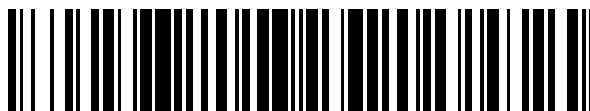


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 452**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/05** (2006.01)  
**A61K 39/08** (2006.01)  
**A61K 39/10** (2006.01)  
**A61K 39/13** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)  
**A61P 31/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2007 E 07829247 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2075005**

54 Título: **Vacuna de IPV-DPT**

30 Prioridad:

**29.09.2006 JP 2006267439**

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

**19.02.2016**

73 Titular/es:

**THE RESEARCH FOUNDATION FOR MICROBIAL  
DISEASES OF OSAKA UNIVERSITY (50.0%)  
Osaka University, 3-1 Yamadaoka  
Suita City, Osaka, JP y  
TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**ABE, SHINOBU y  
SIMIZU, BUNSICHI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 560 452 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**

Vacuna de IPV-DPT

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una vacuna combinada que contiene una cepa Sabin inactivada de poliovirus (IPV).

**Técnica anterior**

10 La poliomiélitis es una enfermedad infecciosa causada por un poliovirus. Los poliovirus infectan a seres humanos por vía oral, proliferan en el tracto intestinal y entran en el sistema nervioso central a través de la sangre. La proliferación dentro de los grandes neuronas motoras de poliovirus que han ingresado al sistema nervioso central causa la degeneración neuronal y necrosis, provocando parálisis flácida aguda en las extremidades. Por otra parte, cuando el poliovirus afecta el centro respiratorio medular, puede dar como resultado la muerte por parálisis respiratoria. Las vacunas contra la polio son ampliamente utilizadas para suprimir la aparición de la polio que desencadena tales síntomas graves.

15 Se utilizan dos tipos de vacunas contra la polio: vacunas de poliovirus vivo oral y vacunas de poliovirus inactivado. Las vacunas de poliovirus vivo oral son las vacunas que utilizan cepas atenuadas del poliovirus (cepas Sabin). Las cepas atenuadas del poliovirus que se administraron por vía oral causan infecciones normales. El poliovirus de vacunas de poliovirus vivo oral crece bien en los intestinos, lo que resulta en la formación de inmunidad localizada dentro de los intestinos. Además, cuando los poliovirus de una vacuna antipoliomielítica viva oral entran en la sangre y causan viremia, esto también estimula la producción de anticuerpos dentro de la sangre. Sin embargo, debido a que la capacidad de las cepas atenuadas de los poliovirus de proliferar dentro del sistema nervioso central es muy débil, por lo general no causan parálisis. En el cuerpo del inoculado, los poliovirus de la vacuna antipoliomielítica viva oral se multiplican y son excretados en las heces de 4 a 6 semanas después de la inoculación. Los virus excretados infectarán a las personas alrededor del inoculado que tienen una inmunidad débil o ninguna inmunidad contra la polio, confiriendo inmunidad o exhibiendo un efecto potenciador de la misma manera que en el inoculado.

25 Sin embargo, en el transcurso del crecimiento repetido dentro del cuerpo del inoculado o en el transcurso del crecimiento repetido en el cuerpo de una persona infectada por virus excretados, una cepa atenuada del poliovirus de una vacuna antipoliomielítica viva oral a veces da lugar a mutaciones en una dirección altamente virulenta. En casos muy raros, tales mutantes causan parálisis asociada con la vacuna.

30 Una vacuna antipoliomielítica inactivada es una vacuna que ha perdido su capacidad de infección por la inactivación del poliovirus con formalina. Debido a que una vacuna antipoliomielítica inactivada ni se multiplica dentro del cuerpo del inoculado ni infecta a personas alrededor del inoculado, no causará parálisis asociada a la vacuna. Hasta ahora se han utilizado cepas altamente virulentas para preparar vacunas contra la polio inactivada, pero recientemente también se han realizado avances en el desarrollo de cepas atenuadas (cepas Sabin) (Biologicals 34, 151-154 (2006); Dev. Biol. Basel. Karger 105, 163-169 (2001), Clinical Virology 30, No. 5, 336-343 (diciembre de 2002)). El crecimiento algo más pobre de cepas atenuadas (cepas Sabin) que las cepas altamente virulentas ha sido considerado un inconveniente. Las vacunas que contienen un antígeno protector de Bordetella pertussis, un toxoide de difteria y un toxoide del tétanos son ampliamente utilizadas como vacunas combinadas de difteria-tétanos-tos ferina. Las vacunas polivalentes compuestas de una vacuna contra la tos ferina acelular, un toxoide de difteria, un toxoide del tétanos y el poliovirus inactivado son conocidas (traducción japonesa publicada de una solicitud PCT No. 2000-504032; J. Díez-Domingo, et al.: The Pediatric Infectious Disease Journal 34(3), 219-224 (2005)).

45 Las células Vero son células de paso de los riñones de los monos verdes. Debido a que estas células tienen una amplia sensibilidad a diversos tipos de virus, son ampliamente utilizadas en el cultivo de virus. Un procedimiento para preparar una vacuna contra el enterovirus tipo 71 que se ha reportado en la literatura incluye el cultivo de células Vero en un microportador y la utilización de las células cultivadas Vero para hacer crecer el enterovirus 71 ("Optimization of microcarrier cell culture process for the inactivated enterovirus type 71 vaccine development," by Suh-Chin Wu, et al.: Vaccine 22, 3858-3864 (2004)). La producción de la cepa Sabin I del poliovirus usando células Vero cultivadas en un microportador se ha descrito en la literatura ("The new medium MDSS2N, free of any animal protein supports cell growth and production of various viruses", by O.-W. Merten, et al.: Cytotechnology 30, 191-201 (1999); "Examination of the serumfree medium MDSS2 for the production of poliovirus on Vero cells in bioreactors", O.-W. Merten, et al.: Cytotechnology 25, 35-44 (1997)). También se han descrito las condiciones generales de cultivo celular usando un microportador (Microcarrier cell culture principles & methods: Pharmacia LKB, Biotechnology, 1988).

**Divulgación de la invención**

55 Bajo tales circunstancias, ha existido un deseo de un procedimiento para producir una vacuna combinada que contiene una cepa Sabin de poliovirus inactivada (sIPV), y también que contiene un antígeno protector de B. pertussis, un toxoide de difteria y un toxoide del tétanos (DPT), cuyo procedimiento incluye la etapa de preparación

de un poliovirus de cepa Sabin de alto título.

Los inventores han llevado a cabo extensas investigaciones con el fin de resolver el problema anterior. Como resultado, los inventores han descubierto que poliovirus de cepa Sabin de alto título se puede preparar mediante el cultivo, en presencia de 4 g/l a 6 g/l de un microportador, de células Vero inoculadas con una cepa Sabin de poliovirus. Después de realizar investigaciones repetidas sobre la base de estos hallazgos, los inventores llegaron en última instancia, a la presente invención.

La presente invención proporciona así:

(1) Un procedimiento para producir una vacuna combinada que contiene

(A) cepas Sabin inactivadas tipo I, tipo II y tipo III de poliovirus en una proporción, en peso de los respectivos antígenos D, de (2 a 4):(80 a 120):(80 a 120),

(B) un antígeno protector de Bordetella pertussis,

(C) un toxoide de difteria, y

(D) un toxoide del tétanos,

comprendiendo el procedimiento

(a) una etapa de cultivar, en presencia de 4 g/l a 6 g/l de un microportador, células Vero que deben ser inoculadas con una cepa Sabin de poliovirus, en el que la etapa de cultivo es conducida en un medio de cultivo que se selecciona del medio ME, medio DME, medio RPMI 1640, y medio 199, que contiene de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 % en volumen de suero bovino o suero fetal bovino;

(b) una etapa de infectar the células Vero que están unidas al microportador con tipo I, tipo II y tipo III de cepa Sabin de poliovirus, en forma separada;

(c) una etapa para permitir que el poliovirus prolifere;

(d) una etapa para recuperar un fluido de virus que contiene the poliovirus;

(e) una etapa para inactivar el poliovirus;

(f) mezclar la vacuna antipoliomielítica inactivada tipo I, vacuna antipoliomielítica inactivada tipo II y vacuna antipoliomielítica inactivada tipo III obtenibles en el punto (e) como para establecer los niveles relativos de los respectivos antígenos D en (2 a 4):(80 a 120):(80 a 120); y

(g) combinar dicha vacuna antipoliomielítica inactivada mixta obtenida en el punto (f) y antígeno protector de B. pertussis, toxoide de difteria y toxoide de tétanos.

(2) El procedimiento de acuerdo al punto (1) más arriba, en el que el microportador tiene una concentración de aproximadamente 5 g/l.

(3) El procedimiento de acuerdo al punto (1) más arriba, en el que el microportador es un microportador de dextrano.

(4) El procedimiento de acuerdo al punto (1) más arriba, en el que la etapa de cultivo de la célula Vero (etapa (a)) se lleva a cabo en una escala de al menos aproximadamente 3 l.

(5) El procedimiento de acuerdo al punto (1) más arriba, en el que la etapa de cultivo de la célula Vero (etapa (a)) se lleva a cabo en una escala de al menos aproximadamente 30 l.

(6) El procedimiento de acuerdo al punto (1) más arriba, que además comprende (d-2) una etapa para purificar el fluido del virus.

(7) El procedimiento de acuerdo al punto (6) más arriba, en el que la etapa de purificación (etapa (d-2)) comprende:

(i) formar el fluido de virus recuperado en la etapa (d) en un pélet por ultracentrifugación;

(ii) someter a sonicación una re-suspensión del pélet; y

(iii) purificar por cromatografía en columna.

(8) El procedimiento de acuerdo al punto (7) más arriba, en el que la purificación por cromatografía en columna (iii) se lleva a cabo una sola vez.

Mediante el cultivo, en presencia de 4 g/l de 6 g/l de un microportador, de las células Vero que deben ser inoculadas con una cepa Sabin de poliovirus, es posible obtener poliovirus de cepa Sabin de alto título. Al utilizar el poliovirus de

cepa Sabin de alto título, un poliovirus de cepa Sabin inactivado se puede producir de manera eficiente. Por lo tanto, un procedimiento para producir una vacuna combinada que incluye la etapa de cultivo, en presencia de 4 g/l a 6 g/l de un microportador, de células Vero que deben ser inoculadas con una cepa Sabin de poliovirus (el procedimiento de producción de la presente invención) es útil como un procedimiento para la producción eficiente de vacunas combinadas que contienen una cepa Sabin de poliovirus inactivada

### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un gráfico que muestra las curvas de crecimiento de células Vero en el cultivo de células Vero por un procedimiento de microportador. Aquí, "3L" indica un número de células de partida de aproximadamente  $2 \times 10^5$  células/ml (baja concentración) y 3 g/l de microportador. "3H" indica un número de células de partida de aproximadamente  $10 \times 10^5$  células/ml (alta concentración) y 3 g/l de microportador. "5L" indica un número de células de partida de aproximadamente  $2 \times 10^5$  células/ml (baja concentración) y 5 g/l de microportador. "5H" indica un número de células de partida de aproximadamente  $10 \times 10^5$  células/ml (alta concentración) y 5 g/l de microportador.

