH a diferentes intervalos de tiempo. Los resultados se muestran en la tabla 5.3 a continuación.

N.º de M	Detalles de la muestra	Contenido de virus (UFF/0,5 ml)
1	pH 2,0-0 minutos	4,77
2	pH 2,0-10 minutos	4,65
3	pH 2,0-30 minutos	4,39
4	pH 3,0-0 minutos	5,21
5	pH 3,0-10 minutos	5,19
6	pH 3,0-30 minutos	4,87
7	Control	5,80

Tabla 5.5: Ensayo de inmunoperoxidasa de 0,8 ml de vacuna con rotavirus 116E (formulación 3C)

Conclusiones: De la tabla anterior es evidente que a pH 2,0 durante 30 minutos también cualquier formulación de vacuna de Rotavirus 116E es capaz de aguantar en ausencia de cualquier tampón o antiácido.

Realización 4: Análisis de Arroz Baby Rossett

El ensayo BRR es el procedimiento validado para la capacidad de neutralización de ácido de las formulaciones de vacuna de rotavirus. De esta manera las formulaciones de vacuna seleccionadas que contienen Tampón Citrato Fosfato y Tampón Citrato Bicarbonato se evalúan para su capacidad de neutralización de ácido usando este ensayo. Se llevaron a cabo experimentos *in vitro* en condiciones simuladas de estómago infantil usando el Ensayo de Arroz Baby Rosset (BRR, por sus

siglas en inglés). Se seleccionaron diversas formulaciones con diversas combinaciones de agentes tamponantes para los experimentos de neutralización de ácido y los resultados se dan en la tabla a continuación a diversos valores de pH en los

5 que las condiciones se simularon como estómago de bebé. Las formulaciones de vacuna se diluyeron con agua para inyección hasta 10 ml, después se añadieron 4 ml de HCl 0,1 N, después se añadieron 0,5 ml de HCl 0,1 N por minuto hasta que el pH alcanzó 4,0. La ANC se define como el tiempo en minutos tomado

10 para mantener el pH por encima de 4,0.

Formulación de vacuna 4A	Antígeno 116E de Rotavirus título diana de 10 ⁶ UFF/0,5ml; 10 % SPG y DMEM (cantidad suficiente)
Formulación de vacuna 4B	Antígeno 116E de Rotavirus título diana de 10 ⁶ UFF/0,5ml; 10 % SPG y DMEM (cantidad suficiente) añadido a 2,5 ml de tampón Citrato Bicarbonato
Formulación de vacuna 4C	Antígeno 116E de Rotavirus título diana de 10 ⁶ UFF/0,5ml, combinación de al menos 2 azúcares (sacarosa al 50 % y trehalosa al 0,5 %) e hidrolizado de lactalbúmina al 0,5 %. (Muestra 8 a continuación).
Formulación de vacuna 4D	Antígeno 116E de Rotavirus título diana de 10 ⁶ UFF/0,5ml, combinación de al menos 2 azúcares (sacarosa - 40 %, Trehalosa - 0,5 %), 0,5 % de hidrolizado de lactalbúmina, 0,35 % de albúmina de suero humano y tampón fosfato 1,1 M.

Tabla 6: Detalles de formulaciones de vacuna:

15 Las siguientes observaciones (Tabla 7) se realizaron para el ensayo de arroz Baby Rosset realizado con las formulaciones de vacuna 4A a 4D listadas anteriormente.

Formulaciones de vacuna	pH inicial	pH después de la adición de ácido	Volumen de HCl 0,1 N añadido	Valores del ensayo de arroz Baby Rosset	Títulos de vacuna iniciales en UFF/0,5 ml	Títulos de vacuna en UFF/0,5 ml después de 1 hora
Formulación de vacuna 4A a -20 °C sin tampón de dosis de 0,5 ml.	7,48	1,95	4,0 ml	BRR de menos de 0 minutos (caída inmediata de pH)	$10^{4,83}$	$10^{3,83}$
Formulación de vacuna 4B a -20 °C con 2,5 ml de tampón citrato bicarbonato de dosis de 0,5 ml.	8,35	4,22	10,0 ml	BRR de 12 minutos	$10^{6,17}$	$10^{6,15}$
Formulación de vacuna 4C a 5±3 °C sin tampón de dosis de 0,5 ml.	7,28	3,98	5,0 ml	BRR de 2 minutos	$10^{5,30}$	$10^{5,02}$
Formulación de vacuna 4D a 5±3 °C con tampón de dosis de 1,5 ml o 2 ml.	6,75	4,33	10,5 ml	BRR de aproximadamente 13 minutos	$10^{6,12}$	$10^{6,11}$

