



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 157 219**

51 Int. Cl.:
A61K 39/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **93910244 .8**

96 Fecha de presentación : **20.05.1993**

97 Número de publicación de la solicitud: **0652771**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.05.1995**

54 Título: **Procedimiento de producción de una vacuna antitetánica.**

30 Prioridad: **31.07.1992 GB 9216351**

45 Fecha de publicación de la mención y de la
traducción de patente europea: **16.08.2001**

45 Fecha de la publicación de la mención de la
patente europea modificada BOPI: **26.10.2010**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente
europea modificada: **26.10.2010**

73 Titular/es: **EVANS VACCINES LIMITED**
Floreys House, Robert Robinson Avenue
The Oxford Science Park
Oxford, Oxfordshire OX4 4GA, GB

72 Inventor/es: **Sheppard, Anthony James y**
Knight, Peter Anthony

74 Agente: **Ungria López, Javier**

ES 2 157 219 T5

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de una vacuna antitetánica.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de toxina del tétanos para su utilización en vacunas del tétanos.

10 La vacuna del tétanos ya existente se produce a partir de un cultivo en botella de 7 días de *Clostridium tetani* que se inactiva ("se transforma en toxoide") mediante la adición de formaldehído. El formaldehído se añade en forma de formalina. El toxoide se purifica para su utilización en una vacuna mediante un fraccionamiento salino a una actividad específica de aproximadamente 1.200 unidades de floculación (Limes flocculationis, Lf)/mg de nitrógeno proteínico (PN), que es equivalente a una pureza del 30% al 40%.

15 Se han realizado intentos para aumentar la actividad específica de la vacuna mediante purificación del toxoide utilizando inmuoadsorbentes (Hughes *et al*, J. Appl. Bact. 37, 603-621, 1974). Esto, sin embargo, dio como resultado únicamente un aumento limitado, a 1.600 Lf/mg PN. Dawson y Mauritzen (Aust. J. Biol. Sci., 1969, vol. 22, págs. 12-17) dan a conocer estudios sobre la interacción del formaldehído con la toxina del tétanos que incluyen la unión de formaldehído en presencia de los aminoácidos leucina y lisina durante la destoxificación de la toxina del tétanos. La publicación Bacterial Vaccines (Compilador R. Germanier, Academic Press 1984, págs. 48-50) da a conocer procedimientos que se utilizan en la destoxificación de la toxina del tétanos para su utilización en vacunas, y especialmente vacunas para seres humanos. El documento WO-A-91/12.020 da a conocer un nuevo antígeno tóxico destoxificado, especialmente la toxina de B. pertussis, obtenida mediante una destoxificación parcial utilizando glutaraldehído seguido de hacer reaccionar el antígeno parcialmente destoxificado con formalina en presencia de aminoácidos seleccionados. Se dice que la toxina de B. pertussis destoxificada es estable frente a la reversión a la toxicidad. El documento GB-A-969.772 da a conocer un procedimiento para producir un toxoide a partir de una toxina bacteriana purificada, especialmente toxina de la difteria purificada, mediante tratamiento de la toxina en un medio acuoso con formaldehído en presencia de una diamina alifática con un peso molecular por debajo de 200 que contiene un grupo amino primario o secundario. Las diaminas preferidas son lisina y etilendiamina.

30 Los presentes solicitantes han ideado ahora un nuevo procedimiento para la preparación de toxoide del tétanos. En lugar de preparar el toxoide a partir de la toxina y purificar a continuación el toxoide, los presentes solicitantes purificaron la toxina y a continuación prepararon el toxoide a partir de la toxina purificada. Sorprendentemente, sin embargo, se encontró que muchas de dichas preparaciones eran inestables, mostrando grados variables de reversión a toxicidad cuando se almacenaban a una temperatura de 37°C en ausencia de formalina.

35 Los presentes solicitantes enfocaron la cuestión añadiendo aminoácidos a la reacción de preparación del toxoide a diferentes concentraciones, variando asimismo la concentración de formalina, el pH y los tiempos de incubación. La reversión a toxicidad fue difícil de evitar, excepto a expensas de relaciones bajas de poder de combinación total (TCP)/Lf que dieron como resultado preparaciones de una baja inmunogenicidad. Únicamente bajo condiciones 40 específicas se pudieron obtener preparaciones estables y muy inmunogénicas.