La FIG. 2 es un gráfico que muestra los títulos de infectividad (títulos de virus) de poliovirus tipo I obtenidos en células Vero cultivadas bajo varias condiciones. Aquí, "3L" representa los poliovirus de tipo I obtenidos en células Vero cultivadas a partir de un número de células de partida de aproximadamente  $2 \times 10^5$  células/ml (baja concentración) en 3 g/l de microportador. "5L" indica poliovirus de tipo I obtenido en células Vero cultivadas a partir de un número de células de partida de aproximadamente  $2 \times 10^5$  células/ml (baja concentración) en 5 g/l de microportador. "5H" indica los poliovirus de tipo I obtenidos en células Vero cultivadas a partir de un número de células de partida de aproximadamente  $10 \times 10^5$  células/ml (alta concentración) en 5 g/l de microportador. "Referencia" indica poliovirus de tipo I cultivados utilizando células de riñón de mono verde.

La presente invención proporciona un procedimiento para producir una vacuna combinada que contiene una cepa Sabin inactivada de poliovirus (sIPV) junto con un antígeno protector de B. pertussis, un toxoide de difteria y un toxoide del tétanos (DPT), cuyo procedimiento comprende la etapa de producir una cepa Sabin de poliovirus de alto título.

La invención se describe con más detalle a continuación.

#### 1. Poliovirus de cepa Sabin inactivada

##### (1) Poliovirus de cepa Sabin

En la presente memoria, "cepa Sabin de poliovirus" se refiere a una cepa de poliovirus derivada de una cepa atenuada de poliovirus aislado por el Dr. Albert B. Sabin (véase, por ejemplo, Sabin, AB, Boulger, LR: "History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains," J. Biol. Standard 1, 115-118 (1973)).

Los poliovirus de cepa Sabin incluyen el cepas Sabin tipo I de poliovirus, cepas Sabin tipo II del poliovirus y cepas Sabin tipo III de poliovirus. Los ejemplos de cepas Sabin tipo I de poliovirus incluyen las cepas LSc y 2ab. Los ejemplos de cepas Sabin tipo II de poliovirus incluyen las cepas P712, Ch y 2ab. Los ejemplos de cepas Sabin tipo III de poliovirus son la cepas Leon y 12a<sub>1b</sub>.

##### (2) Inactivación

En la presente memoria, "inactivación" del virus se refiere a la eliminación de la capacidad infecciosa de un virus. Los procedimientos de inactivación incluyen, pero no se limitan a, procedimientos físicos (por ejemplo, procedimientos que implican el uso de irradiación de rayos x, calor o ultrasonido) y procedimientos químicos (por ejemplo, procedimientos que implican el uso de formalina, mercurio, alcohol o cloro).

La inactivación del poliovirus puede llevarse a cabo mediante un procedimiento conocido (véase, por ejemplo, Biologicals 34, 151-154(2006)) Por ejemplo, la inactivación se puede llevar a cabo tratando el poliovirus con formalina.

##### (3) Inmunogenicidad de cepas Sabin inactivadas de poliovirus

Dos antígenos virales conocidos como antígenos D y antígenos C están presentes generalmente en mezcla dentro de las cepas Sabin inactivadas de poliovirus. Los antígenos D son partículas virales completas. Los anticuerpos contra antígenos D tienen la capacidad de neutralizar la capacidad de infección de los virus vivos, y funcionan como anticuerpos protectores. Los antígenos C, llamados partículas defectuosas, son partículas que no tienen el ARN ácido nucleico central y parte de las proteínas virales de una partícula viral completa; estas partículas son huecas en el centro. Los anticuerpos contra los antígenos C tienen poca o ninguna capacidad de neutralizar la capacidad de infección de virus vivos. Por lo tanto, cuando una cepa Sabin inactivada de poliovirus debe utilizarse como una vacuna, se requieren los antígenos D.

Hay tres tipos de poliovirus: tipo I, tipo II y tipo III. La inmunidad a la infección por poliovirus es específica de los tres tipos de virus tipo I, tipo II y tipo III; la inmunidad cruzada que puede existir entre los tipos es mínima. Los antígenos D de cepas Sabin inactivadas tipo I, tipo II y tipo III de poliovirus tienen inmunogenicidades capaces de producir

anticuerpos neutralizantes de, respectivamente, las cepas salvajes tipo I, tipo II y tipo III (altamente virulentas) del poliovirus. Las inmunogenicidades de los antígenos D de cepas Sabin inactivadas de poliovirus son diferentes para cada uno de los tipos I, II y III; por lo tanto, la cantidad de antígeno D necesaria para producir suficientes anticuerpos para neutralizar las cepas salvajes tipo I, tipo II y tipo III (altamente virulentas) de poliovirus difiere según el tipo de virus.

Como se mencionó anteriormente, hay tres tipos de poliovirus tipo I, tipo II y tipo III, cada uno de los cuales causa la misma polio. Por lo tanto, cuando una cepa Sabin de poliovirus inactivada se utiliza como una vacuna (vacuna antipoliomielítica inactivada), debe tener una inmunogenicidad capaz de producir anticuerpos suficientes para neutralizar las cepas salvajes (cepas altamente virulentas) de poliovirus de cada uno de los tipos I, II y III. Por otra parte, es deseable que la inmunogenicidad esté cerca de la inmunogenicidad de las vacunas contra la polio inactivadas a partir de cepas altamente virulentas que hasta ahora se han utilizado. Para exhibir una inmunogenicidad tal, la vacuna preferentemente contiene cepas Sabin inactivadas tipo I, tipo II y tipo III de poliovirus en una proporción, en peso de los respectivos antígenos D, de preferentemente (2 a 4):(80 a 120):(80 a 120), y mucho más preferentemente (aproximadamente 3):(aproximadamente 100):(aproximadamente 100). Las cepas Sabin inactivadas de poliovirus usadas en la presente invención, incluyendo los tipos I, II y III en una proporción específica igual que lo anterior, presenta una inmunogenicidad similar a la de las vacunas contra la polio inactivadas a partir de cepas altamente virulentas (por ejemplo, la vacuna Sauk).

## 2. Producción de cepas Sabin inactivadas de poliovirus

Las cepas Sabin inactivadas de poliovirus adecuadas para su uso en la presente invención se pueden producir mediante el procedimiento descrito a continuación.

En primer lugar, las células Vero se cultivan en presencia de 4 g/l a 6 g/l de microportador, proporcionando así células para el cultivo de los poliovirus. Las células de cultivo de poliovirus resultantes se inoculan con virus simiente (poliovirus de cepa Sabin) y los virus se cultivan, produciendo poliovirus de cepa Sabin que han proliferado. Los poliovirus de cepas Sabin resultantes se inactivan para dar poliovirus de cepa Sabin inactivada. Pueden obtenerse poliovirus de cepa Sabin inactivada los cuales corresponden a los virus simiente utilizados (cepas Sabin de tipo I, cepas Sabin de tipo II o cepas Sabin de tipo III). Los virus pueden concentrarse y/o purificarse antes o después de la inactivación de virus.

Como se mencionó más arriba, la vacuna antipoliomielítica inactivada debe tener una inmunogenicidad capaz de producir suficientes anticuerpos para neutralizar las cepas salvajes (cepas altamente virulentas) de cada uno de los tipos I, II y III. Sin embargo, los antígenos D de cepas Sabin de poliovirus inactivadas tienen inmunogenicidades que difieren entre los tipos I, II y III. En consecuencia, la vacuna antipoliomielítica inactivada que posee una inmunogenicidad capaz de producir suficientes anticuerpos para neutralizar las cepas salvajes (cepas altamente virulentas) de cada uno de los tipos I, II y III se puede obtener mediante el ajuste de las cantidades de poliovirus inactivados tipo I, tipo II y tipo III contenidos.

### (Células Vero)

Las células Vero son células de paso de los riñones de monos verdes (*Cercopithecus aethiops*), y están depositadas en la Colección de Cultivo de Tipo Norteamericano (ATCC). Las células Vero se utilizan ampliamente para cultivar virus debido a que presentan una morfología fibroblástica, tienen una amplia sensibilidad a diversos tipos de virus y son fáciles de mantener como células de paso. Se sabe que las células Vero que están disponibles en ATCC incluyen ATCC Nos. CCL-81 y CRL-1587.

### (Microportador)

En esta especificación, "microportador" se refiere a un portador que tiene superficies a las que se adhieren las células y permite que el cultivo de células se lleve a cabo en un estado suspendido dentro de un medio líquido. El microportador no está sujeto a ninguna limitación particular con respecto al material, forma y tamaño, siempre y cuando sea un portador para la superficie a la que se adhieren las células y que permita que el cultivo de células sea llevado a cabo en un estado suspendido dentro de un medio líquido.

Los ejemplos de material de microportador incluyen dextrano, gelatina, colágeno, poliestireno, polietileno, poliacrilamida, vidrio y celulosa. El dextrano se prefiere como material de microportador.

Los ejemplos de la forma el microportador incluyen formas esféricas (perlas) y discoidales. El microportador preferentemente tiene una forma esférica.

El microportador esférico tiene un tamaño de, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 mm, preferentemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 mm, y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,3 mm.

El microportador puede ser poroso.

Los ejemplos de microportadores esféricos que se pueden usar en la presente invención incluyen Cytodex 1 (nombre comercial), Cytodex 3 (nombre comercial) y Cytopore (nombre comercial) (todos productos de GE Healthcare Biosciences). Los ejemplos de microportadores discoidales incluyen Cytoline 1 (nombre comercial) y Cytoline 2 (nombre comercial) (ambos productos de GE Healthcare Biosciences). Los ejemplos de microportadores porosos incluyen Cytopore (nombre comercial), Cytoline 1 (nombre comercial) y Cytoline 2 (nombre comercial) (todos productos de GE Healthcare Biosciences). El microportador utilizado en la presente invención es mucho más preferentemente un microportador esférico de dextrano. El microportador esférico de dextrano es preferentemente Cytodex 1 (nombre comercial), Cytodex 3 (nombre comercial) o Cytopore (nombre comercial), más preferentemente Cytodex 1 (nombre comercial) o Cytodex 3 (nombre comercial), y mucho más preferiblemente Cytodex 1 (nombre comercial).

(Cultivo de células Vero)

En la presente invención, las células Vero se hacen crecer mediante el cultivo en presencia de 4 g/l a 6 g/l de microportador. La concentración de microportador es preferentemente de aproximadamente 4,5 g/l a 5,5 g/l, y más preferentemente 5 g/l.

