

Vacuna combinada cubana Trivac HB®

✉ Néstor S. Expósito¹, Daniel Cardoso², Eduardo Martínez¹, Yanelis Herrera², Karelía Cosme³, Pablo A. Díaz⁴, Yayrí C. Prieto¹, Zoe Núñez¹, Mabel Izquierdo⁵, Orestes Mayo⁶, Joel Pérez⁶, Luis C Hidalgo⁶

¹Departamento de Desarrollo de Vacunas Combinadas, ³Departamento de Bioterio,
⁴Departamento de Estudios Clínicos, ⁵Departamento de Control de Calidad,
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, AP 10600, Cubanacán, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: nestor.exposito@cigb.edu.cu

²Producción de Vacuna DPT, Instituto de Sueros y Vacunas "Finlay"
Ave 27 # 19805, AP 16017, La Coronela, La Lisa, Cuba

⁶Centro Nacional de Biopreparados, Carretera a Beltrán,
Km 1 ½, Bejucal, AP 6048, La Habana

RESUMEN

En este trabajo se presenta el diseño tecnológico, así como las etapas de desarrollo hasta su introducción en el Programa Ampliado de Inmunización (PAI), de una vacuna combinada cubana constituida por la anatoxina diftérica, la anatoxina tetánica, células enteras de *Bordetella pertussis* y el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B recombinante (DPT-HB). Su nombre comercial es Trivac HB®. Como elemento novedoso en su diseño se utilizó el adyuvante hidróxido de aluminio, lo cual permite evadir la patente de Glaxo Smith Kline para vacunas combinadas. Esta es la segunda vacuna combinada tetravalente registrada en el mundo y la primera en Latinoamérica que contiene esos antígenos. La formulación de la vacuna tetravalente cubana Trivac HB®, obtenida con tecnología cubana, es estable durante 24 meses, almacenada entre 3 ± 5 °C. Se ha demostrado que es una vacuna eficaz y bien tolerada por los niños, por lo que fue registrada en Cuba en el año 2004.

Introducción

La GAVI (Global Alliance for Vaccines and Immunization) fue creada con la voluntad y la experiencia de un grupo de investigadores, concededores y productores de vacunas en el mundo. Es una alianza histórica, lograda entre el sector privado y el público, que tiene como misión fundamental salvar niños y proteger a las personas de diversas enfermedades, con el uso extensivo de vacunas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF), mediante el programa Visión y Estrategia Mundial de Inmunización (VEMI), han fijado tres metas principales: inmunizar la mayor cantidad de personas contra más enfermedades; introducir en el mundo varias vacunas y tecnologías disponibles desde hace poco tiempo; y llevar a cabo varias intervenciones de salud decisivas mediante la inmunización.

A lo largo de la historia, la vacunación ha sido una de las intervenciones de salud pública de mayor éxito, costo y eficacia. Ha permitido erradicar la viruela, reducir la incidencia mundial de poliomielitis en 99% desde 1988, y reducir grandemente la morbilidad y la mortalidad por difteria, tétanos, tos ferina y sarampión. Solo en 2003, la inmunización evitó más de 2 millones de muertes. Sin embargo, la inmunización está lejos de ser universal: muchos países están retrocediendo desde los niveles de cobertura vacunal que habían conseguido alcanzar. En 2003, alrededor de 27 millones de lactantes y 40 millones de embarazadas de todo el mundo no estuvieron protegidos mediante la vacunación frente a las enfermedades prevenibles. "Uno de cada cuatro niños sigue privado de vacunas que salvan vidas y a las que deberían tener acceso", señaló la Directora Ejecutiva de la UNICEF, Ann M. Veneman. "Esta nueva estrategia reconoce que, si queremos mejorar la supervivencia infantil, la inmunización debe mantenerse año tras año."