De acuerdo con ello, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de toxoide del tétanos, el cual procedimiento comprende incubar toxina del tétanos purificada que presenta una actividad específica de 2.000 Lf/mg PN o superior y un contenido de Lf de 250 Lf/ml o superior, con el 0,2 al 1% (v/v) de formaldehído en presencia de lisina 0,005 a 0,25 M durante 24 a 32 días a un pH de 6,0 a 8,0 y una temperatura de 30 a 45°C, , en el que la toxina purificada se preincuba con el formaldehído en ausencia de la lisina durante 20 a 40 minutos a una temperatura de 35 a 40°C.

50 La toxina del tétanos se obtiene típicamente a partir de un cultivo de *Clostridium tetani*. Se puede emplear cualquier cepa apropiada de *Cl. tetani*. La toxina se puede purificar a partir de un caldo de fermentación, centrifugando en primer lugar el caldo y clarificando a continuación el material sobrenadante del cultivo, por ejemplo mediante una filtración de dos etapas. El material sobrenadante clarificado se puede concentrar. El material sobrenadante se puede someter seguidamente a una diálisis para eliminar pequeñas especies moleculares cargadas y a continuación a una cromatografía de intercambio iónico.

55 La toxina purificada presenta un contenido de Lf de 250 Lf/ml o superior, por ejemplo de 250 a 500 Lf/ml. Si el contenido de Lf es inferior a 250 Lf/ml, la toxina se puede volver a tratar mediante una etapa de concentración adicional para aumentar la proporción de toxina.

60 La actividad específica de la toxina se puede determinar valorando el contenido de nitrógeno proteínico (PN) del material purificado y calculando la relación de Lf a PN. La toxina purificada presenta una relación de Lf a PN de 2.000 Lf/mg PN o superior, por ejemplo de 2.000 a 3.000 Lf/mg PN o de 2.000 a 2.800 Lf/mg PN. Si la actividad específica de la toxina es inferior a 2.000 Lf/mg PN, el material purificado se puede volver a tratar a través de una columna intercambiadora de iones. Una actividad específica de 2.000 Lf/mg PN es equivalente a una pureza de aproximadamente el 70%. Se ha informado de que una toxina pura al 100% presenta una actividad específica de 3.000 a 3.200 Lf/mg PN.

65 La pureza de la toxina se puede determinar alternativa o adicionalmente mediante un análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y/o por electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE).

ES 2 157 219 T5

La pureza se determina con preferencia mediante una HPLC, con lo cual los picos eluidos se integran y el área de los picos relacionados con la toxina se expresa en forma de un porcentaje del área total de los picos integrados. Un análisis por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras separa la molécula de toxina en sus cadenas constituyentes pesadas (100 kD) y ligeras (50 kD). Las dos bandas se pueden identificar después de una tinción y sus intensidades combinadas, tal como se determina por densitometría, se expresan en forma de un porcentaje de las bandas totales.

Si el análisis por HPLC y/o el análisis por SDS-PAGE muestran que la toxina presenta una pureza inferior al 70%, el material se puede volver a tratar a través de una columna intercambiadora de iones para aumentar la pureza. Con preferencia, por consiguiente, la toxina presenta una pureza del 70% o superior, por ejemplo una pureza del 70% al 100%, tal como se determina por HPLC y/o SDS-PAGE. La toxina puede presentar una pureza del 80% o superior o una pureza del 90% o superior.

La toxina del tétanos purificada se transforma en toxoide mediante el 0,2 al 1% (v/v) de formaldehído en presencia de lisina 0,005 a 0,25 M. Se añade típicamente una solución tampón, tal como una solución tampón de sal sódica de ácido borosuccínico, para ajustar el pH de la solución de toxina purificada a un valor de 6,0 a 8,0, con preferencia de 6,5 a 7,5. La concentración de la toxina purificada en solución se ajusta típicamente a un valor de 150 a 300 Lf/ml, con preferencia aproximadamente 200 Lf/ml.

La toxina purificada se preincuba en primer lugar con el formaldehído en ausencia de lisina. La preincubación tiene lugar durante 20 a 40 minutos, por ejemplo aproximadamente 30 minutos. La temperatura de preincubación es de 35 a 40°C, por ejemplo aproximadamente 37°C.