La etapa de cultivo de células Vero descrita más arriba se lleva a cabo en una escala, en términos del volumen de líquido, de preferentemente al menos 3 litros, más preferentemente al menos 30 litros, y mucho más preferentemente al menos 150 litros. La etapa de cultivo de células Vero se lleva a cabo en una escala de generalmente no más de 1.000 litros.

Cuando las células Vero se cultivan en presencia de un microportador, el medio de cultivo utilizado puede ser, por ejemplo, medio ME (Science, 122, 501 (1952)), medio DME (Virology, 8, 396 (1959)), medio RPMI 1640 (The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)) o medio 199 (Proceedings of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)), que contienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 % en volumen de suero bovino o suero fetal bovino. El medio de cultivo es preferentemente un medio DME, más preferentemente un medio DME que contiene suero bovino, y mucho más preferentemente un medio DME que contiene aproximadamente 5 % en volumen de suero bovino. El medio puede, si es necesario, cambiarse durante el período del cultivo de células. El pH es preferentemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, más preferentemente de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5, y mucho más preferentemente aproximadamente 7. El cultivo típicamente se lleva a cabo a de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 40°C durante un período de aproximadamente 5 a 9 días. Si es necesario, pueden llevarse a cabo aireación y agitación durante el cultivo. La concentración de oxígeno disuelto (DO) en el momento del cultivo celular es preferentemente de aproximadamente 60 a aproximadamente 90%, más preferentemente de aproximadamente 70 a aproximadamente 80%, y mucho más preferentemente aproximadamente 75%.

El número de células Vero en el medio al inicio del cultivo en presencia del microportador (número de células de partida) se puede ajustar según sea apropiado para factores tales como el tipo de medio, el tipo de microportador, la escala de cultivo. El número de células de partida es preferentemente de  $2 \times 10^4$  células/ml a  $10 \times 10^5$  células/ml, y mucho más preferentemente de  $2 \times 10^5$  células/ml a  $10 \times 10^5$  células/ml.

(Cultivo de poliovirus)

El cultivo de poliovirus puede llevarse a cabo mediante la inoculación y por lo tanto la infección de las células Vero cultivadas con una cepa Sabin de poliovirus (virus simiente), y el cultivo de los poliovirus dentro de las células. El cultivo de las células infectadas puede llevarse a cabo de la misma manera que el cultivo de células Vero descrito anteriormente. El medio utilizado para el cultivo de poliovirus es preferentemente un medio 199, más preferentemente un medio 199 que contiene bicarbonato de sodio, y mucho más preferentemente un medio 19 que contiene 0,3% p/v de carbonato de sodio.

La temperatura de incubación durante el cultivo del virus es preferentemente de aproximadamente 30°C a aproximadamente 38°C, más preferentemente de aproximadamente 32°C a aproximadamente 36°C, y mucho más preferentemente de aproximadamente 33°C a aproximadamente 35°C. El período de cultivo del virus es preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 días, más preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 días, y mucho más preferentemente aproximadamente 3 días. El cultivo del virus puede ser llevado a su fin utilizando efectos citopáticos por el poliovirus (redondeo de las células infectadas por poliovirus y desprendimiento de las células del microportador) como indicador.

Una cepa Sabin de poliovirus que se ha cultivado utilizando células de riñón cultivadas primarias de mono verde pueden ser empleadas como el virus simiente.

(Recuperación de fluido de virus que contiene poliovirus)

Tras la finalización del cultivo de virus, se retira el microportador y se recupera el fluido de virus que contiene el poliovirus (referido a veces aquí como "fluido de poliovirus").

La eliminación del microportador puede llevarse a cabo por medio de, por ejemplo, una malla de teflón (tal como una

que tiene un tamaño de poro de 120 µm). Dado que los virus de la polio siguen presentes (unidos) al microportador izquierdo en la malla, estos poliovirus restantes pueden ser recuperados mediante el enjuague con, por ejemplo, el medio de cultivo de virus.

5 El fluido de poliovirus resultante se puede filtrar usando una membrana de filtro (por ejemplo, una membrana de filtro de 0,2 µm) o similar para eliminar los desechos celulares.

El fluido de poliovirus puede concentrarse y/o purificarse antes o después de la inactivación.

10 Los ejemplos ilustrativos del procedimiento de concentración incluyen ultrafiltración, ultracentrifugación y diálisis. El procedimiento de concentración es preferentemente ultrafiltración o ultracentrifugación. Es más preferible llevar a cabo la ultrafiltración y la ultracentrifugación, y aún más preferible llevar a cabo la ultrafiltración seguido por ultracentrifugación.

La membrana utilizada en la ultrafiltración puede ser una membrana de ultrafiltración comúnmente empleada para la concentración de virus. La membrana de ultrafiltración tiene un corte de peso molecular que es preferentemente aproximadamente 100 kDa. La membrana de ultrafiltración preferentemente está fabricada de un material tal como poliéter sulfona.

15 La concentración del poliovirus por ultracentrifugación se puede llevar a cabo sometiendo el fluido de poliovirus a 4 horas de centrifugación a 4 °C y 100.000 g para formar un pélet. El sedimento puede ser re-suspendido en, por ejemplo, un tampón de fosfato. También es posible disolver la masa de virus agregados sometiendo a sonicación la resuspensión de pélets. La sonicación puede llevarse a cabo utilizando un aparato disponible en comercios, tal como Insonator Modelo 200M (Kubota). Las condiciones de sonicación deben ser suficientes para disolver la masa de los virus agregados, y se pueden seleccionar según sea apropiado para factores tales como el recipiente utilizado en la sonicación, la salida de ultrasonido, y la concentración de la re-suspensión. Las condiciones de sonicación están ejemplificadas por tratamiento a 200 W durante un periodo de 3 a 10 minutos. Incluso cuando se lleva a cabo tal sonicación, la cepa Sabin de poliovirus no pierde su inmunogenicidad, lo que le permite ser usada ventajosamente como una vacuna contra el poliovirus.

20

25 Los procedimientos de purificación incluyen, pero no se limitan a, los procedimientos que utilizan las características físicas de la sustancia que se purifica, tal como tamaño, densidad y coeficiente de sedimentación, y los procedimientos que utilizan reacciones químicas o fisicoquímicas (por ejemplo, e adsorción-desorción). Los ejemplos ilustrativos de procedimientos de purificación incluyen centrifugación en gradiente de densidad, filtración (incluyendo ultrafiltración), cromatografía en columna de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de filtración en gel y precipitación salina. El procedimiento de purificación es preferentemente cromatografía en columna, más preferentemente cromatografía en columna de intercambio iónico, y mucho más preferentemente cromatografía en columna de DEAE-intercambio iónico.

30

El número de veces que se lleva a cabo la purificación por cromatografía en columna no está sujeto a ninguna limitación particular. Es decir, la purificación por cromatografía en columna puede llevarse a cabo varias veces hasta que se consigue la pureza requerida. Sin embargo, desde el punto de vista de la eficiencia de la producción y otras consideraciones, es preferible llevar a cabo dicha purificación en el menor número de etapas posible.

35

La concentración y purificación se llevan a cabo preferentemente mediante la formación de fluido de poliovirus en un pélet por ultracentrifugación, sonicación de una re-suspensión del pélet resultante, y luego la purificación por cromatografía en columna. Además, desde el punto de vista de la eficiencia de producción, es preferible llevar a cabo la purificación por cromatografía en columna sólo una vez. Al llevar a cabo la formación del fluido de poliovirus en un pélet por ultracentrifugación, sonicación de una re-suspensión del pélet y la purificación por cromatografía en columna sólo una vez, el fluido de poliovirus puede concentrarse y purificarse de manera eficiente y adecuadamente.

40

(Inactivación del poliovirus)

45 La inactivación del poliovirus puede llevarse a cabo por un procedimiento comúnmente empleado. Específicamente, el poliovirus puede ser inactivado mediante la adición de un inactivador al fluido de poliovirus y efectuando de ese modo una reacción entre el poliovirus y el inactivador. El inactivador es preferentemente formalina. Las condiciones de inactivación no están sujetas a ninguna limitación particular, siempre y cuando el poliovirus sea inactivado. Para evitar la presencia residual de poliovirus insuficientemente inactivados, el período de tratamiento de inactivación es generalmente de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 veces, preferentemente de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,5 veces, y más preferentemente aproximadamente 3 veces, la duración del período durante la cual se ha confirmado la inactivación del poliovirus.

50

Por ejemplo, cuando se utiliza formalina como inactivador, la cantidad de adición es preferentemente de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,1 % p/v, más preferentemente de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,05 % p/v, y mucho más preferentemente aproximadamente 0,01 % p/v. La temperatura de inactivación es mucho más preferentemente aproximadamente 37°C. El período de inactivación puede variar también dependiendo del tipo de inactivador, la concentración del inactivador, y la temperatura de inactivación. Por ejemplo, cuando se utiliza aproximadamente 0,01 % p/v de formalina como inactivador y la temperatura de

55

inactivación es aproximadamente 37°C, el período de inactivación es preferentemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 16 días, más preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 días, y mucho más preferentemente aproximadamente 12 días. Cuando se utiliza aproximadamente 0,01 % p/v de formalina y el tiempo de inactivación es aproximadamente 37 °C, los poliovirus de cepa Sabin generalmente se inactivan dentro de los 4 días.

3. Toxoide de difteria, antígeno protector de B. pertussis, y toxoide del tétanos (DPT)

El antígeno protector de B. pertussis, toxoide de difteria y toxoide del tétanos utilizados en la presente invención no están sujetos a ninguna limitación particular.

El antígeno protector de B. pertussis, toxoide de difteria y toxoide del tétanos están disponibles comercialmente como vacunas combinadas difteria-tos ferina-tétanos (tal como aquellas fabricadas por Takeda Chemical Industries, Ltd., la Fundación de Investigación de Enfermedades Microbianas de la Universidad de Osaka (Biken), y el Instituto de Investigación de Chemo-Sero-Terapéutica (Kaketsuken)). Alternativamente, el antígeno protector de B. pertussis, toxoide de difteria y toxoide del tétanos puede obtenerse por procedimientos conocidos. En concreto, el antígeno protector de B. pertussis puede obtenerse, por ejemplo, por extracción, aislamiento y purificación de la fracción de antígeno profiláctico de un caldo de cultivo de cepas de B. pertussis de fase I (cepa Tohama) utilizando un procedimiento físico-químico tal como fraccionamiento con sulfato de amonio/fraccionamiento centrífugo por gradiente de densidad de sacarosa, atenuando entonces la virulencia restante con formalina. El toxoide de difteria se puede obtener, por ejemplo, por purificación y concentración de la toxina producida por Corynebacterium diphtheriae (cepa Park-Williams No. 8) utilizando un procedimiento físico-químico tal como cromatografía en columna, seguido por la desintoxicación con formalina. El toxoide del tétanos puede obtenerse, por ejemplo, por purificación y concentración de la toxina producida por Clostridium tetani (cepa de Harvard) mediante un procedimiento físico-químico tal como cromatografía en columna, seguido por la desintoxicación con formalina.