La OMS, la UNICEF y la GAVI han reiterado desde hace algunos años las ventajas de introducir nuevas vacunas, las llamadas "vacunas combinadas", que inmunizan de una vez contra cuatro o cinco enfermedades, en lugar de tener que aplicar dos o tres vacunas por separado. Esto responde a diversos factores, ya que los beneficios son obvios: se emplean menos agujas, menos procedimientos de manipulación, menos demanda de personal para garantizar la vacunación, se reducen las visitas de los niños y padres a los vacunatorios, entre otros. En la actualidad, el suministro de estas vacunas no puede responder a la demanda mundial, lo cual tardará algunos años para que esto se materialice [1].

Las recomendaciones de estas organizaciones mundiales son que existen dos combinaciones de vacunas muy importantes en las que se debe trabajar: una tetravalente que incluye las vacunas contra la difteria, el tétanos, la pertussis y la hepatitis B (DTP-HB) y otra pentavalente que, además de las anteriores, incluye una quinta vacuna, la de *Haemophilus influenzae* tipo b (DTP-HB-Hib). Es importante señalar que el mundo está desabastecido de estas vacunas; por ello, la secretaria ejecutiva de la GAVI manifestó: "Esto ha creado un gran reto para nosotros" [2].

Las vacunas combinadas se fabrican a partir de dos o más vacunas, físicamente mezcladas, que se administran al mismo tiempo y en el mismo sitio anatómico [3]. La primera combinación de vacuna data del año 1949 [4], en que se mezclaron la vacuna antitosferinosa con la antitetánica. Desde entonces y hasta el año 1983 se registraron 13 compuestos. No obstante, en estas dos últimas décadas ha crecido el interés por las vacunas combinadas. Los motivos fundamentales son:

1. Se dispone de alrededor de 30 vacunas, de las cuales tres son parenterales: la antipolimiéltis, la

1. Immunize Every Child, GAVI policy document, February 2000.

2. Immunization Focus - the GAVI quarterly. More combination vaccines needed. Faced with a bigger than expected shortfall in supplies of some vaccines, countries must make choices. Phyllida Brown reports. Special Report (December) 2001.

3. Rennels M. Combination vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:255-7.

4. Children's Vaccine Initiative. Combination vaccines- juggling with the options. *CVI Forum* 1998:16.

vacuna contra la fiebre tifoidea y la vacuna contra el cólera.

2. Se encuentran en fase de investigación y desarrollo aproximadamente 200 vacunas, y se prevé que para el año 2010 estarán en el mercado mundial 25 vacunas infantiles.

3. Los gestores de los programas de vacunación se preguntan si no estamos convirtiendo a los niños en "alfilereros" [5].

4. Hasta que no se disponga de vacunas orales para todas o para la mayoría de las enfermedades inmuno-prevenibles, sería ideal poder combinar el mayor número de antígenos en una sola inyección.

Los beneficios derivados de la utilización de las vacunas combinadas son evidentes:

1. Disminuyen las inoculaciones, así como el sufrimiento y la ansiedad del receptor y de sus tutores.

2. Disminuyen las visitas al puesto de vacunación, lo cual conlleva una disminución de los costos sociales asociados con la vacunación.

3. Aumenta la aceptación de los programas de vacunación por parte de los padres y del personal sanitario [6].

4. Disminuyen los costos asociados con el transporte del material inmunizante y su almacenamiento [7].

5. Disminuyen los costos de la administración de las vacunas, al disminuir los actos sanitarios y el empleo de jeringuillas y de agujas para inyección.

En sentido estricto y al menos desde una perspectiva teórica, la existencia de vacunas combinadas también puede tener algunas desventajas para el vacunador [8]. Entre los antígenos pueden existir interferencias que provoquen la disminución de la potencia de uno o todos sus componentes, así como su estabilidad. Las interferencias pueden ser físicas (temperatura máxima de potencia óptima) o químicas entre los distintos adyuvantes, preservantes, inactivadores o estabilizantes [9]. Podría haber incompatibilidad entre las vacunas de DTP y las de VPI, por la presencia o ausencia de tiomerosal [10], por interferencia inmunológica y por interferencia biológica entre agentes atenuados [11]. En estas situaciones, tras la administración combinada de uno o más de los productos, la respuesta inmune ha sido inferior a la que se obtuvo tras la administración individual.