Se añade a continuación lisina. La lisina es típicamente L-lisina, tal como monohidrocloreto de L-lisina. Se puede añadir una solución tampón, tal como una solución tampón de bicarbonato de sodio, para ajustar el pH. La incubación de la toxina purificada con el formaldehído y la lisina tiene lugar con preferencia durante aproximadamente 28 días. La temperatura de incubación es preferentemente de 35 a 40°C, por ejemplo aproximadamente 37°C. La concentración de formaldehído es con preferencia del 0,25 al 0,5% (v/v). La concentración de lisina es preferentemente 0,05 a 0,2 M. Las condiciones adecuadas son las siguientes:

- 0,25% (v/v) de formaldehído con L-lisina 0,05 a 0,1 M, y
- 0,5% (v/v) de formaldehído con L-lisina 0,1 a 0,2 M.

El toxoide resultante se purifica a continuación. Se eliminan el formaldehído y la lisina residuales. El toxoide se puede concentrar por consiguiente mediante ultrafiltración, se dializa para eliminar el formaldehído y la lisina residuales y se esteriliza mediante una filtración con membrana. Con preferencia, la relación de Lf a PN del toxoide es de 2.000 Lf/mg PN o superior, por ejemplo de 2.000 a 3.000 Lf/mg PN o de 2.000 a 2.800 Lf/mg PN. Asimismo preferentemente, el toxoide presenta una pureza del 70% o superior, por ejemplo del 70% al 100%, tal como se determina por HPLC y/o SDS-PAGE. El toxoide puede presentar por consiguiente una pureza del 80% o superior o del 90% o superior, tal como se determina por HPLC y/o SDS-PAGE. Si la relación de Lf a PN es inferior a 2.000 Lf/mg PN y/o si el toxoide presenta una pureza inferior al 70% tal como se determina por HPLC y/o SDS-PAGE, el toxoide se puede volver a tratar a través de una columna intercambiadora de iones.

El toxoide del tétanos así producido no puede revertir por consiguiente a toxina cuando se almacena a una temperatura de 37°C durante 3 meses o más, con preferencia durante hasta 6 meses; presenta una actividad específica de 2.000 a 2.800 Lf/mg PN, por ejemplo de 2.400 a 2.700 Lf/mg PN; y presenta una potencia de 130 a 270 Unidades Internacionales (Iu)/3,5 Lf, por ejemplo de 200 a 250 Iu/3,5 Lf.

El toxoide resultante no revierte a toxicidad y es más inmunogénico que la vacuna ya existente. Se puede formular por consiguiente el toxoide con un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable para formar una composición de vacuna. El toxoide se puede mezclar con un disolvente fisiológicamente aceptable, tal como una solución salina fisiológica. Alternativamente, el toxoide se puede aplicar por precipitación o ser adsorbido por un excipiente mineral adecuado en una solución salina fisiológica u otra solución adecuada isotónica con la sangre. Dichas formulaciones se almacenan generalmente a una temperatura de 2 a 8°C antes de su utilización. Puede estar presente tiomorsal en la formulación de la vacuna. El toxoide puede formar parte de una vacuna de varios componentes, tal como una vacuna combinada de difteria-tétanos, o una vacuna combinada de difteria-tétanos-tos ferina.

Se puede inmunizar por consiguiente un ser humano contra el tétanos mediante la administración de una cantidad eficaz del presente toxoide del tétanos. Típicamente, la administración se realiza por vía intramuscular o subcutánea. En cualquier caso, la dosis inicial de toxoide administrado puede ser de 3 Lf a 10 Lf. Dicha dosis se puede repetir hasta dos veces a intervalos de 2 meses. Se puede administrar una dosis de refuerzo de 3 Lf a 10 Lf, 5 ó 10 años más tarde.

El siguiente Ejemplo ilustra la invención. Se proporcionan asimismo un Ejemplo de Referencia y Ejemplo Comparativos.

Ejemplo de Referencia

Preparación de toxina del tétanos purificada

Se cultivó la cepa CN 3911 de *Cl. tetani*, que consiste en un sub-cultivo de la cepa de Harvard de *Cl. tetani* (Mueller y Miller, J. Immunol. 50, 377-384, 1945), en un medio de Mueller modificado (Latham *et al.*, Appl. Microbiol. 10, 146, 1962). Más específicamente, se utilizó el 10% (v/v) de un cultivo de semillas de 48 horas para inocular, ya sea una botella estática o un fermentador controlado que contenía medio de Mueller modificado. En el caso del cultivo estático, se añadió polvo de aluminio al medio antes de la inoculación. El fermentador, un fermentador 151, se agitó a una velocidad de 50 rpm y se aspiró aire filtrado de 0,2 µM a través de la superficie del cultivo a un caudal de 500 ml/min. La fermentación en la botella estática o en el fermentador se continuó durante 4 a 7 días a una temperatura de $33 \pm 2^\circ\text{C}$.