El antígeno protector de B. pertussis contiene la toxina de la tos ferina (antígeno PT), hemaglutinina filamentosa (antígeno FHA), proteína de membrana externa (antígeno 69 KD), y fimbrias (también llamado antígeno FB, aglutinógeno (FGG)). El antígeno protector de B. pertussis no necesita contener necesariamente cada uno de los antígenos anteriores, siempre que contenga al menos uno, preferentemente al menos dos, y más preferentemente al menos tres de estos antígenos. Los anticuerpos para estos antígenos protectores protegen al huésped de la tos ferina.

4. Vacuna combinada

La vacuna combinada producida por el procedimiento de la presente invención contiene cepas Sabin inactivadas de poliovirus, antígeno protector de B. pertussis, toxoide de difteria y toxoide del tétanos. Como se mencionó más arriba, el antígeno protector de B. pertussis, toxoide de difteria y toxoide del tétanos están disponibles comercialmente como vacunas combinadas de difteria-tétanos-tos ferina. Por lo tanto, la vacuna combinada también se puede preparar mezclando cepas Sabin inactivadas de poliovirus junto con una vacuna combinada de difteria-tétanos-tos ferina.

Las cepas Sabin inactivadas de poliovirus pueden prepararse mezclando cepas Sabin tipo I inactivadas de poliovirus, cepas Sabin tipo II inactivadas de poliovirus, y cepas Sabin tipo III inactivadas de poliovirus. Como se mencionó más arriba, las cepas Sabin inactivadas de poliovirus contienen las cepas Sabin inactivadas tipo I, tipo II y tipo III de poliovirus en una proporción, en base a las cantidades de los respectivos antígenos D de las mismas, de preferentemente (2 a 4):(80 a 120):(80 a 120), y mucho más preferentemente (aproximadamente 3):(aproximadamente 100):(aproximadamente 100).

El antígeno protector de B. pertussis, toxoide de difteria y toxoide del tétanos pueden incluirse dentro de la vacuna combinada en las cantidades que son eficaces para la prevención de la tos ferina, difteria y tétanos. En concreto, estas cantidades respectivas pueden ser las mismas que las cantidades correspondientes en las vacunas combinadas contra la difteria tétanos-tos ferina disponibles comercialmente mencionadas más arriba. En los casos en que las inmunogenicidades del antígeno protector de B. pertussis, toxoide de difteria y/o toxoide del tétanos son influenciadas por la cepa Sabin inactivada de poliovirus y otros ingredientes, se puede producir una vacuna combinada eficaz para prevenir cada una de las enfermedades diana ajustando adecuadamente los respectivos contenidos.

La vacuna combinada puede producirse y utilizarse por medios convencionales. Específicamente, la producción y el uso pueden llevarse a cabo como se describe a continuación.

La vacuna combinada se puede preparar como una inyección por un procedimiento convencional. Tal inyección se prepara de acuerdo con un procedimiento que es en sí mismo conocido en la técnica, tal como disolver, suspender o emulsionar las sustancias mencionadas anteriormente en un líquido acuoso u oleaginoso estéril comúnmente utilizado en las inyecciones. Los ejemplos de líquidos acuosos para inyección que pueden usarse incluyen solución salina fisiológica y soluciones isotónicas que contienen glucosa o algún otro adyuvante. La solución inyectable que ha sido preparada típicamente se introduce en una ampolla o jeringa adecuada.



La vacuna combinada también puede incluir opcionalmente aditivos farmacéuticos tales como conservantes, antioxidantes y agentes quelantes. Los ejemplos ilustrativos de conservantes incluyen timerosal y 2-fenoxietanol. Los ejemplos ilustrativos de agentes quelantes incluyen ácido etilendiaminotetraacético y ácido diaminotetraacético de glicol éter.

- 5 La vacuna combinada puede contener además adyuvantes. Los ejemplos ilustrativos de adyuvantes incluyen hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y cloruro de aluminio.

- Además del poliovirus inactivado de cepa Sabin, antígeno protector de *B. pertussis*, toxoide de difteria y toxoide del tétanos, la vacuna combinada también puede incluir otros ingredientes inmunogénicos. Los ejemplos ilustrativos de tales ingredientes inmunogénicos incluyen ingredientes inmunogénicos para virus o bacterias distintas del poliovirus, *B. pertussis*, *C. diphtheriae* y *C. tetani*. Los ejemplos de tales ingredientes inmunogénicos incluyen toxoides, virus atenuados, virus inactivados, proteínas, péptidos, polisacáridos, lipopolisacáridos, lipopéptidos y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de virus y bacterias distintas del poliovirus, *B. pertussis*, *C. diphtheriae* y *C. tetani* incluyen virus de la gripe, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la rubéola, virus del herpes, virus de la viruela, virus de la rabia, virus de inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis, *Diplococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, bacilo de la tifoidea y *Haemophilus influenzae* tipo b.
- 10
- 15

la vacuna combinada se puede administrar parenteralmente, tal como mediante inyección subcutánea o inyección intramuscular, y preferentemente por inyección subcutánea.

- La cantidad de una dosis simple de la vacuna combinada se puede seleccionar adecuadamente de acuerdo con varias condiciones, tal como la edad y peso corporal de la persona vacunada diana. En concreto, una dosis simple puede contener, por ejemplo, al menos 4 unidades internacionales del antígeno protector de *B. pertussis*, aproximadamente 15 Lf de toxoide de difteria, aproximadamente 2,5 Lf de toxoide del tétanos, aproximadamente 2 a
- 20

- (preferentemente aproximadamente 3 unidades) de poliovirus Sabin inactivado tipo I (base de antígeno D), aproximadamente 80 a aproximadamente 120 unidades (preferentemente aproximadamente 100 unidades) de poliovirus Sabin tipo II inactivado (base de antígeno D), y de aproximadamente 80 a aproximadamente 120 unidades (preferentemente aproximadamente 100 unidades) de poliovirus Sabin tipo III inactivado (base de antígeno D).
- 25

- El número de veces que la vacuna combinada se administra como una inmunización inicial puede ser, por ejemplo, dos o tres dosis en intervalos de 3 a 8 semanas. Cuando la vacuna combinada se administra dos veces como inmunización inicial, es deseable administrar también una vacuna combinada contra la difteria-tos ferina-tétanos (vacuna DPT) en un intervalo de 3 a 8 semanas. Como inmunización de refuerzo, la vacuna combinada puede administrarse una vez más en un intervalo de al menos 6 meses después de la inmunización inicial (por ejemplo, de 12 a 18 meses después del final de la inmunización inicial).
- 30

### Ejemplos

La presente invención se ilustra más detalladamente a continuación por medio de ejemplos.

- 35 **Ejemplo de referencia 1: Establecimiento de un Banco de Células de Trabajo de un Fabricante para Virus de Vacunas contra la Polio**

Un banco de células conservadas para la producción de virus de la vacuna antipoliomielítica se preparó mediante el procedimiento descrito a continuación a partir de Células Vero adquiridas de ATCC.

(i) Preparación del Banco de Células Madre (MCB)

- 40 Las células congeladas en una ampolla recibidas de ATCC (CCL 81 Vero, F-6573; número de paso, 124) se descongelaron, y se transfirieron a un matraz de 118 ml vacío (un matraz con una capacidad de 154 ml y un área de superficie de crecimiento de células de 54 cm<sup>2</sup>). Quince mililitros de un medio de crecimiento celular (DME (Medio Eagle Modificado de Dulbecco; Sigma, No. de catálogo D5523) que contenía 5 % en volumen de suero bovino, 0,075% de bicarbonato de sodio, 20 µg/ml de eritromicina y 100 µg/ml de kanamicina (concentraciones finales)) se
- 45 añadió gota a gota al matraz de 118 ml que contenía las células durante un período de aproximadamente 5 minutos. El matraz que contenía las células y el medio de crecimiento celular se cultivó en sistema estático a 36 °C (un matraz de 118 ml, paso 125). A la mañana siguiente, el cultivo de crecimiento de células se reemplazó con 15 ml de cultivo fresco y el cultivo estático se llevó a cabo de nuevo a 36 °C. En el día 6 tras el inicio del cultivo estático, un subcultivo se llevó a cabo (de un matraz de 118 ml a cuatro matraces de 118 ml, paso 126). El procedimiento de
- 50 subcultivo se llevó a cabo de la siguiente manera.

Procedimiento de subcultivo

- (1) Descartar el caldo de cultivo.
- (2) Colocar 5 ml de solución de tripsina al 0,25% para el subcultivo en un matraz de 4-oz.

## ES 2 560 452 T3

- (3) Sumergir las superficies celulares durante aproximadamente 1 minuto, luego descartar la solución de tripsina al 0,25% para el subcultivo.
- (4) Colocar el matraz de 118 ml en reposo a 36 °C, y esperar a que las células se desprendan de la superficie de vidrio.
- 5 (5) Cuando las células han comenzado a separarse, añadir 5 ml de medio de crecimiento celular e inducir a que todas las células se separen mediante pipeteo.
- (6) Suspender las células uniformemente mediante pipeteado adicional, a continuación, transferir el medio de crecimiento celular a un tubo de centrifuga.
- 10 (7) Centrifugar durante 5 minutos a 600 rpm, descartar el sobrenadante, y suspender uniformemente las células sedimentadas en aproximadamente 8 ml de medio de crecimiento celular fresco mediante pipeteo.
- (8) Añadir 2 ml de suspensión celular a cada uno de los cuatro matraces de 118 ml nuevos (en cada uno de los cuales se han distribuido 13 ml de medio de crecimiento celular fresco).
- (9) Colocar cuatro matraces de 118 ml en reposo a 36 °C y llevar a cabo el cultivo de células.

La composición de la solución de tripsina al 0,25% para el subcultivo fue la siguiente.

- 15 5% de tripsina <sup>\*1</sup>, 50 ml/l  
5% de pirrolidona de polivinilo (90K), 20 ml/l  
0,247 mol de edetato de sodio <sup>\*2</sup>, 56 ml/l  
EK <sup>\*3</sup>, 2 ml/l  
Fluido de dilución de tripsina <sup>\*4</sup>, 872 ml/l

20 \* 1: se utilizó tripsina de páncreas de porcino y que tiene una actividad de 1: 300.