Tabla 7: Análisis de arroz Baby Rosset en comparación con formulaciones de vacuna de rotavirus con y sin tampón.

Conclusión: Por lo tanto a partir de la tabla anterior los
5 presentes inventores descubrieron que, incluso si para la
formulación de vacuna 4A anterior que muestra una caída
inmediata de pH 7,48 a pH 1,95, el título de la vacuna se
retiene de $10^{4,83}$ UFF/0,5 ml y $10^{3,83}$ UFF/0,5 ml. De la misma
manera, el título de la vacuna también se retiene en el caso
10 de la formulación de vacuna 4C entre $10^{5,30}$ y $10^{5,02}$ UFF/0,5 ml
donde el pH cae de 7,28 a pH 3,98 en 2 minutos. Por lo tanto,
incluso si el valor BRR es solamente 2 minutos, el título de
la vacuna se retiene bastante, es decir, $10^{5,02}$ UFF/0,5. Esta
cantidad grande de título de vacuna es suficiente para la
15 generación de respuesta inmune y de esta manera conferir
protección y prevención de gastroenteritis rotavírica en bebés
humanos.

Realización 4: Prueba clínica sin tampón para ROTAVAC® que
20 **comprende la cepa 116E de rotavirus**

Hipótesis y fundamentos del estudio

Se asume que la transmisión natural del rotavirus ocurre
25 por vía fecal-oral. Los rotavirus en general son lábiles a
ácido y se cree que el ambiente ácido afecta a la viabilidad
del virus.

Dada su naturaleza lábil a ácido de los rotavirus, son
30 también eficientes infectando ubicuamente a mamíferos, la
mayoría de los cuales tienen valores de pH gástricos alrededor

de 2. Una posibilidad es que el estómago del bebé humano pueda ser de alguna forma más permisivo para la supervivencia del rotavirus que el estómago adulto, ya que los niveles de pH gástricos del bebé tienden a ser aproximadamente 3,2 en comparación con adultos a aproximadamente 1,0. Esto podría contar para el hecho de que el 60 al 90 % de las enfermedades de rotavirus humanas ocurren en bebés por debajo de la edad de 3 años.

10 Diseño del estudio

Para probar esta hipótesis se llevó a cabo una prueba controlada aleatorizada multicentro grande para evaluar y comparar la respuesta inmune a la vacuna en sujetos que reciben ROTAVAC con tampón citrato bicarbonato y aquellos que reciben ROTAVAC sin el tampón.

En consecuencia, el estudio incluyó los tres siguientes grupos de tratamiento:

20

- Grupo I (recibió ROTAVAC® en 5 minutos antes de la administración de 2,5 ml de tampón),
- Grupo II (recibió ROTAVAC® sin tampón),
- Grupo III (recibió ROTAVAC® inmediatamente mezclado con 2,5 ml de tampón antes de la administración).

25

El investigador del estudio y los asesores de seguridad (coordinadores del estudio) eran ciegos a la asignación del grupo de tratamiento. La ceguera se logró por una enfermera de estudio que administró la vacuna según el grupo de tratamiento asignado. Todos los sujetos recibieron 3 dosis de la vacuna

30

dada con una separación de 4 semanas. La respuesta inmune a la vacuna se ensayó 4 semanas después de la tercera dosis de vacuna (día 84) y se comparó con el valor basal (día 0). La inmunogenicidad se ensayó en términos de Títulos de media geométrica (GMT, por sus siglas en inglés) de IgA anti rotavirus en suero y seroconversión (número de veces de elevación en los niveles de anticuerpo desde la pre-vacunación hasta la post vacunación) en los grupos de tratamiento.