A pesar de las dificultades en el desarrollo y la comercialización, actualmente en el mercado mundial se encuentra gran cantidad de vacunas combinadas, algunas de ellas muy utilizadas. Casi todas tienen como componente básico: difteria, tétanos y *B. pertussis* celular o acelular.

Desde el año 1992, Cuba dispone de la vacuna contra la hepatitis B, Heberbiovac HB[®], y desde hace dos años logró registrar la vacuna DPT. A partir del interés de que este grupo vanguardia de investigadores se incorporara en el desarrollo de vacunas combinadas, por todas las ventajas que estas proporcionan y por considerarse que en un futuro Cuba sea un país suministrador de estas vacunas a UNICEF y a GAVI, se decidió desarrollar un proyecto tecnológico de una vacuna combinada cubana tetravalente, es decir, que incluyera ambas vacunas en una sola. Por ello, a partir del año 1997 comenzó la ejecución de este proyecto conjunto entre el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) y el Instituto "Finlay".

La fabricación de una vacuna combinada no es tan simple como agregar y mezclar antígenos. Los componentes tienen que ser compatibles física, química y biológicamente, no solo entre ellos, sino también con los excipientes, preservantes y adyuvantes. El desarrollo de esta vacuna requirió de varios estudios de laboratorio, estudios de preformulación, estabilidad, estudios toxicológicos y clínicos.

En este trabajo se presentan, de manera resumida, las etapas del desarrollo del producto, en las cuales se empleó únicamente tecnología cubana, por lo que se evade la patente de vacunas combinadas de la compañía Glaxo Smith Kline, líder mundial en la comercialización de este tipo de vacunas. Ello permite comercializar el producto sin problemas de interferencia en la propiedad intelectual.

Materiales y métodos

Etapa de preformulación

Se diseñaron tres variantes tecnológicas de formulación a escala de 1 litro cada una, en las cuales se utilizó el adyuvante hidróxido de aluminio Alhydrogel 3% (Brenntag, Dinamarca), y los mismos lotes de anatoxinas diftérica (D), tetánica (T), *B. pertussis* (P), así como el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B recombinante (AgsHB) (tabla 1), aprobados por las direcciones de calidad del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) y el Instituto de Sueros y Vacunas "Finlay". Como preservante se utilizó el tiomerosal.

La descripción de las estrategias de formulación fue la siguiente:

1. Para las variantes 1 y 2, se adicionó el AgsHB a la formulación, sin que fuera previamente adsorbido al gel de hidróxido de aluminio.

2. Para la variante 3, el AgsHB se adsorbió al gel antes de ser incorporado a la formulación. Por ello, al añadir el componente de células enteras de *Bordetella pertussis* no interactuaron directamente con el AgsHB.

3. La adición de los antígenos en las tres variantes se realizó teniendo en cuenta el peso molecular de cada uno ellos, o sea, de menor a mayor peso molecular. Por esto, primero se incorporó la anatoxina diftérica, cuyo peso molecular es de 63 000 Da, luego se añadió la anatoxina tetánica, que tiene un peso molecular de 150 000 Da, después el AgsHB, que es una partícula de 42 nm y finalmente las células de *B. pertussis* muertas que miden entre 1 y 2 µm. Este procedimiento se utilizó con el objetivo de reducir posibles impedimentos estéricos entre los antígenos.

4. Para controlar el pH de la formulación durante el tiempo de almacenamiento, se adicionó una solución tampón de fosfato (PBS) a una concentración de 4 mM, la cual favorece, junto con la solución salina, la isotonicidad de la preparación.

5. Gorlick G. Are we turning kids into pincushions? *Contemp Ped* 1991;8:23.

6. American Academy of Pediatrics. Combination vaccines for childhood immunizations: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), the American Academy of Pediatrics (AAP), and the American Academy of Family Physicians. *Pediatrics* 1999;103:1064-77.

7. Urbitzondo L, Peña A, Boldú M, Taberner J, Batalla J. Implicaciones logísticas de la evolución de los calendarios de vacunación y de las presentaciones de las vacunas. *Vacunas. Investigación y práctica* 2001;2: 58-63.