\* 2: La composición de edetato de sodio 0,247 mol era la siguiente:

Edetato de sodio -2Na: 2H<sub>2</sub>O, 91,95 g/l

NaOH, 9,88 g/l

\* 3: La composición de EK fue la siguiente:

25 lactobionato de eritromicina, 10.000 µg/ml

Sulfato de kanamicina, 50 000 µg/ml

\* 4: La composición del fluido de dilución de tripsina fue la siguiente:

NaCl, 8.000 mg/l

KCl, 400 mg/l

30 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 150 mg/l

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 60 mg/l

El subcultivo se llevó a cabo posteriormente mediante el mismo procedimiento (aunque, debido a que el área de superficie de cultivo se incrementa aproximadamente de 3 a 4 veces en un solo paso, los frascos de cultivo y el volumen de líquido manipulados diferían) a intervalos de 3 a 6 días, produciendo de este modo células de paso 129 (el número de paso se incrementa en uno cada vez que se lleva a cabo el subcultivo). Las células de paso 129 cultivadas fueron tratadas con tripsina en 33 matraces SR (matraces pequeños Roux: matraces de cultivo con un volumen de 727 ml y un área de superficie de crecimiento de células de 156 cm<sup>2</sup>) de la misma forma que durante el subcultivo y se llevó a cabo la centrifugación, después de la cual el sedimento se resuspendió hasta una concentración de aproximadamente células 1,5x10<sup>7</sup>/ml en un medio criopreservado (DME (Medio Eagle Modificado de Dulbecco ; Sigma, No. de catálogo D5523) que contenía 10% de sulfóxido de dimetilo (DMSO), 10% en volumen de suero bovino , 0,075% de bicarbonato de sodio, 20 µg/ml de eritromicina y 100 µg/ml de kanamicina (concentraciones finales)). Un mililitro de la suspensión de células anterior se dispensó a una ampolla, se bajó la temperatura a -32 °C en un congelador lento (a una velocidad de enfriamiento de aproximadamente 1 °C/minuto), después se transfirió a nitrógeno líquido y se conservó. Las células de paso 129 obtenidas como se describió anteriormente se utilizaron como Banco de Células Madre (MCB).

35

40

45

## (ii) Preparación del Banco de Células de Trabajo del Fabricante (MWCB)

Usando el Banco de Células Madre (MCB) preparado y conservado en la sección (i) anterior, los pasos de descongelación de las células en la ampolla hasta el crecimiento mediante el subcultivo de células hasta el paso 134 se llevaron a cabo básicamente de la misma manera que se utilizó para preparar el Banco de células madre (MCB) en el punto (i) anterior (aunque, debido a que el número de células de partida fue mayor, la cantidad de líquido manipulado y el tipo y número de matraces de cultivo difirió). Las células de paso 134 se conservaron en nitrógeno líquido de la misma manera que el Banco de Células Madre (MCB). Las células de paso 134 obtenidas de este modo se utilizaron como Banco de Células de Trabajo del Fabricante (MWCB).

**Ejemplo 1: Preparación de células para la producción de virus de vacuna antipoliomielítica**

## (i) Etapa de cultivo estático

Una ampolla del Banco de Células de Trabajo del Fabricante (MWCB) preparada y conservada en el Ejemplo de Referencia 1 anterior (células de paso 134), se descongeló de la misma manera que en la preparación del Banco de Células Madre (MCB) y Banco de Células de Trabajo del Fabricante (MWCB) en el Ejemplo de Referencia 1, y las células se cultivaron en sistema estático durante 7 días (paso 135) en tres matraces LR (matraces grandes de Roux, que son matraces de cultivo que tienen una capacidad de aproximadamente 1540 ml y un área de superficie de crecimiento de células de aproximadamente 274 cm<sup>2</sup>). El subcultivo se llevó a cabo hasta el día 7 desde el comienzo del cultivo estático, después de lo cual la escala de cultivo se amplió hasta 18 matraces LR (paso 136) y se llevó a cabo el cultivo estático. El cultivo estático y subcultivo del mismo se llevaron a cabo mediante el mismo método que en la preparación del Banco de Células Madre (MCB) y la preparación del Banco de Células de Trabajo del Fabricante (MWCB) en el Ejemplo de Referencia 1 anterior.

A continuación, 7 días de cultivo estático se llevó a cabo en una fábrica de células de bandeja 40 (Nunc, Catalogo No. 139446) (paso 137). El subcultivo a continuación se llevó a cabo en el día 7 tras el comienzo del cultivo estático, además de lo cual 7 días de cultivo estático se llevó a cabo en cuatro Fábricas de Células de bandeja 40 (paso 138).

## (ii) Etapa de cultivo de microportador

A continuación, las células de paso 138 obtenidas en la etapa de cultivo estático en el punto (i) anterior se trataron con tripsina y se centrifugaron de la misma manera que durante el subcultivo en el punto (i) anterior, y las células sedimentadas se suspendieron de manera uniforme mediante pipeteo en 1000 ml de un medio de crecimiento celular para el cultivo en microportador (DME (Medio Eagle Modificado de Dulbecco ; Sigma, número de catálogo D5523) que contenía 5 % en volumen de suero bovino (Thermo Trace), 0,11% de bicarbonato de sodio, 0,1% de fructosa, 20 µg/ml de eritromicina, y 100 µg/ml de kanamicina (concentraciones finales)). La suspensión celular se hinchó previamente con solución salina tamponada con fosfato (PBS), luego se mezcló con un microportador (Cytodex 1 (nombre comercial); GE Healthcare Biosciences) equilibrado con el medio de crecimiento celular para el cultivo en microportador (se utilizó 5 g/l de Cytodex 1 (nombre comercial), basado en el peso antes de la hinchazón), y el cultivo se llevó a cabo en tres recipientes de cultivo de 50 litros a 37 °C, pH 7,15 y bajo agitación.

A partir del día 2 de cultivo, la mitad del medio de crecimiento celular fue reemplazado sucesivamente una vez al día con medio de crecimiento celular fresco. Las células cultivadas durante 7 días se utilizaron como células (paso 139) para la producción de los virus de la vacuna antipoliomielítica.

**Ejemplo 2: Producción de la vacuna antipoliomielítica inactivada tipo I**

## (i) Etapa de cultivo de virus

Justo antes de la inoculación de los virus simiente en las células para la producción del virus de la vacuna antipoliomielítica obtenida en el Ejemplo 1 (paso 139), se detuvo la agitación y se dejó que las células sedimenten, a continuación se lavaron una vez utilizando solución salina equilibrada de Earl (EBSS) que contenía 0,075 % de bicarbonato de sodio, 20 µg/ml de eritromicina y 100 µg/ml de kanamicina (concentraciones finales). Después de retirar el sobrenadante de los 5 ml de medio de crecimiento celular recogido junto con el microportador, el volumen se llevó de nuevo a 5 ml mediante la adición de solución de tripsina al 0,25%, separando de esta forma las células de las perlas y haciendo que estas sean suspendidas. A continuación, se determinó el recuento de células, sobre la base del que se estimó el número de células para todo el recipiente de cultivo de 50 litros. Los virus simientes de Sabin atenuada tipo I (LSc, cepas 2ab) se inocularon en una concentración de aproximadamente 10<sup>-3</sup> DICC<sub>50</sub> por célula. Después de la inoculación de los virus simiente, 50 L de un medio de cultivo de virus (M199 (Medio 199) que contenía 0,3% de bicarbonato de sodio, 20 µg/ml de eritromicina y 100 µg/ml de kanamicina (concentraciones finales)) fue vertido inmediatamente en el recipiente de cultivo. Los virus simiente utilizados fueron los virus que habían sido cultivados previamente a aproximadamente 33,3 °C utilizando células de riñón cultivadas primarias de mono verde africano, y luego empaquetados en porciones pequeñas y criopreservados a -70 °C.

El cultivo del virus se llevó a cabo a 34 °C ± 1 °C durante 3 días. El uso de los efectos citopáticos por el poliovirus (redondeo de células infectadas con poliovirus, seguido de la separación de las células del microportador) como indicador, el cultivo del virus fue llevado a su fin cuando se habían desprendido del 95 al 100% de las células del

microportador. Tras la finalización del cultivo de virus, el microportador se eliminó con una malla de teflón (tamaño de poro, 120 µm), y se recuperó la suspensión de virus. El microportador que quedaba en la malla se lavó una vez con aproximadamente 3 L de medio de cultivo de virus por 50 L de recipiente de cultivo. El fluido de lavado resultante se añadió a la suspensión de virus recuperado, dando de este modo un " fluido de virus de la polio tipo I"

5 (ii) Etapa de concentración/purificación del virus

Aproximadamente 150 L de fluido de poliovirus tipo I obtenido en el punto (i) anterior se pasó a través de una membrana de filtro de 0,2 µm (Pall Corporation, SLK7002NRP) para eliminar los restos celulares. El filtrado se concentró hasta 1,2 l con una membrana de ultrafiltración (Sartorius, PESU (polietersulfona) 100 kDa, 0,1 m 2, 3051466801E - SG). El fluido de virus concentrado se formó en un pélet mediante 4 horas de ultracentrifugación a 6 °C y 100.000 g, y después de lo cual se resuspendió el pélet en 0,1 mol/l de tampón de fosfato (PB) (el pélet de un tubo de centrifuga (aproximadamente 100 ml) se resuspendió en 5 ml de PB). La re-suspensión de pélet se agitó durante la noche a 4 °C, a continuación se sometió a ultrasonidos (Kubota, Insonator Modelo 200M) durante 8 minutos a 200 W, disolviendo de este modo la masa de virus agregados. A continuación, después de 30 minutos de centrifugación a 15.000 rpm, se recogió el sobrenadante. El sobrenadante así obtenido fue purificado con DEAE Sefarosa CL-6B 3 (nombre comercial, GE Healthcare Biosciences; GE 17-0710-05). Tampón de fosfato (PB), 0,1 mol/ L, fue utilizado como eluato. La absorbancia a 280 nm se controló y el primer pico se recuperó como "fluido de poliovirus de tipo I purificado." Se calculó la absorbancia a 260/280 nm para el pico de la muestra y se confirmó que era mayor que 1,5 (260/280 nm de absorbancia para las partículas de poliovirus completas es de 1,6 a 1,7).