10 **Resultados y conclusiones del estudio**

La respuesta inmune post vacunación fue comparable con la respuesta de IgA anti rotavirus sin diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de tratamiento. De manera importante, la seroconversión y los GMT logrados en el grupo II (ROTAVAC® administrado sin tampón) fueron similares a aquellos en los otros dos grupos de tratamiento donde se administró ROTAVAC® con tampón.

Los GMT de IgA anti-rotavirus post vacunación en el grupo donde se administró ROTAVAC sin tampón fueron 20,7 U/ml en comparación con 19,6 U/ml y 19,2 U/ml en los dos grupos que recibieron tampón antiácido 5 minutos antes de la vacuna y simultáneamente mezclado con la vacuna respectivamente (Tabla 8). Las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas ($p>0,05$, prueba de la T de Student).

Tabla 8: Títulos medios geométricos y 95 % de CI para los resultados (día 0 y día 84)

Visita	Grupo I (N = 290)		Grupo II (N = 287)		Grupo III (N = 286)	
	GMT	95 % CI	GMT	95 % CI	GMT	95 % CI

Día 0	10,5	(9,4, 11,7)	10,8	(9,7, 11,9)	10,2	(9,2, 11,3)
DÍA 84	19,6	(17,0, 22,7)	20,7	(17,9, 24,0)	19,2	(16,8, 22,1)

N = Número de sujetos evaluado en cada grupo; GMT = Media geométrica; 95 % de CI (LL, UL) = Intervalos de confianza (Límite inferior, Límite superior)

5

De forma similar, la seroconversión de cuatro veces observada en los grupos que recibieron ROTAVAC® sin tampón antiácido y con antiácido fue similar a 29,2 %, 24,5 % y 25,1 %, respectivamente (Tabla 9). Además, el límite inferior del intervalo de confianza del 95 % de la diferencia de la seroconversión (2 veces) entre los grupos de tratamiento fue >-10 %, indicando no inferioridad en la respuesta inmune lograda con los tres regímenes de tratamiento (tabla 10).

10

15

Tabla 9: Seroconversión y 95 % de CI (2, 3 o 4 veces cambio en los títulos de anticuerpos) entre el valor basal y el día 84 post-vacunación

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

20

N = Número de sujetos evaluado en cada grupo; (95 % de CI) = Intervalos de confianza (Límite inferior, Límite superior)

Tabla 10: Diferencia en 2 % veces de seroconversión después de la vacunación en los grupos de tratamiento

% 2 veces Seroconversión post vacunación (día 84)						
	Grupo I (N = 290)		Grupo II (N = 287)		Grupo III (N = 286)	
	%	95 % CI	%	95 % CI	%	95 % CI
Día 84	30,7	(25,7, 36,2)	35,2	(29,9, 40,9)	33,5	(28,3, 39,2)
Diferencia en el % de seroconversión con 95 % CI 2-lados, Prueba de Chi-Cuadrado)						
Grupo				% (95 % CI de diferencia)		
Grupo I Vs Grupo II				4,5 (-3,5, 12,5)		
Grupo II Vs Grupo III				1,6 (-6,5, 9,7)		
Grupo I Vs Grupo III				2,9 (-4,7, 10,5)		

5 La reactogenicidad y la seguridad con respecto a los eventos adversos solicitados y no solicitados fueron comparables a lo largo de los tres grupos sin diferencia estadísticamente significativa. La vacuna ROTAVAC® se toleró bien en los tres grupos de tratamiento que recibieron la vacuna con o sin el tampón antiácido.