El caldo de fermentación se separó mediante una centrifugación discontinua (6 x rotor de 1 litro) a 3.000 g durante 40 minutos. El material sobrenadante se clarificó adicionalmente mediante una filtración de dos etapas a través de un filtro de combinación de 1,2/0,8 µm y a continuación un filtro estéril de 0,2 µm.

El material sobrenadante del cultivo se concentró seguidamente diez veces utilizando una membrana de ultrafiltración con un punto de corte de 30 K y se dializó a continuación extensamente utilizando la misma membrana utilizando 10 volúmenes de una solución tampón [Tris 20 mM, NaCl 25 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,2 mM, pH 7,5]. Esto dio como resultado un aumento de la pureza de dieciocho veces tal como se determina por HPLC. Se encontró que la recuperación media a partir de esta etapa fue del 80%.

El material filtrado se cargó seguidamente en una columna de intercambio iónico de aniones (DEAE Sepharose Fast Flow). La columna se lavó con una solución tampón Tris 20 mM, pH 7,5. La toxina del tétanos se eluyó con NaCl 80 mM, solución tampón Tris, pH 7,5. El material eluido se filtró de manera estéril a través de un filtro estéril de 0,2 µm. El material así purificado se sometió a los siguientes ensayos.

(i) *Valoración del contenido de Lf*

Mediante este ensayo se observó la proporción de toxina del material de toxina purificado. Se tomaron para el ensayo aproximadamente 5 ml de material de toxina purificado. La muestra no se almacenó antes del ensayo. La determinación de Lf se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito por Ramon, G. (1922) "Sur une technique de titrage *in vitro* du serum anti-diphtherique". C. P. SOC. BIOL. (París) 86, 711-712. El contenido de Lf del material purificado fue de 250 a 500 Lf/ml.

(ii) *Valoración de la relación Lf: Nitrógeno proteínico*

Este ensayo determinó la pureza del material purificado. Se tomó para el ensayo una cantidad no inferior a 1 ml del material purificado. La muestra se almacenó a una temperatura de $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ si no se ensayaba inmediatamente. El contenido de nitrógeno proteínico (PN) se valoró utilizando la técnica de digestión de Kjeldahl (Kjeldahl J. (1888) C. R. CARLSBERG LABOR (Copenhague) 2, 1-12) después de una precipitación con ácido tricloroacético. La relación de Lf:PN fue de 2.000 a 3.000 Lf/mg PN.

(iii) *Determinación del perfil de HPLC mediante exclusión de tamaños*

Este ensayo aseguró que el perfil de HPLC de la toxina purificada se encontraba dentro de límites aceptables. Se tomó para el ensayo una cantidad no inferior a 1 ml del material purificado. La muestra se almacenó a una temperatura de $+4^\circ\text{C}$ antes del ensayo. Una muestra del material de toxina purificado se aplicó a una columna de filtración en gel de HPLC (TSK G 3000 SWx1). La separación de los componentes de la muestra se observa a 280 nm y se integran las áreas de los picos: Resultados de HPLC:

- pico 1 (tiempo de retención de 10,6 a 10,7 minutos) - monómero de toxina;
- pico 2 (tiempo de retención de 12,4 a 12,5 minutos - fragmento C de toxina; y
- pico 3 (tiempo de retención > 14 minutos) - contaminantes.

Las áreas integradas combinadas de los picos 1 y 2 fueron del 70 al 100% de las áreas integradas totales de los picos 1 a 3.

(iv) *Determinación del perfil de SDS-PAGE*

Este ensayo aseguró que el perfil de SDS-PAGE de la toxina purificada se encontraba dentro de límites aceptables. Se tomó para el ensayo una cantidad no inferior a 0,5 ml del material de toxina purificado. La muestra se almacenó a una temperatura de 4°C antes del ensayo. La muestra se examinó, después de una reducción utilizando mercaptoetanol, por SDS-PAGE mediante el procedimiento descrito por Laemili (Nature, 227, 680-685, 1970). El gel se exploró mediante un densitómetro y se integraron las áreas de los picos. Las bandas pesadas (100 kD) y ligeras (50 kD) de la

ES 2 157 219 T5

toxina representaron del 70 al 100% de las bandas totales teñidas con azul de Coomassie, calculadas a partir de las áreas integradas detectadas por densitometría.