(iii) Etapa de inactivación

20 El fluido de poliovirus tipo I purificado obtenido en el punto (ii) anterior se diluyó aproximadamente 10 veces con una solución de dilución de pre-inactivación (M199 que contenía 5% de ácido aminoacético (concentración final), pero que contenía nada de calcio, magnesio, Fenol Rojo o bicarbonato de sodio), se pasó a través de una membrana de filtro de 0,2 µm (Pall Corporation, SLK7002NRP), y se eliminó la masa de los virus agregados. Después de la preparación del filtrado, la inactivación se inició rápidamente de una manera tal para evitar la agregación de virus de nuevo. Una hora antes del inicio de la inactivación, el filtrado y formalina que se diluyeron hasta 1: 200 se calentaron en forma separada a 37 ° C. Mientras se agitaba a fondo el filtrado, se añadió la formalina a una concentración final de 1: 4000, la mezcla se calentó hasta 37 °C, y se inició la inactivación. Durante el tratamiento con formalina, se realizó la inactivación del virus para proceder agitando de manera uniforme la mezcla dos veces al día - una vez en la primera mitad del día, y una vez en la segunda mitad del día. Anticipando que los virus insuficientemente inactivados se podrían adherir al tapón del recipiente y a ciertos lugares específicos dentro del recipiente, el tapón se cambió en los días 2 y 4 siguientes al inicio de la inactivación, y el propio recipiente fue cambiado en el día 6. Además, dada la posibilidad de que los virus podrían agregarse durante la etapa de inactivación, el día 6 de la inactivación, la filtración se llevó a cabo usando una membrana de filtro de 0,2 µm (Pall Corporation, SLK7002NRP). La etapa de tratamiento con formalina fue llevada a su fin después de 12 días. El día 12, la formalina libre en el fluido de virus tratado con formalina se neutralizó con sulfito sódico (añadido a una concentración de 0,0264 mol/ L), después de lo cual se añadió edetato sódico (0,0009 mol/ L) como un estabilizador, dando así un material a granel del "tipo inactivada me vacuna antipoliomielítica tipo I inactivada"

(iv) La cantidad de antígeno D se mide por un método ELISA indirecto utilizando anticuerpos que tienen una alta especificidad para el tipo y el antígeno D. El método ELISA indirecto se inicia mediante el recubrimiento de una microplaca con, como anticuerpo primario, un anticuerpo monoclonal (derivado de ratón) específico para los antígenos D del mismo tipo que el antígeno a ensayar. El antígeno a ensayar a continuación, se diluye y se coloca sobre la misma. A continuación, un anticuerpo policlonal de conejo del mismo tipo que el antígeno a ensayar se coloca sobre la misma como anticuerpo secundario, además de lo cual el anticuerpo IgG anti-conejo marcado con HRPO se coloca sobre la misma, efectuando una reacción. Después de la reacción, el desarrollo del color se lleva un cabo utilizando una solución de o-fenilenediamina, y se mide la absorbancia a 492 nm. La cantidad de antígeno D (antígeno ensayado) se determina comparando la absorbancia medida para el anticuerpo ensayado y la absorbancia medida para un antígeno de referencia por análisis cuantitativo de línea paralela.

**Ejemplo 3: Producción de vacuna antipoliomielítica inactivada tipo II**

50 Aparte de usar cepas Sabin atenuadas tipo II (P712, Ch, cepas 2ab) en lugar de cepas Sabin atenuadas tipo I (LSc, cepas 2ab), un material a granel de la "vacuna antipoliomielítica inactivada tipo II" se produjo de la misma manera que en el Ejemplo 2.

**Ejemplo 4: Producción de vacuna antipoliomielítica inactivada tipo III**

55 Aparte de usar cepas Sabin atenuadas tipo III (Leon, cepas 12a,b) en lugar de cepas Sabin atenuadas tipo I (LSc, cepas 2ab), un material a granel de la "vacuna antipoliomielítica tipo III inactivada" se produjo de la misma forma que en el Ejemplo 2.

**Ejemplo 5: Producción de antígeno protector de B. pertussis**

(1) El cultivo de Bordetella pertussis

## ES 2 560 452 T3

Las cepas de *B. pertussis* de fase I (cepa Tohama) se cultivaron con giro a 30 a 34°C durante 20 a 24 horas en un medio de Cohen-Wheeler. El *B. pertussis* cultivado en el medio de Cohen-Wheeler a continuación se cultivó en un medio de Stainer-Scholte a 30 y 34 °C durante 48 a 68 horas.

5 El cultivo se concentró hasta 1/10 veces el volumen original por ultracentrifugación, y el sobrenadante y las células bacterianas se separaron mediante separación centrífuga.

### (2) Preparación de toxina pertussis

10 A continuación, 1 mol/l de tampón de fosfato (pH 8,0) se añadió al sobrenadante obtenido en el punto (1) anterior con el fin de llevar el volumen hasta 1/10 veces el volumen original, a continuación, una solución de acetato de calcio al 25% p/v se agregó para llevar la concentración de 0,1 a 2,0% p/v, y un filtrado que contenía toxina pertussis (antígeno profiláctico) se obtuvo por filtración. El filtrado se hizo pasar a través de una columna mediante cromatografía en columna SP (solución equilibrada: 0,1 mol/l de tampón de fosfato (pH 6,0) y la toxina de pertussis adsorbida se eluyó con 0,415 mol/l de tampón de fosfato (pH 7,0), fraccionando con ello una solución que contenía toxina de pertussis. A continuación, la solución que contenía toxina de pertussis se pasó a través de una columna por cromatografía en columna de gel (solución equilibrada: 0,025 mol/l de solución de fosfato de sodio (pH 8,7) que contenía 0,25 mol/l de cloruro de sodio), después se filtró (tamaño de poro, 0,2 mm), dando una solución de toxina pertussis pura (antígeno PT).

### (3) Preparación de hemaglutinina filamentosa

20 Las células bacterianas aisladas en el punto (1) anterior se dispersaron en 0,05 mol/ L de tampón fosfato (pH 8,0) que contenía 1 mol/l cloruro de sodio, después de lo cual la separación centrífuga fue llevada a cabo para separar de nuevo el sobrenadante y las células bacterianas. Una solución de acetato de calcio 25% p/v se añadió al sobrenadante re-separado hasta una concentración de 0,1 a 2,0% p/v, tras lo cual se llevó a cabo la filtración, dando una solución que contenía hemaglutinina filamentosa (antígeno profiláctico). El filtrado se concentró con sulfato de amonio, después se purificó por centrifugación en gradiente de densidad, fraccionando con ello la hemaglutinina filamentosa pura (antígeno FHA).

### 25 (4) Preparación de proteína de membrana externa

30 Las células bacterianas que se separaron nuevamente en el punto (3) anterior se dispersaron en 0,01 mol/l de tampón de fosfato (pH 7,0) que contenía 0,145 mol/l de cloruro de sodio y se calentaron a 60 ° C durante 90 minutos, tras lo cual el sobrenadante y células bacterianas de nuevo se separaron por separación centrífuga. A continuación, 1 mol/l de tampón de fosfato (pH 8,0) se añadió al sobrenadante de nuevo re-separado para llevar el volumen hasta 1/10 veces, tras lo cual se añadió una solución de acetato de calcio 25% p/v hasta concentraciones de 0,1 a 2,0% p/v y se llevó a cabo la filtración, dando así un filtrado que contenía proteína de membrana externa (antígeno profiláctico). La solución que contenía proteína de membrana externa (antígeno profiláctico) se sometió a cromatografía en columna SP (solución equilibrada: 0,1 mol/l de tampón de fosfato (pH 6,0)), y se recogió el líquido que pasó a través de la columna. A continuación, el líquido se pasó a través de una columna por cromatografía en columna de gel (solución equilibrada: 0,025 mol/l de solución de fosfato de sodio (pH 8,7) que contenía 0,25 mol/ L de fosfato de sodio), después se filtró (tamaño de poro, 0,2 mm), dando así una proteína de membrana externa pura (antígeno 69 K).

### (5) Preparación de fimbrias (aglutinógenos (AGG))

40 0,1 mol/l de tampón de fosfato (pH 8,0) que contenía 1 mol/ L de cloruro de sodio se añadió al residuo dejado después de la recolección de la solución que contenía proteína de membrana externa en el punto (4) anteriormente en una cantidad 1/10 veces la cantidad de sobrenadante, después de lo cual se llevó a cabo la filtración, produciendo un filtrado que contenía fimbrias (antígeno profiláctico). La solución que contenía fimbrias resultante se concentró con sulfato de amonio, y luego se purificó por centrifugación por gradiente de densidad, fraccionamiento con ello las fimbrias puras (antígeno FB).

### 45 (6) Preparación del antígeno protector (atenuación)

50 Una solución que contenía el antígeno PT, antígeno FHA, antígeno 69 KD y antígeno FB obtenidos en las secciones (2) a (5) anteriores mezclada de tal manera que la vacuna combinada DPT preparada en el Ejemplo 8 a continuación incluirá niveles de antígeno de 1,89 µg de antígeno PT, 3,00 µg de antígeno FHA, 0,76 µg de antígeno 69K y 0,36 µg de antígeno FB por 0,5 ml de la vacuna se preparó como una solución de antígeno profiláctico puro. La formalina (de 0,2 a 0,5% en volumen) y, si es necesario, clorhidrato de lisina a una concentración de no más de 1% p/v se añadieron a la solución de antígeno profiláctico puro, después de lo cual la solución se calentó a 37 a 41 °C durante al menos 7 días para efectuar la atenuación, dando así una solución de antígeno protector contra la tos ferina. La formalina y clorhidrato de lisina en exceso se retiraron por ultrafiltración, dando un material a granel de antígeno protector de pertussis.

### 55 **Ejemplo 6: Producción del toxoide de difteria**

(1) Cultivo de *Corynebacterium diphtheriae*

*C. diphtheriae* (cepa Park-Williams No. 8) se cultivó en medio de Loefflera 32,0 a 34,0°C durante 5 días.

(2) Preparación de la toxina de difteria

5 Se añadió sulfato de amonio al fluido de cultivo obtenido en el punto(1) anterior, tras lo cual el sobrenadante se filtró (tamaño de poro, 0,45 µm). El filtrado resultante se pasó a través de una columna por cromatografía en columna hidrofóbica de fenilo (solución equilibrada: solución de fosfato de sodio 0,01 mol/ L (pH 6,5) que contenía 1,25 mol/l de sulfato de amonio). La solución de la toxina obtenida de este modo se pasó a través de una columna por cromatografía en columna de intercambio iónico DEAE (solución equilibrada: 0,01 mol/ L de tampón de fosfato (pH 7,0)), a continuación, se pasó a través de una columna por cromatografía en columna de gel (solución equilibrada: 10 0,1 mol/ L de tampón de fosfato (pH 7,0) que contenía 0,145 mol/ L de cloruro de sodio), fraccionando con ello la toxina de la difteria. Esto se utilizó como una solución de toxina pura.

(3) Conversión de la toxina de difteria a toxoide

15 A continuación, se añadió clorhidrato de lisina a la solución de toxina pura obtenida en el punto (2) anterior a una concentración de no más de 1% p/v, se añadió formalina a una concentración de 0,3% en volumen, y la solución se calentó a 38,0 a 40,0 °C durante 21 días, convirtiendo de este modo la toxina al toxoide.

(4) Preparación de toxoide de difteria

Después de la conversión a toxoide en el punto (3) anterior, la formalina y clorhidrato de lisina en exceso se eliminó por ultrafiltración, dando así un toxoide de difteria.

**Ejemplo 7: Producción de toxoide del tétanos**

20 (1) Cultivo de *Clostridium tetani*

*C. tetani* (Harvard 47-A) se cultivó en caldo de hígado a 34,5 °C a 36,5 °C durante 5 días.