10

Realización 5: Nuevas formulaciones de rotavirus 116E

Datos de estabilidad de formulaciones líquidas ORV 116E a 37 °C, 25 °C y 2-8 °C

15 Las formulaciones de vacuna de rotavirus de un volumen de dosis de 0,5 ml sin tampón (muestras 1 a 12, 14 a 16) y con tampón mezclado a 0,5 ml de volumen de dosis (muestra 13) se han examinado durante un periodo de tiempo prolongado que varía de un periodo hasta 5 años, se proporcionan a continuación. Los detalles de las diversas formulaciones se proporcionan a continuación junto con sus estabilidades a 37 °C durante hasta

20

4 semanas, 25 °C durante al menos 6 meses y para 5±3 °C durante hasta 2 años a 5 años. Los estudios establecen que las formulaciones de vacuna de rotavirus sin tampón a volúmenes de dosis de 0,5 ml también son estables por naturaleza durante periodos de tiempo prolongados a temperaturas refrigeradas durante al menos 2 años. Las formulaciones de vacuna de rotavirus también se encuentran ser estables durante un periodo de 5 años a temperaturas refrigeradas igualmente.

10 La muestra 1 se formula conteniendo rotavirus 116E, sacarosa al 50 %, lactosa al 0,5 %, HSA al 0,5 % e hidrolizado de lactalbúmina al 0,05 %.

Estabilidad de la Muestra 1:

15

Temp	0 días	1M	2M	3M	6M	9M	12M	24M	36M	60M
5±3 °C	6,02	6,0			6,43		6,21	6,16	6,16	6,07
25 °C	6,02	6,07	5,81	5,9	5,51	4,65				
37 °C	6,02	5,32	2,63							

La muestra 2 se formula conteniendo rotavirus 116E, sacarosa al 50 %, trehalosa al 0,5 %, HSA al 0,5 % e hidrolizado de lactalbúmina al 0,05 %.

20

Estabilidad de la Muestra 2:

Temp	0 días	1M	2M	3M	6M	9M	12M	24M	36M	60M
5±3 °C	6,09	6,14			6,19		6,07	6,10	6,05	6,01
25 °C	6,09	6,02	6,06	5,63	5,51	2,48				
37 °C	6,09	5,47	3,23							

La muestra 3 se formula conteniendo rotavirus 116E, 25 sacarosa al 50 %, trehalosa al 1,0 %, HSA al 0,5 % e hidrolizado

de lactalbúmina al 0,5 %.

Estabilidad de la Muestra 3:

Temp	0 días	1M	2M	3M	6M	9M	12M	24M	36M	60M
5±3 °C	6,22	6,24			6,26		6,14	6,20	6,13	6,04
25 °C	6,22	6,18	6,15	5,80	5,34	2,03				
37 °C	6,22	5,35	3,22							

5

La muestra 4 se formula conteniendo rotavirus 116E, sacarosa al 40 %, lactosa al 0,5 % e hidrolizado de lactalbúmina al 1,0 %.

10 Estabilidad de la Muestra 4:

Temp	0 días	1M	2M	3M	6M	9M	12M	15M	24M	60M
5±3 °C	6,19	6,18			6,08		6,21	6,24	6,12	
25 °C	6,19	5,66	5,10	4,8	3,01					
37 °C	6,19	4,23	2,01							

La muestra 5 se formula conteniendo rotavirus 116E, sacarosa al 40 %, maltosa al 5,0 % e hidrolizado de lactalbúmina al 1,0 %.

15

Estabilidad de la Muestra 5:

Temp	0 días	1M	2M	3M	6M	9M	12M	15M	24M	60M
5±3 °C	6,35	6,37			6,18		6,01	6,17	6,08	
25 °C	6,35	5,89	5,11	4,77	2,43					
37 °C	6,35	5,31	3,58							

20 La muestra 6 se formula conteniendo rotavirus 116E, sacarosa al 40 %, trehalosa al 0,5 % e hidrolizado de

lactalbúmina al 1 %.

Estabilidad de la Muestra 6:

Temp	0 días	1M	2M	3M	6M	9M	12M	15M	24M	60M
5±3 °C	6,19	6,15			6,10		6,03	6,22	6,13	
25 °C	6,19	5,87	5,43	5,12	3,25					
37 °C	6,19	4,02	2,52							

5

La muestra 7 se formula conteniendo rotavirus 116E, sacarosa al 40 %, trehalosa al 1,0 % e hidrolizado de lactalbúmina al 1,0 %.