Ejemplo

Preparación de toxoide a partir de toxina del tétanos purificada

La toxina del tétanos purificada procedente del Ejemplo de Referencia se diluyó con una cantidad suficiente de solución tampón de sal sódica de ácido borosuccínico (SBSA), pH 7,5 para proporcionar una concentración de toxina final de 200 Lf/ml. Se preparó toxoide a partir de partes alícuotas de la siguiente manera:

1. Se añadió el 0,25% (v/v) de formaldehído en forma de formalina a una parte alícuota y la mezcla se preincubó durante 30 minutos a una temperatura de 37°C. Se añadió posteriormente monohidrocloreto de L-lisina a una concentración final de 0,05 a 0,1 M en presencia de bicarbonato de sodio 0,1 M. El pH de la mezcla de reacción fue de 6,5 a 7,5 y se dejó que se desarrollara la formación de toxoide durante 28 días a una temperatura de 37°C ± 2°C.

2. Se añadió el 0,5% (v/v) de formaldehído en forma de formalina a otra parte alícuota y la mezcla se preincubó durante 30 minutos a una temperatura de 37°C. Se añadió posteriormente monohidrocloreto de L-lisina a una concentración final de 0,1 a 0,2 M, en presencia de bicarbonato de sodio 0,1 M. El pH de la mezcla de reacción fue de 6,5 a 7,5 y se dejó que se desarrollara la formación de toxoide durante 28 días a una temperatura de 37°C ± 2°C.

Se ensayó el contenido de Lf del material incubado tal como se ha descrito en el Ejemplo de Referencia. El material incubado se concentró por ultrafiltración con una membrana de ultrafiltración con un punto de corte de 30 K. El concentrado se dializó utilizando la misma membrana de 30 K, frente a una solución tampón de SBSA, pH 7,5, para eliminar el formaldehído y la lisina residuales. Se añadió tiomersal (ácido etilmercuritosalicílico, sal sódica) para proporcionar una concentración final de 0,1 g/litro ($2,5 \times 10^{-4}$ mol/litro) de tiomersal. La solución resultante se esterilizó mediante filtración con membrana (membrana de 0,2 µm). Se tomaron muestras y se ensayaron de la siguiente manera:

(i) Valoración del contenido de nitrógeno proteínico

Este ensayo se llevó a cabo como se ha descrito en el Ejemplo de Referencia. El resultado fue de 2.000 a 2.800 Lf/mg PN.

(ii) Valoración del poder de combinación total (TCP)

Este ensayo determinó el contenido de antígeno del toxoide del tétanos. El TCP es un término muy utilizado en el campo del tétanos, y se hace referencia al mismo en el manual de WHO (11, Apéndice T.10). Se define como el valor recíproco del volumen de toxoide que cuando se dializa se encuentra que es equivalente a una Unidad Internacional (WHO BGL/UNDP/77.1 Rev. 1). La calidad de los toxoides se puede medir mediante determinación de la relación de TCP (unidades de unión) a unidades de Lf, que deberá ser mayor que uno.

Se tomó para el ensayo una cantidad no inferior a 5,0 ml del toxoide. La muestra se almacenó a una temperatura de 5°C ± 3°C si no se ensayaba inmediatamente. Un intervalo adecuado de volúmenes es de 0,01 a 0,03 µl de material de ensayo y se distribuyeron en una serie de tubos 87 Unidades Internacionales (Iu)/ml de toxoide del tétanos de referencia que formaban una progresión geométrica corregida. Se añadió una dosis fija de 2 Iu/0,5 ml de solución de antitoxina del tétanos de referencia a cada tubo y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 60 minutos.

Se añadió un volumen de toxina del tétanos de ensayo a la mitad de la dosis de antitoxina y se dejó en reposo cada tubo durante 30 minutos. El contenido de cada tubo se inyectó por vía subcutánea a ratones que pesaban cada uno de 18 a 22 g. Se observaron los ratones durante 4 días, para vigilar signos de parálisis típica del tétanos.