(2) Preparación de la toxina del tétanos

25 Se añadió sulfato de amonio al cultivo obtenido en el punto (1) anterior hasta una concentración de 1,25 mol/ L por litro de cultivo. A continuación, el cultivo se pasó a través de una columna por cromatografía en columna hidrofóbica de fenilo (solución equilibrada: 0,01 mol/l de fosfato de sodio que contenía 1,25 mol/l de sulfato de amonio (pH 6,5)). La solución de toxina resultante se pasó a través de una columna por cromatografía de intercambio iónico DEAE (solución equilibrada: 0,01 mol/l de tampón de fosfato (pH 7,5)), tras lo cual la solución se pasó a través de una columna por cromatografía en columna de gel (solución equilibrada: 0.004 mol/l de tampón fosfato (pH 7,0) que contenía 0,145 mol/l de cloruro de sodio), fraccionando con ello la toxina del tétanos. Esto se utilizó como una 30 solución de toxina pura.

(3) Conversión de la toxina del tétanos a toxoide

A continuación, se añadió formalina a la solución de toxina pura obtenida en el punto (2) anterior hasta una concentración de 0,3% en volumen, el pH se corrigió a 7,0, y la solución se calentó a 39 °C durante 15 a 23 días, convirtiendo de este modo la toxina en toxoide.

35 (4) Preparación de toxoide del tétanos

Después de la conversión a toxoide en el punto (3) anterior, el exceso de formalina y clorhidrato de lisina se eliminó por ultrafiltración, dando así un toxoide del tétanos.

**Ejemplo 8: Producción de la vacuna combinada**

(i) Preparación de vacuna antipoliomielítica inactivada combinada

40 Los materiales a granel de la vacuna antipoliomielítica inactivada tipo I, vacuna antipoliomielítica inactivada tipo II y vacuna antipoliomielítica inactivada tipo III obtenidos en los Ejemplos 2, 3 y 4 anteriores se mezclaron con medio 199 (M199), 2-fenoxietanol (concentración final, 0,5 % en volumen) y cloruro de aluminio (concentración final, 0,09 % p/v) de tal manera para establecer los niveles relativos de los respectivos antígenos D en 3: 100: 100. La mezcla resultante se ajustó a un pH de 7 con hidróxido sódico o ácido clorhídrico, dando así una vacuna antipoliomielítica 45 inactivada combinada.

(ii) Producción de vacuna combinada DPT

Los materiales a granel de antígeno protector de *B. pertussis*, toxoide de difteria y toxoide del tétanos obtenidos en los Ejemplos 5, 6 y 7 anteriores se mezclaron con medio 199 (M199), 2-fenoxietanol (concentración final, 0,5 % en volumen) y cloruro de aluminio (concentración final, 0,24 % p/v). La mezcla resultante se ajustó a un pH de 7 con

hidróxido de sodio y ácido clorhídrico, dando así una vacuna DPT combinada.

(iii) Producción de vacuna combinada

5 La vacuna antipoliomielítica inactivada combinada obtenida en el punto (i) anterior y la vacuna combinada DPT obtenida en el punto (ii) anteriores se mezclaron en cantidades iguales, produciendo de este modo una vacuna combinada.

#### **Ejemplo 9: Estabilidad de la vacuna combinada**

La vacuna combinada obtenida en el Ejemplo 8 se midió mediante la realización de un ensayo acelerado a 25 °C. La estabilidad se evaluó mediante pruebas de potencia en cada uno de los virus.

(1) Prueba de potencia de vacuna contra la tos ferina pura precipitada

10 Se utilizan una muestra de ensayo, una vacuna contra la tos ferina estándar y cepa 18323 de *B. pertussis*. La muestra de ensayo y la vacuna estándar se diluyeron cada una, a partir de las cuales se prepararon a continuación diluciones de cada una en un total de al menos 3 diluciones en serie en intervalos logarítmicamente apropiados iguales de 4 veces o más. Un grupo de al menos dieciséis ratones de 4 semanas se utiliza para cada dilución. A cada animal se le da 0,5 ml de dilución en una sola inyección intraperitoneal. Veintiún días después de las inyecciones inmunes, se inyecta 0,025 ml de una suspensión de células bacterianas para el desafío en el cerebro de cada animal, después de lo cual se observan los animales durante 14 días y se anotó el número de muertes. A partir del tratamiento estadístico y la comparación de los resultados de prueba, la muestra de ensayo debe tener una potencia de al menos 8 unidades/ml.

(2) Prueba de potencia de toxoide de difteria precipitado

20 Se utilizan una muestra de ensayo, un toxoide de difteria precipitado de control y una solución adecuada toxina. La dilución de la muestra de ensayo y el control se lleva un cabo con solución salina fisiológica; la dilución de la solución de toxina se lleva un cabo con una solución de cloruro de sodio/ tampón de fosfato 0,017 mol/l (pH 7,0) que contiene 0,2% p/v de gelatina. La muestra de ensayo y el control se diluyen cada uno, creando diluciones seriadas en intervalos logarítmicamente iguales. Utilizando un grupo de al menos diez ratones de 5 semanas para cada dilución de la muestra de ensayo y el control, cada uno de los animales es inyectado por vía subcutánea con 0,5 ml. Cuatro a seis semanas después de las inyecciones inmunológicas, se extrae sangre de cada animal, y se mide el título de antitoxina en sangre. A partir del tratamiento estadístico y la comparación de los resultados de la prueba, la muestra de ensayo debe tener una potencia de al menos 47 unidades/ml.

(3) Prueba de potencia del toxoide del tétanos precipitado

30 Se utilizan una muestra de ensayo, un toxoide del tétanos precipitado de control y una solución adecuada toxina. La dilución de la muestra de ensayo y el control se lleva a cabo con solución salina fisiológica; la dilución de la solución de toxina se lleva a cabo con una solución de cloruro de sodio/tampón de fosfato 0,017 mol/l (pH 7,0) que contiene 0,2% p/v de gelatina. La muestra de ensayo y el control se diluyen cada uno, creando diluciones seriadas en intervalos logarítmicamente iguales. Utilizando un grupo de al menos diez ratones de 5 semanas, para cada dilución de la muestra de ensayo y el control, a cada animal se le da una única inyección subcutánea de 0,5 ml. Cuatro a seis semanas después de las inyecciones inmunes, cada ratón se expone a aproximadamente 100 DL<sub>50</sub> de toxina y se observa durante 4 días. A partir del tratamiento estadístico y la comparación de los resultados de prueba, la muestra de ensayo debe tener una potencia de al menos 27 unidades/ml.

(4) Ensayo de inmunogenicidad de ratas

40 Se utiliza una muestra de ensayo, un control para una prueba de potencia IPV, sueros estándar para cada tipo, y cepas Sabin de poliovirus (tipo I, II y III) para los desafíos de prueba de neutralización. La muestra de ensayo y control se diluyen cada uno, creando diluciones en intervalos logarítmicamente iguales. Se utiliza un grupo de al menos diez ratas hembra Wister de 8 semanas de edad para cada dilución. Cada animal se inocula por vía intramuscular con 0,5 ml en la región femoral de la pata trasera. Veintiún días después de la inoculación, se extrae sangre de forma individual de cada animal y se recoge el suero a continuación se calienta a 56 °C durante 30 minutos. El suero para cada animal y el suero estándar se colocan en al menos dos pocillos para cada suero, y se diluyen en serie 2 veces con medio MEM. Además, los pocillos respectivos se inoculan a aproximadamente 100 CCID<sub>50</sub> con neutralización de suspensiones de virus de los tipos respectivos. A continuación, todas las placas se colocan en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 36±1 °C durante 3 horas, después se deja reaccionar durante la noche a 4 °C aproximadamente. La suspensión celular que contiene 1x10<sup>4</sup> se agrega al día siguiente a cada pocillo, y se cultiva en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 36±1 °C durante 7 días. Después de la terminación del cultivo, se examina el CPE para cada pocillo, se calcula la relación de dilución de suero en el momento de 50% de neutralización, y el número recíproco del mismo se trata como el título de anticuerpo neutralizante. A partir del tratamiento estadístico y la comparación de los resultados de prueba, la muestra de ensayo debe tener una potencia igual a o superior que el control.

55

Los resultados para el ensayo acelerado se muestran en la Tabla 1. El Lote 04C (Instituto de Investigación de Polio de Japón) fue utilizado como IPV de control.

Tabla 1

	Especificación	Al comienzo del ensayo	1 mes	2 meses	3 meses
Vacuna antipoliomielítica inactivada tipo I	Igual a o mayor que el control	1,7	1,7	1,5	2,1
Vacuna antipoliomielítica inactivada tipo II	Igual a o mayor que el control	2,1	2,0	1,6	1,5
Vacuna antipoliomielítica inactivada tipo III	Igual a o mayor que el control	20,3	12,3	5,9	6,0
Pertussis puro precipitado	8 unidades/ml	15,8	13,8	14,6	27,3
toxoide de difteria precipitado	47 unidades/ml	97,9	109,3	85,9	102,9
toxoide del tétanos precipitado	27 unidades/ml	72,3	88,6	105,5	79,4

**Ejemplo 10: Cultivo de células Vero por procedimiento de microportador, y cultivo de poliovirus**

5 (i) Cultivo de células Vero

Las células que habían sido subcultivadas en un cultivo estático a partir de un banco de trabajo de células Vero (MWCB93) fueron separadas con una solución de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina, 0,14 M EDTA), a continuación, se centrifugaron a 600 rpm durante 10 minutos y posteriormente se suspendieron en un medio de crecimiento celular (Medio Eagle modificado de Dulbecco (DME) que contenía 5% en volumen de suero bovino, 0,11% de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), 0,1% de fructosa, 20 µg/ml de eritromicina y 100 µg/ml de kanamicina).

Un microportador (Cytodex 1 (nombre comercial) se hinchó en PBS (-), se esterilizó por autoclave a 121 °C durante 15 minutos, a continuación se sustituyó con medio de crecimiento celular y se utilizó.

Se utilizaron bioreactores Celligen Plus y CelliGen fabricados por New Brunswick Scientific como aparatos cultivo. El microportador y la suspensión celular se añadieron al biorreactor, tras lo cual se añadió el medio de crecimiento celular hasta un volumen final de 4,8 l (en el caso del biorreactor Celligen, 3,5 l) y el cultivo se llevó a cabo a una temperatura de 37,0 °C, una concentración de oxígeno disuelto (DO) de 15%, un pH de 7,15 y una velocidad de rotación de 35 al 50 rpm. El intercambio de medio usando medio de crecimiento celular que tenía NaHCO<sub>3</sub> en la concentración de 0,15% como medio de intercambio se llevó a cabo de forma continua desde el día 2 de cultivo a una velocidad de aproximadamente 4 l/día (en el caso del bioreactor Celligen, toda la cantidad del medio se intercambió una vez cada dos días). El recuento de células se midió usando un contador Coulter (nombre comercial).