10 Estabilidad de la Muestra 7:

Temp	0 días	1M	2M	3M	6M	9M	12M	15M	24M	60M
5±3 °C	6,34	5,79			6,00		5,55	6,07	6,09	
25 °C	6,34	6,07	5,81	5,9	5,51	4,65				
37 °C	6,34	5,32	2,63							

La muestra 8 se formula conteniendo rotavirus 116E, sacarosa al 50 %, trehalosa al 0,5 % e hidrolizado de lactalbúmina al 0,05 %.

15

Estabilidad de la Muestra 8:

Temp	0 días	1M	2M	3M	6M	15M	18M	24M	36M	60M
5±3 °C	6,34	6,34			6,33	6,31	6,24	6,14	6,08	
25 °C	6,34	6,32	6,14	6,01	5,25					
37 °C	6,34	5,11	4							

20

La muestra 9 se formula conteniendo rotavirus 116E,

37
sacarosa al 70 %, trehalosa al 0,5 %.

Estabilidad de la Muestra 9:

Temp	0 días	1M	2M	3M	6M	15M	18M	24M	36M	60M
5±3 °C	6,38	6,31			6,23	6,44	6,35	6,26	6,18	
25 °C	6,38	6,41	6,35	6,23	5,57					
37 °C	6,38	5,07	4,01							

5

La muestra 10 se formula conteniendo rotavirus 116E, sacarosa al 50 %, lactosa al 0,5 %, maltosa al 0,5 %, HSA al 0,5 % e hidrolizado de lactalbúmina al 0,05 %.

10 Estabilidad de la Muestra 10:

Temp	0 días	1M	2M	3M	6M	15M	18M	24M	36M	60M
5±3 °C	6,25	6,15			6,03	6,34	6,08	6,12	6,11	6
25 °C	6,25	6,14	6,27	6,12	5,88					
37 °C	6,25	5,02	4,35							

La muestra 11 se formula conteniendo rotavirus 116E, sacarosa al 50 %, trehalosa al 0,5 %, maltosa al 0,5 %, HSA al 0,5 %.

15

Estabilidad de la Muestra 11:

Temp	0 días	1M	2M	3M	6M	9M	12M	24M	36M	60M
5±3 °C	6,68	6,62	6,95	6,84	6,64	6,65	6,37	6,72	6,05	
25 °C	6,68	6,50	6,20	6,04	5,32	4,47				
37 °C	6,68	6,10	5,58	4,26						

20

La muestra 12 se formula conteniendo rotavirus 116E, sacarosa al 50 %, trehalosa al 0,5 %, HSA al 0,5 % e hidrolizado

de lactalbúmina al 0,05 %.

Estabilidad de la Muestra 12:

Temp	0 días	1M	2M	3M	6M	9M	12M	24M	36M	60M
5±3 °C	6,62	6,76	6,98	7,00	6,86	6,74	5,99	6,46	6,17	
25 °C	6,62	6,46	6,42	5,99	5,13	3,25				
37 °C	6,62	5,58	5,06							

5

La muestra 13 se formula conteniendo rotavirus 116E, sacarosa (40 %), trehalosa (0,5 %), lactosa (5 %), rHSA (0,5 %), LAH (1 %) y tampón mixto (acetato de amonio + bicarbonato de amonio + ortofosfato de diamonio).

10

Estabilidad de la Muestra 13:

Temp	0 días	1M	2M	3M	6M	9M	12M	24M	36M	60M
5±3 °C	6,61	6,59	6,58	6,60	6,53	6,54	6,18	6,01	5,83	
25 °C	6,61	6,46	6,44	5,79	5,25	4,15				
37 °C	6,61	5,56	5,01							

Estabilidad de la Muestra 13 a -20 °C:

15

Temp	0 días	1M	2M	3M	6M	9M	12M	24M	36M	60M
-20 °C	6,61	6,59	6,59	6,56	6,54	6,52	6,21	6,11	6,13	6,09

Las muestras 14, 15 y 16 se formulan con rotavirus 116E, SPG al 10 % disuelto en DMEM. Las muestras 14, 15 y 16 se mantienen a -20 °C y se comprueba la estabilidad durante 60 meses. Las formulaciones de vacuna 13, 14 y 15 se encuentran ser muy estables a -20 °C durante un periodo de al menos 5 años.