8. Le Ch. Combination vaccines: choices or chaos? A practitioner's perspective. *Clin Infect Dis* 2001;33:S367-71.

9. Vose J. Regulatory considerations for developers. In: Ronald W. Ellis (ed.) *Combination vaccines*. Human Press, Totowa, NJ, 1999:213-33.

10. Insel R. Potential alterations in immunogenicity by combining or simultaneously administering vaccine components. *Ann N Y Acad Sci* 1995;754:35-47.

11. Falk L, Arciniega J, McVittie L. Manufacturing issues with combining different antigens: a regulatory perspective. *Clin Infect Dis* 2001;33:S351-5.

Tabla 1. Lotes de anatoxina diftérica, tetánica, *B. pertussis* y AgsHB utilizadas en la formulación de las tres variantes tecnológicas en el estudio de preformulación

Antígeno	Lote	Concentración	Pureza
T. diftérico	002/97	660 Lf/mL	3 300 Lf/mg NP
T. tetánico	P-019/96	1 000 Lf/mL	1400 Lf/mg NP
<i>B. pertussis</i>	A-2/97	788 U.O.	No se realiza
AgsHB	02MPAC625	1.27 mg/mL	>95%

Las variantes tecnológicas que se estudiaron fueron:

Variante 1: Los antígenos se adicionaron en serie y la fracción de *B. pertussis* se añadió en dos fracciones.

Variante 2: Los antígenos se adicionaron en serie y la fracción *B. pertussis* fue añadida en 1 fracción.

Variante 3: Se añadió a la formulación el AgsHB adsorbido previamente al gel de hidróxido de aluminio y la fracción *B. pertussis*, en 1 fracción.

Estas tres variantes presentaron la misma composición para cada uno de los ingredientes.

Posteriormente, se evaluaron las variantes formuladas con los ensayos biológicos de potencia de los cuatro antígenos y la inmunogenicidad del AgsHB, con el objetivo de definir la variante más adecuada de acuerdo con los resultados. Los ensayos se realizaron al concluir la formulación (T = 0) y a los 6 meses de estar almacenados a una temperatura de 5 ± 3 °C. A partir de esta selección, se formularon tres lotes a escala de 5 litros con diferentes ingredientes farma-céuticos activos (IFA), los cuales se sometieron a un riguroso estudio de estabilidad.

La metodología para los ensayos biológicos de potencia para difteria, *B. pertussis*, tétanos y hepatitis B, así como la inmunogenicidad contra el AgsHB se describe a continuación.

Potencia de las anatoxinas diftérica y tetánica

La potencia de las anatoxinas diftérica y tetánica se realizó para determinar el grado de protección que confiere la vacuna, expresado en unidades internacionales (UI) de antitoxina diftérica y tetánica presentes en el suero de los animales que habían recibido los estímulos antigénicos correspondientes. Se utilizaron los Procedimientos Patrones de Operación establecidos para cada uno de estos ensayos [12-13].

El procedimiento se basó en la capacidad de neutralización que tienen la antitoxina diftérica y la tetánica presentes en el suero de los animales inmunizados con la vacuna en estudio, frente a una toxina de referencia. El lote pasa los ensayos de potencia de la anatoxina diftérica y la tetánica si el valor obtenido es mayor o igual que 2 UI/mL.

Potencia de la *Bordetella pertussis*

Para la potencia de la *B. pertussis* este ensayo se utilizó el método para la determinación del grado de protección que confiere la vacuna en estudio, expresada en UI de protección, contra la *Bordetella pertussis* presente en el suero de los animales que han recibido los estímulos antigénicos correspondientes con la vacuna que se ensaya.

Este ensayo de potencia se basa en la capacidad de la vacuna de proteger ratones previamente inmunizados, los cuales se desafiaron en el cerebro con la cepa de reto de *Bordetella pertussis* 18323, utilizada internacionalmente para estos fines y que se caracteriza por su alta virulencia.