Los resultados de cultivo celular se muestran en la FIG. 1 (se utilizaron bioreactores CelliGen sólo en las pruebas 3H). En una concentración de portador de 3 g/l, el recuento de células alcanzó un máximo en el día 7 en un número de células de partida de baja concentración (3L, aproximadamente 2x10<sup>5</sup> células/ml) y alcanzó un máximo en el día 8 en un número de células de partida de alta concentración (3H, aproximadamente 10x10<sup>5</sup> células/ml), tras lo cual disminuyó. En una concentración de portador de 5 g/l, el recuento de células se incrementó durante un período de 11 días en un número de células de partida de baja concentración (2x10<sup>5</sup> células, aproximadamente 5l/ml), pero el recuento de células disminuyó en el día 12. En el caso de un número de células de partida de baja concentración, el recuento total de células en una concentración de portador de 5 g/l fue mayor en el día 10 que el recuento total de células en un nivel de portador de 3 g/l, pero la diferencia no era grande. En una concentración de portador de 5 g/l y un número de células de partida de alta concentración (5H, aproximadamente 10x10<sup>5</sup> células/ml), el recuento celular seguía aumentando en el día 9, siendo el recuento de células en ese punto aproximadamente 2,8x10<sup>6</sup> células/ml, lo que representa un incremento del aproximadamente 2,7 veces el número de células de partida.

(ii) Cultivo de poliovirus

Un poliovirus de tipo I (IS-90C) se utilizó como virus simiente. En el último día de las mediciones de recuento de células, las células se lavaron con un volumen de 4 veces (según la capacidad de cultivo de bioreactor) de EBSS que contenía 0,075% de NaHCO<sub>3</sub>. El virus simiente después se diluyó en 1 litro de medio M-199 (E) que contenía 0,3% de NaHCO<sub>3</sub>, 20 µg/ml de eritromicina y 100 µg/ml de kanamicina (medio de crecimiento de virus). A



continuación, la dilución de virus resultante se inoculó en las células lavadas, y el medio de cultivo de virus se añadió hasta las capacidades de cultivo de los respectivos biorreactores. El cultivo del virus se realizó a una temperatura de cultivo de 33,3 °C, 15% de oxígeno disuelto (OD), un pH de 7,40 y una velocidad de rotación de 35 al 50 rpm. El cultivo del virus se detuvo cuando las células se habían separado completamente del microportador debido a los efectos citopáticos (CPE) del virus, momento en el que se cosechó el fluido de virus. El fluido de virus cosechado se crioconservó a -80 °C.

En esta prueba, el cultivo de virus se inició en el último día de la medición de las curvas de crecimiento de células respectivas que se muestran en la FIG. 1.

La medición de la concentración de virus se llevó a cabo de la siguiente manera. Las células GMK-2 cultivadas durante 3 días en un tubo de rodillo se lavaron dos veces con 1 ml de HBSS que contenía 0,075% de NaHCO<sub>3</sub>, 200 u/ml de penicilina y 200 µg/ml de estreptomina, después de lo cual se añadió 1 ml de un fluido de mantenimiento de células (M -medio 199 que contenía 0,1% de albúmina de suero bovino, 0,225% de NaHCO<sub>3</sub>, 200 µg/ml de penicilina y 200 µg/ml de estreptomina). El fluido de virus de ensayo se diluyó en serie 0,5 log<sub>10</sub> con el fluido de mantenimiento de células, y 0,2 ml de 10<sup>-7</sup> a 10<sup>-8</sup> fluido de virus por tubo se inoculó en 5 tubos en cada nivel de dilución. Después de la inoculación, el cultivo se llevó a cabo durante 7 días en una incubadora a 36 °C. El título de infectividad (CCID<sub>50</sub>/0,2 ml) se calculó por el método de Reed y Muench basado en un juicio de observación de los efectos citopáticos (CPE) en el día 7.

La FIG. 2 muestra los títulos de infectividad (títulos de virus) de poliovirus de tipo I obtenidas en las células Vero cultivadas bajo varias condiciones. Como resultado del cultivo de virus, el título de infectividad más alta se obtuvo en el sistema que tenía una concentración de portador de 5 g/l y un número de células de partida de alta concentración (5H); este sistema alcanzó una densidad celular en el día 9 de 2,8x10<sup>6</sup> células/ml. Los sistemas, dispuestos según el tamaño de los títulos de infectividad de los mismos en orden descendente, fueron 5H, 5L y 3L. Estos resultados estaban de acuerdo con los recuentos de células totales. Además, en comparación con el fluido de virus obtenido por el cultivo en células de riñón de mono verde como control, se obtuvo un título de infectividad más de 10 veces más alto en el sistema de 5H. Los títulos de virus que se muestran en la FIG. 2 (log<sub>10</sub> DICC<sub>50</sub>/0,2 ml) fueron 8,18 en el sistema 3L, 8,51 en el sistema 5L, 8,59 en el sistema 5H, y 7,50 en la Ref. (control).

**Aplicabilidad industrial**

Las cepas Sabin de alta potencia de los poliovirus pueden ser obtenidas por cultivo, en presencia de 4 g/l a 6 g/l de un microportador, de células Vero inoculadas con poliovirus de la cepa Sabin. Los poliovirus de cepa Sabin inactivada se pueden producir de manera eficiente mediante el uso de poliovirus de cepa Sabin de alta potencia. Por lo tanto, un procedimiento para producir una vacuna combinada que incluye la etapa de cultivo, en presencia de 4 g/l de 6 g/l de microportador, de células Vero inoculadas con poliovirus de cepa Sabin (el procedimiento de producción de la presente invención) es útil como un procedimiento para producir eficazmente vacunas combinadas que contienen poliovirus de cepa Sabin inactivada. Además, debido a que la vacuna combinada producida por el procedimiento de la presente invención es capaz de suprimir efectivamente la aparición de la polio, tos ferina, difteria y tétanos, es útil como una vacuna para la poliomieltitis, tos ferina, difteria y el tétanos

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de producción de una vacuna combinada que contiene
- (A) cepas Sabin inactivadas tipo I, tipo II y tipo III de poliovirus en una proporción, en peso de los respectivos antígenos D, de (2 a 4) : (80 a 120) : (80 a 120),
- 5 (B) un antígeno protector de Bordetella pertussis,
- (C) un toxoide de difteria, y
  - (D) un toxoide del tétanos,
- el procedimiento que comprende
- (a) una etapa de cultivar, en presencia de 4 g/l a 6 g/l de un microportador, células Vero a ser inoculadas con una cepa Sabin de poliovirus, en el que la etapa de cultivo es conducida en un medio de cultivo que se selecciona del medio ME, medio DME, medio RPMI 1640, y medio 199, que contienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 % en volumen de suero bovino o suero fetal bovino;
- 10 (b) una etapa de infectar las células Vero que están unidas al microportador con tipo I, tipo II y tipo III de cepa Sabin de poliovirus, en forma separada;
- (c) una etapa de permitir que el poliovirus proliferare;
- 15 (d) una etapa de recuperar un fluido de virus que contiene el poliovirus;
- (e) una etapa de inactivar el poliovirus;
- (f) mezclar la vacuna antipoliomielítica inactivada tipo I, vacuna antipoliomielítica inactivada tipo II y vacuna antipoliomielítica inactivada tipo III obtenibles en el punto (e) como para establecer los niveles relativos de los respectivos antígenos D en (2 a 4):(80 a 120):(80 a 120); y
- 20 (g) combinar dicha vacuna antipoliomielítica inactivada mixta obtenida en el punto (f) y el antígeno protector de B. pertussis, toxoide de difteria y toxoide de tétanos.
2. El procedimiento de acuerdo a la reivindicación 1, en el que el microportador tiene una concentración de aproximadamente 5 g/l.
- 25 3. El procedimiento de acuerdo a la reivindicación 1, en el que el microportador es un microportador de dextrano.
4. El procedimiento de acuerdo a la reivindicación 1, en el que la etapa de cultivo de las células Vero (etapa (a)) se lleva a cabo en una escala de al menos aproximadamente 3 L.
5. El procedimiento de acuerdo a la reivindicación 1, en el que la etapa de cultivo de las células Vero (etapa (a)) se lleva a cabo en una escala de al menos aproximadamente 30 L.
- 30 6. El procedimiento de acuerdo a la reivindicación 1, que además comprende (d-2) una etapa para purificar el fluido de virus.
7. El procedimiento de acuerdo a la reivindicación 6, en el que la etapa de purificación (etapa (d-2)) comprende:
- (i) formar el fluido de virus recuperado en la etapa (d) en un pélet por ultracentrifugación,
  - (ii) someter a sonicación una re-suspensión del pélet; y
- 35 (iii) purificar por cromatografía en columna.
8. El procedimiento de acuerdo a la reivindicación 7, en el que la purificación por cromatografía en columna (iii) se lleva a cabo una sola vez.

Fig. 1

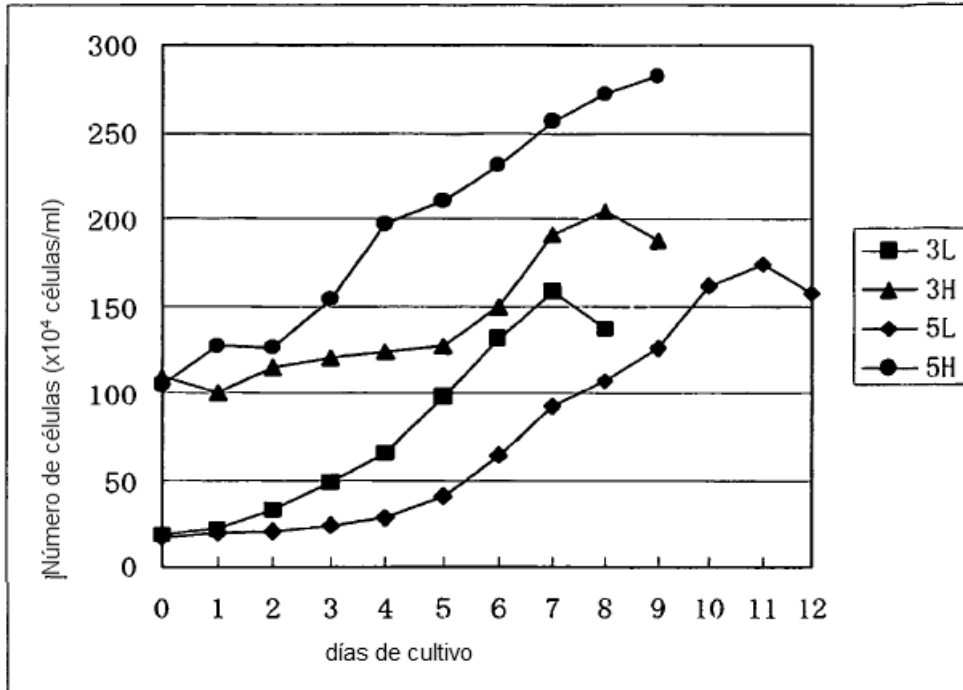


Fig. 2