20

Muestra de vacuna	0 Días	3M	6M	9M	12M	24M	36M	48M	60M
Muestra 14 (10 ^{4,0} FFU/0,5 ml)	4,25	4,01	4,08	4,15	4,25	4,02	4,18	4,12	4,08
Muestra 15 (10 ^{5,0} FFU/0,5 ml)	5,55	5,42	5,68	5,37	5,77	5,89	5,32	5,40	5,32
Muestra 16 (10 ^{6,0} FFU/0,5 ml)	6,12	6,12	6,06	6,33	6,36	6,27	6,15	6,11	6,05

De esta manera, se establece que diversas composiciones de vacuna de rotavirus de 0,5 ml de volumen de dosis son estables a -20 °C durante 5 años, 2-8 °C durante 2 años, 25 °C durante 6 meses y 37 °C durante 1 semana. Independientemente de la formulación de vacuna, la vacuna de rotavirus a un volumen de dosis de 0,5 ml a 1 ml se encuentra también ser estable a ácido, como se ejemplifica en la realización 3 así como a un intervalo de pH de 2-4. Por lo tanto, los presentes solicitantes desean mencionar que independientemente de los detalles de la composición de la vacuna, cualquier vacuna de rotavirus que comprende el rotavirus 116E atenuado vivo es capaz de soportar el ambiente ácido fuerte en el estómago de bebé humano y producir la respuesta inmune requerida contra las infecciones de rotavirus. Las formulaciones de vacuna presentadas en esta solicitud de patente solamente se entienden para los fines de explicar la amplitud y la profundidad de la invención. No es práctico proporcionar todos los detalles de formulación de vacunas posibles por el solicitante, aunque el solicitante ha dado numerosas estrategias de formulación en la Realización 3, el Ejemplo 3 y la Realización 5. Por lo tanto,

todas las variaciones obvias posibles por un experto en la materia para la estrategia de formulación de vacunas de rotavirus que comprenden la cepa 116E de rotavirus también se abarcan bajo la presente invención. Ha de entenderse e

5 interpretarse en consecuencia que las composiciones de vacuna que no se incluyen específicamente en la presente solicitud de patente que comprende el rotavirus 116E atenuado vivo también están abarcadas bajo el alcance de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna de rotavirus sin tampón, estable a ácido, que comprende la cepa 116E de rotavirus, en la que dicha
5 formulación de vacuna es capaz de provocar una respuesta inmune contra el rotavirus que es igual o mayor que la respuesta inmune generada por cualquier vacuna de rotavirus convencional con un tampón.

10 2. La vacuna de rotavirus como se reivindica en la reivindicación 1, en la que la formulación está libre de cualquier clase de tampón para proteger el antígeno de rotavirus de la acidez del estómago.

15 3. La vacuna de rotavirus como se reivindica en la reivindicación 1, en la que la dicha formulación de vacuna es estable en el estómago de pH 2 a pH 4 sin pérdida de título y es capaz de aguantar la acidez del estómago en seres humanos durante un periodo de al menos 20 minutos sin ningún suplemento
20 de antiácido o tampón.

4. La vacuna de rotavirus como se reivindica en la reivindicación 1, en la que la vacuna no requiere la administración de ningún antiácido o tampón, pre o post
25 administración de la vacuna, al sujeto.

5. Una vacuna de rotavirus que comprende el rotavirus 116E, en donde el volumen de dosis por vacuna unitaria es de hasta 1 ml solamente.

30

6. La vacuna de rotavirus como se reivindica en la

reivindicación 5, en donde el volumen de dosis por vacuna unitaria es de 0,8 ml por vacuna unitaria.

7. La vacuna de rotavirus como se reivindica en la
5 reivindicación 5, en la que el volumen de dosis por vacuna unitaria es 0,5 ml por vacuna unitaria.

8. La vacuna de rotavirus como se reivindica en las
reivindicaciones 1 y 5, en donde la vacuna es estable a -20 °C
10 durante al menos 60 meses.