Para determinar la potencia de *B. pertussis* se utilizó el procedimiento patrón de operación para este ensayo [14]. El lote pasa el ensayo de potencia de *Bordetella pertussis* si el valor obtenido es mayor o igual que 4 UI/dosis de 0.5 mL y el límite inferior es mayor o igual que 2 UI/dosis de 0.5 mL.

Potencia relativa del AgsHB

Estudio de la inmunogenicidad del componente AgsHB

El objetivo del estudio de la inmunogenicidad del componente AgsHB fue comparar los resultados de la respuesta inmune de este componente en las tres variantes, mediante la medición de los títulos de anticuerpos contra este antígeno.

Para realizar el estudio se utilizaron cinco grupos de 10 ratones balb/c cada uno, las tres variantes en estudio, un lote de referencia de la vacuna de HB (HB 07-0902) y un placebo.

La metodología utilizada para la medición de los títulos anti-HB fue la siguiente: se inmunizaron los ratones con diferentes administraciones de las vacunas (1.25, 0.312, 0.075, 0.039, 0.019 µg), por vía intraperitoneal con administración única. A los 28 días se desangraron estos animales.

Para la determinación de los títulos de anti-HB se utilizó la concentración de trabajo de 1.25 µg, que corresponde a la dilución 1/16, por ser la primera dilución en la cual debe obtenerse el mayor número de seroconversión de animales. Los sueros de los ratones correspondientes a esta dilución se mezclaron para obtener mayor volumen de la muestra y un valor único de respuesta, independientemente de la de cada animal. Para este ensayo se utilizó el procedimiento patrón establecido [16].

Etapa de estabilidad

El objetivo de esta etapa fue estudiar qué tiempo de estabilidad alcanzaría la vacuna tetravalente Trivac HB®, formulada con tecnología cubana y almacenada a 3 ± 5 °C. Aunque se tomen todas las precauciones para evitar la degradación de los productos biológicos, es casi inevitable que ocurran pérdidas de su actividad. Por ello, se hace necesario realizar un estudio de estabilidad real, para garantizar un producto estable por un tiempo determinado y poder garantizar el estudio clínico de este.

Para el estudio de estabilidad se utilizaron tres lotes producidos de forma consecutiva (DPT-HB/VII, DPT-HB/VIII y DPT-HB/IX), para lo cual se empleó el mismo procedimiento de formulación de la variante 3 y se evaluó la tecnología utilizada.

Metodología general del estudio

Los tres lotes se formularon utilizando lotes diferentes de IFA de D, P, T y HB. Las muestras de cada lote se almacenaron en una cámara fría que mantuvo la temperatura controlada entre 5 ± 3 °C. El estudio de estabilidad se realizó cada 6 meses, bajo una planificación de muestreo, excepto el último año en que se realizó a los 12 meses, y se evaluaron diferentes parámetros físicos, químicos y biológicos. El estudio se extendió hasta 30 meses.

Etapa del estudio preclínico

El propósito del estudio preclínico fue determinar la toxicidad intrínseca de la vacuna combinada DPT-HB, tras la administración de dosis suficientemente elevadas por vía intramuscular, el día inicial del ensayo y con un período de observación de 14 días. Se necesita saber si provocaba signos clínicos de toxicidad, la muerte de los animales o ambos.

12. PNO 12-237 y PNO 12-131. Procedimiento para determinar la potencia de la anatoxina tetánica.

13. PNO 12-137 y PNO 12-047. Procedimiento para determinar la potencia de la anatoxina diftérica.

14. PNO 12-043. Procedimiento para determinar la potencia de la *Bordetella pertussis*.

15. PPO 4.09.060.92. Edición 05. Procedimiento para la determinación de la potencia in vivo de la Vacuna Recombinante contra la Hepatitis B y la vacuna combinada DPT-HB.

16. PPO 4.09.038.92. Edición 05. Procedimiento para determinar la concentración de los anticuerpos monoclonales anti-hepatitis B por ELISA.

Los estudios preclínicos fueron:

1. Evaluación de la toxicidad aguda en ratas Sprague-Dawley.
2. Evaluación de la toxicidad aguda de la vacuna combinada DPT-HB en ratones balb/c.
3. Evaluación de la tolerancia local de la vacuna combinada DPT-HB en ratones OF-1.