Si tenía lugar la parálisis específica del tétanos en el transcurso de 3 días, el material de ensayo contenía una cantidad de toxoide del tétanos equivalente a más de la mitad de la dosis de antitoxina añadida. Si el ratón sobrevivía durante más de 3 días sin parálisis específica del tétanos, el material de ensayo contenía una cantidad de toxoide del tétanos equivalente a menos de la mitad de la dosis de antitoxina añadida. La aparición de parálisis específica del tétanos en el tercer día indicaba que el volumen de toxoide del tétanos que se tomó era exactamente equivalente a la mitad de la dosis de antitoxina añadida.

Se aceptaron los resultados como el promedio de dos ensayos, con la condición de que éstos no se diferenciaron en más del 20% del valor medio. Los resultados fueron de 200 a 350 u/ml.

(iii) Valoración del contenido de Lf

El contenido de Lf se determinó como se ha descrito en el Ejemplo de Referencia. Los resultados fueron de 150 a 250 Lf/ml.

ES 2 157 219 T5

(iv) *Determinación del perfil de HPLC*

El perfil de HPLC se determinó como se ha descrito en el Ejemplo de Referencia. El resultado fue una pureza del 70 al 100%.

(v) *Ensayo para determinar la reversión*

Este ensayo demostró la libertad de reversión del toxoide a toxina durante el almacenamiento o utilización, y satisface los requisitos de la WHO Technical Report Series N° 725, pág. 67. Se tomaron 10 ml de material toxoide dializado y se almacenaron a una temperatura de $5 \pm 3^\circ\text{C}$ hasta que se hubo valorado el contenido de Lf como se ha descrito anteriormente. La muestra se diluyó a 16 Lf/ml. La muestra diluida se mantuvo a una temperatura de 37°C . La muestra se ensayó para determinar la no toxicidad después de un almacenamiento durante 6 semanas, 2 meses y 3 meses. Se inocularon 5 ml de la muestra por vía subcutánea a cada uno de 2 cobayos sanos. Se observaron los animales durante 14 días para vigilar la aparición de muerte o signos de parálisis específica. No hubo ninguna evidencia de reversión a toxina.

(vi) *Caracterización de toxoide mediante movilidad electroforética*

Este ensayo predijo la potencia del material transformado en toxoide. Se tomaron para el ensayo 0,5 ml de material toxoide dializado. La muestra se almacenó a una temperatura de $5 \pm 3^\circ\text{C}$ si no se ensayaba inmediatamente. Se cubrieron placas de vidrio ($0,18 \text{ ml/cm}^2$) con el 1% (v/v) de agarosa en una solución tampón tris 60 mM, pH 8,6. Se sometieron a electroforesis muestras (5 μl) en la primera dimensión a 20 voltios/cm durante 60 min. Se llevó a cabo una electroforesis en la segunda dimensión, en agarosa que contenía suero antitetánico de caballo (0,06% v/v) a 6 voltios/cm durante 16 horas.

El gel se tiñó con azul de Coomassie y se midió la movilidad del pico de toxoide desde el origen. Los resultados, incluyendo el resultado de un toxoide de referencia (14 mm), fueron de 5 a 30 mm.

(vii) *Ensayo para determinación de la potencia*

Este ensayo satisface los requisitos de la British Pharmacopoeia (1980), Vol. II, pág. 880, Ph. Eur., Suppl. al Vol. III (1977), pág. 175 y WHO Technical Report Series N° 638, pág. 90 Sección A.3.5.6. Se determinó la potencia a partir de la respuesta a la inmunización con una vacuna preparada aplicando por adsorción el material transformado en toxoide sobre un adyuvante (hidróxido de aluminio, Alhydrogel).

Se tomó para el ensayo una muestra procedente de un recipiente de tránsito de la vacuna global adsorbida final. La muestra se almacenó a una temperatura de $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ si no se ensayaba inmediatamente. La muestra se ensayó mediante el procedimiento que se describe en Ph. Eur., Suppl. al Vol. III (1977), pág. 175. Se determinó que la potencia era de 130 a 270 Iu/3,5 Lf, lo cual es significativamente superior a la potencia de 70 a 110 Iu/7 Lf de la vacuna actual preparada transformando en toxoide con formaldehído y purificando a continuación el toxoide.