9. La vacuna de rotavirus como se reivindica en las
reivindicaciones 1 y 5, en donde la vacuna es estable a 2-8 °C
durante al menos 36 meses, a 25 °C durante 6 meses y a 37 °C
15 durante al menos 4 semanas.

10. La vacuna de rotavirus como se reivindica en las
reivindicaciones 5 y 6, es con o sin un tampón.

20 11. La formulación de vacuna como se reivindica en la
reivindicación 7, es con o sin un tampón.

12. La vacuna de rotavirus como se reivindica en las
reivindicaciones 1 y 5, en la que dicha respuesta inmune se
25 genera en términos de seroconversión de cuatro veces post
vacunación bien similar o bien mayor que aquella de la
seroconversión lograda con la formulación de vacuna, bien en
presencia de tampones o bien mediante la administración de
antiácidos.

30

13. La vacuna de rotavirus como se reivindica en las

reivindicaciones 1 y 5, en donde la vacuna comprende además una combinación de azúcares, hidrolizado de lactalbúmina y albúmina de suero humano recombinante.

5 14. La vacuna de rotavirus como se reivindica en la reivindicación 13, en la que la combinación de azúcares comprende una combinación de sacarosa, lactosa y trehalosa.

10 15. La vacuna de rotavirus como se reivindica en las reivindicaciones 1 y 5, en la que la formulación es una formulación de vacuna líquida, oral.

16. Un método para generar una respuesta inmune en un sujeto contra rotavirus, que comprende administrar oralmente 0,5 ml
15 de una formulación de vacuna de rotavirus estabilizada sin ningún antiácido ni tampón, comprendiendo la dicha formulación una cepa 116E de rotavirus, una combinación de azúcares seleccionados de sacarosa, lactosa y trehalosa, hidrolizado de lactalbúmina, albúmina de suero humano recombinante, sin
20 presencia de ninguna formulación tamponante en la dicha formulación de vacuna de rotavirus.

17. El método de la reivindicación 16, en el que la dicha formulación de vacuna de rotavirus no requiere la
25 administración de ningún antiácido ni tampón, pre o post administración de la vacuna, al sujeto.

18. El método de la reivindicación 16, en el que la dicha formulación de vacuna de rotavirus es capaz de aguantar la
30 acidez del estómago en seres humanos durante un periodo de al menos 20 minutos entre un intervalo de pH 2 a pH 4.

19. El método de la reivindicación 16, en el que la dicha formulación de vacuna de rotavirus es estable durante un periodo de al menos 60 meses a -20°C .

5

20. El método de la reivindicación 16, en el que la dicha formulación de vacuna de rotavirus es estable durante un periodo de al menos 3 años a $2-8^{\circ}\text{C}$, un periodo de al menos 6 meses a 25°C y durante un periodo de al menos 4 semanas a 37°C .

10

21. El método de la reivindicación 16, en el que la dicha formulación de vacuna cuando se administra oralmente a un sujeto sin ningún antiácido ni tampón, es capaz de generar respuestas inmunes en términos de seroconversión de cuatro veces post vacunación bien similar o bien mayor que aquella de la seroconversión lograda con la formulación de vacuna, bien en presencia de tampones o bien mediante la administración de antiácidos.

15

45
RESUMEN

**UNA VACUNA DE ROTAVIRUS SIN TAMPÓN, DE VOLUMEN DE DOSIS BAJO
Y ESTABLE AL ÁCIDO**

5

Se desvela una vacuna de rotavirus sin tampón, estable al ácido, de volumen de dosis bajo. La vacuna está disponible en un volumen de dosis de menos de 1 ml por dosis para su administración oral y está sin ningún tampón. La vacuna tampoco
10 requiere pre o post administración de ningún antiácido en el momento de la administración oral de la vacuna al sujeto para neutralizar el ácido del estómago. La vacuna ejemplifica una caída nominal en la titulación de la vacuna a pH 2-4 durante un período de tiempo de 30 minutos. La vacuna es estable a -20
15 °C durante al menos 60 meses.