Los protocolos describen los ensayos de toxicidad similares a los designados como el 401 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), pero mediante la vía intramuscular, por lo que se correspondió con los lineamientos de la OCDE [17]. Para estos ensayos se propuso la evaluación de la formulación final que se utilizó en el estudio clínico. Las dosis evaluadas se seleccionaron teniendo en cuenta la relación antígeno-adyuvante. La dosis menor fue 15 veces superior a la dosis del estudio clínico, una intermedia: 30 veces mayor y la alta: 60 veces superior. Para la evaluación de la tolerancia local en ratones OF-1, se tuvo en cuenta que el volumen máximo de administración para las ratas por la vía intramuscular es de 0.5 mL, por lo que la dosis mayor se aplicó en ambas patas, para así garantizar la aplicación del volumen total de esta.

Etapa de estudios clínicos

La etapa de estudios clínicos se diseñó teniendo en cuenta dos fases: la fase I, cuyo objetivo fue evaluar la reactogenicidad de la vacuna en estudio; y la fase II de inmunogenicidad, cuyo objetivo fundamental fue evaluar los sujetos que seroconvirtieron, así como los títulos de anticuerpos producidos por la vacuna en estudio para cada uno de los cuatro antígenos.

El estudio clínico para la caracterización de la inmunogenicidad y la reactogenicidad (eventos adversos) de la vacuna combinada Trivac-HB[®], fue abierto, prospectivo, controlado y aleatorio. Para el ensayo se reclutaron 274 lactantes sanos, de los cuales 28 no continuaron en el estudio por decisión de los padres y/o tutores, cambio de domicilio, salida de la provincia, salida definitiva del país o por enfermedad.

El esquema de aplicación de la vacuna de Trivac HB[®] es a los 2, 4 y 6 meses, según la dosis recomendada: 0.5 mL, en la región anterior del muslo derecho, luego de la vacuna Heberbiovac HB[®], que se administra al nacer en igual sitio y volumen.

En el análisis final de reactogenicidad se incluyeron 246 lactantes de ambos sexos, que habían recibido las tres dosis de vacunación. Para los análisis de inmunogenicidad estaban los mismos lactantes que habían culminado el ensayo clínico, y a los cuales se les extrajo una muestra de sangre, un mes después de aplicada la última dosis. Todos los padres y los tutores dieron su consentimiento de manera voluntaria, por medio de un documento rubricado por los interesados (Modelo de consentimiento informado), para la participación de los lactantes en el ensayo clínico. Los pediatras de los equipos de investigación de cada provincia, obtuvieron información acerca del embarazo, el parto y los dos primeros meses de vida, mediante la entrevista a las madres de los lactantes. Además, se realizó un examen físico exhaustivo con el empleo de aparatos y sistemas, así como la valoración de cada lactante. Solo se aceptaron los lactantes eutróficos sanos.

Con el empleo del programa de computación Microsoft Excel, se diseñó una base de datos, que permitió reunir los resultados del estudio de forma duplicada (por dos investigadores). Luego se comparó la información almacenada en las dos bases de datos, para la depuración de errores y el procesamiento de los datos validados según el programa de computación Scomp v.200 de febrero de 2000. Las determinaciones de los títulos de anticuerpos para los cuatro antígenos se describen a continuación.

Determinación de los títulos de anticuerpos IgG contra el toxoide tetánico

La cuantificación de los títulos de antitoxina tetánica se realizó mediante un ensayo inmunoenzimático comercial de ELISA directo (NovaTec-Clostridium tetani IgG-ELISA Prod. No. TETG0430), Nova Tec Immunodiagnostica GmbH, Germany. Este ensayo está diseñado para la determinación cuantitativa de anticuerpos clase IgG (antitoxina tetánica) en el suero humano, y permitió la evaluación del estado inmunológico del paciente y la toma de decisiones sobre la necesidad de una inmunización básica o de refuerzo.