(viii) *Ensayo para determinar la toxicidad específica*

Este ensayo se basa en los requisitos de la British Pharmacopoeia (1988), Vol. II, pág. 1062; Ph. Eur., 1985, pág. 452 y WHO Technical Report Series N° 638, pág. 90, Sección A.3.5.5. El ensayo confirmó la ausencia de toxicidad detectable atribuible al toxoide del tétanos. Se tomó para el ensayo una cantidad no inferior a 12,5 ml de material transformado en toxoide. La muestra se almacenó a una temperatura de $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ si no se ensayaba inmediatamente. El procedimiento se basó en el que se describe en Ph. Eur., 1985, pág. 452. Se inyectó 1 ml de una dilución que contenía por lo menos 500 unidades de Lf de toxoide del tétanos por vía subcutánea a cada uno de cinco cobayos normales, que pesaban cada uno de 250 g a 350 g. Se observaron los animales durante 21 días para vigilar la aparición de signos de toxicidad o parálisis específica. No hubo ninguna evidencia de toxicidad atribuible al toxoide del tétanos.

Ejemplo Comparativo 1

Preparación de toxoide en ausencia de lisina

La toxina del tétanos purificada del Ejemplo de Referencia se transformó en toxoide mediante la adición de formalina únicamente. Se incubaron del 0,25 al 1,0% de formaldehído en forma de formalina con toxina a una concentración de 200 Lf/ml durante 14 días a una temperatura de $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. No se añadió por consiguiente nada de lisina.

Los toxoides resultantes se ensayaron para determinar la reversión, tal como se ha descrito en el Ejemplo. Los toxoides han revertido a toxicidad. La toxina revertida en realidad indujo en escasas ocasiones el tétanos clásico, pero produjo un síndrome neurológico diferente.

ES 2 157 219 T5

Ejemplo Comparativo 2

Preparación de toxoide bajo diferentes condiciones

5 La toxina del tétanos purificada del Ejemplo de Referencia se transformó en toxoide de las siguientes maneras:

(i) Toxina del tétanos purificada procedente del Ejemplo de Referencia se diluyó con una cantidad suficiente de solución tampón de SBSA de pH 7,5 para proporcionar una concentración de toxina final de 200 Lf/ml. Se añadió del 0,1 al 1,0% de formaldehído, en forma de formalina, a una parte alícuota y la mezcla se preincubó durante 30 minutos a una temperatura de 37°C. Se añadió posteriormente monohidrocloreto de L-lisina a una concentración final de 0,005 a 0,1 M, en presencia de bicarbonato de sodio 0,1 M. El pH de la mezcla de reacción fue de 6,5 a 7,5 y se dejó que se desarrollara la formación de toxoide durante 14 días a una temperatura de 37°C.

15 (ii) Como en el punto (i), pero se varió el pH de la reacción de formación de toxoide de 6,0 a 8,5.

(iii) Como en el punto (i), pero se utilizó arginina (0,05 a 0,1 M) en lugar de lisina.

(iv) Como en el punto (i), pero el periodo de incubación se aumentó de 14 días a 21 días.

20 (v) Como en el punto (i), pero sin ningún periodo de preincubación.

Todos los toxoides resultantes se ensayaron para determinar la reversión tal como se ha descrito en el Ejemplo. Los toxoides habían revertido a toxicidad.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la preparación de toxoide del tétanos, el cual procedimiento comprende incubar toxina del tétanos purificada que presenta una actividad específica de 2.000 Lf/mg PN (Limes flocculationis/mg de nitrógeno proteínico) o superior y un contenido de Lf de 250 Lf/ml o superior con del 0,2 al 1% (v/v) de formaldehído en presencia de lisina 0,005 a 0,25 M durante 24 a 32 días a un pH de 6,0 a 8,0 y una temperatura de 30 a 45°C, en el que la toxina purificada se preincuba con el formaldehído en ausencia de la lisina durante 20 a 40 minutos a una temperatura de 35 a 40°C.
- 10 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la toxina del tétanos se ha purificado a partir de un cultivo de *Clostridium tetani*.
- 15 3. Un procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la toxina purificada presenta una actividad específica de 2.000 a 3.000 Lf/mg PN y un contenido de Lf de 250 a 500 Lf/ml.
- 20 4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la toxina purificada presenta una pureza del 80% o superior, tal como se determina por cromatografía líquida de alta presión y/o por electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida.
- 25 5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la toxina purificada se incuba con el formaldehído y la lisina durante aproximadamente 28 días a una temperatura de 35 a 40°C.
6. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se emplea del 0,25 al 0,5% (v/v) de formaldehído en la etapa de incubación.
7. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se emplea lisina 0,05 a 0,2 M en la etapa de incubación.
- 30 8. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la toxina transformada en toxoide se formula con un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable para formar una composición de vacuna.