Determinación de los títulos de anticuerpos de IgG contra la toxina diftérica

La cuantificación de los títulos de antitoxina diftérica se realizó mediante un ensayo inmunoenzimático comercial de ELISA directo (NovaTec-Corynebacterium diphtheriae IgG-ELISA Prod. No. CORG0090), Nova Tec Immunodiagnostica GmbH, Germany, el cual está diseñado para la determinación cuantitativa de anticuerpos clase IgG (antitoxina tetánica) en el suero humano. Este ensayo permitió la evaluación del estado inmunológico del paciente y tomar decisiones sobre la necesidad de una inmunización básica o de refuerzo.

Determinación de los títulos de anticuerpos IgG a hemaglutinina filamentosa y toxina pertussis de *B. pertussis*

La determinación de los títulos de anticuerpos contra *B. pertussis* se realizó mediante un ensayo inmunoenzimático comercial ELISA (NovaTec-Bordetella pertussis IgG-ELISA Prod. No. BOPG0030), Nova Tec Immunodiagnostica GmbH, Germany, cuyo uso es la determinación cualitativa de los anticuerpos IgG en el suero humano.

Determinación de los títulos de anticuerpos IgG contra HB

El sistema de detección anti-HB (Hepanostika, EE.UU.) es un análisis enzimático (microELISA), basado en el principio del sándwich. Las tiras de poliestireno se recubrieron con AgsHB (fase sólida) y las muestras se incubaron en estos pocillos (si estaba presente IgG anti-HB, se unió al antígeno en fase sólida, a continuación se añadió el AgsHB marcado con la enzima peroxidasa del rábano picante [HRP]). En los casos en que hubo una reacción positiva, el antígeno marcado se unió al complejo anti-HB en fase sólida/antígeno que se formó anteriormente. La incubación con sustrato enzimático produjo un color azul en el pocillo de la prueba, que se volvió amarillo cuando se detuvo la reacción con ácido sulfúrico. En la muestra

17. PPO 1.27.136.96. Administración parenteral de la sustancia de ensayo a ratas.

que no contenía anti-HB, solo se observó una leve coloración.

Los niveles de protección para cada antígeno se determinaron de acuerdo con las recomendaciones establecidas por los productores de los sistemas de diagnóstico utilizados para la evaluación de las muestras.

Los niños vacunados contra la anatoxina tetánica, se consideran protegidos si alcanzan valores de antitoxina tetánica en el suero superiores a 0.11 UI/mL; los vacunados con la antitoxina diftérica, los niveles deben ser superiores a 0.1 UI/mL de suero, para los que vacunaron con *Bordetella pertussis*, no está establecida una correlación entre los títulos producidos por un proceso de vacunación y la seroprotección para esta enfermedad. Sin embargo, Nova Tec incluye una interpretación en su sistema según la cual la muestra se considera positiva si los valores de diferentes clases de IgG contra *Bordetella pertussis* y toxina de *Bordetella pertussis* es superior a 11 Unidades Novatec (UN).

Internacionalmente se conoce que los valores iguales o superiores a 10 UI/mL de anti-HB presentes en el suero de los niños vacunados son los que confieren protección contra la enfermedad.

Etapa de escalado

La producción se escaló con la tecnología descrita para la variante 3, con la formulación de tres lotes a escala de 20 litros y otros tres lotes a escala de 100 litros. Todos estos lotes se sometieron a los ensayos físicos, químicos y biológicos correspondientes, para evaluar su liberación.

Resultados y discusión

Etapa de preformulación

Los resultados de potencia para los cuatro antígenos en las tres variantes estudiadas, una vez formulados y a los 6 meses se muestran en la tabla 2.

Los resultados para las variantes 2 y 3 coinciden con las especificaciones establecidas para la potencia de los cuatro antígenos involucrados en la formulación, no así la variante 1 en que la potencia de HB en ambas ocasiones y tiempos de muestreo no se ajustó a la especificación para este ensayo. Esto puede deberse a que en la variante 1 el AgsHB se adiciona a la formulación sin que sea adsorbido. Posteriormente, se le añaden las células enteras de *Bordetella pertussis*, que es el elemento antigénico más agresivo, por tratarse de un antígeno no purificado, compuesto por células enteras, que presentan algunas sustancias como proteasas y aglutinógenos. Al ser añadidas las células de *Bordetella pertussis* en una primera fracción, estas pudieron provocar contactos con el AgsHB, y ocasionar interferencia química. Este contacto se repite al adicionar la segunda fracción de *B. pertussis*, transcurrida 16 horas, lo cual provoca un segundo efecto de interferencia sobre el AgsHB. Ello se observa en los resultados de la prueba de potencia para este antígeno.

En la variante 2, si bien el AgsHB tampoco se añade de forma protegida a la formulación y sus resultados cumplen con la especificación para este ensayo, la adición de *B. pertussis* se hace en una sola fracción, lo cual reduce el contacto que pudiera existir entre el AgsHB y las células de *B. pertussis*. Sin embargo, en

Tabla 2. Resultados de Potencia de los 4 antígenos en la formulación de la vacuna Trivac HB® para las 3 variantes tecnológicas de formulación. Tiempo 0 y 6 meses

Ensayos	Especificaciones	Variante 1		Variante 2		Variante 3	
		T=0	T=6 m	T=0	T=6 m	T=0	T=6 m
Difteria	≥ 2.0 U/mL	9.60	5.40	10.00	8.20	10.00	11.20
Tétanos	≥ 2.0 U/mL	30.0	42.00	41.00	28.00	30.00	38.00
<i>B. Pertussis</i>	≥ 4.0 U/dosis	13.70	8.60	14.50	12.30	13.60	15.00
AgsHB	≥ 0.5	0.14*	0.23*	0.80	1.20	2.74	2.53
		0.18*	0.19*				

* Ensayos realizados en dos ocasiones.

los resultados de la potencia de HB de la variante 3, se evidencia una mayor efectividad en la respuesta, debido a la protección que adquiere el AgsHB al ser adicionado a la formulación, ya que también ha habido una absorción previa e independiente. Cuando se añadieron las células de *B. pertussis*, en una sola fracción, se redujo este efecto. A partir de estos resultados se determinó que la combinación de proteger el AgsHB antes de ser añadido a la formulación y la adición de las células de *B. pertussis* en una sola fracción, disminuyeron considerablemente los posibles daños que esta pudiera ocasionar al AgsHB en la mezcla de ambos. Con la variante 3 no solo se cumple la especificación, sino que se obtuvieron los mejores resultados, pues los valores alcanzan 2 ó 3 veces los resultados de la variante 2.

En las tres variantes, los ensayos de las potencias de D, P y T cumplieron con las especificaciones establecidas.

Inmunogenicidad del componente HB

Los resultados del estudio de inmunogenicidad del componente HB se muestran en la figura 1.

Los títulos anti-HB obtenidos en cada grupo evaluado en sus tres variantes (figura 1), se corresponden con los resultados de las pruebas de potencia de HB. Incluso en las variantes 2 y 3, los valores son superiores a los del lote de referencia de la vacuna de HB. Este fenómeno de la potenciación de la respuesta contra HB puede estar fundamentado por la presencia de otros antígenos en la formulación; en el lote de referencia de la vacuna de HB solo está presente el AgsHB.

En la variante 1 no se obtuvo una respuesta anti-HB adecuada, lo que confirma que esta tecnología no es la indicada para el escalado y su inserción en el estudio de estabilidad.

Los resultados físico-químicos restantes no mostraron diferencias entre las tres variantes, y cumplían las especificaciones establecidas para cada caso.

A partir de los resultados en esta etapa de preformulación, se decidió insertar la variante 3 en el estudio de estabilidad, si bien todos los ensayos biológicos para los antígenos de D, P y T pasaron los ensayos y los mejores resultados obtenidos para el AgsHB fueron en esta variante.

Etapa de estabilidad

Los resultados de los ensayos físico-químicos en el estudio de estabilidad para los tres lotes almacenados a temperatura 5 ± 3 °C, durante 30 meses, coincidieron con las especificaciones establecidas para cada caso.

El pH, el contenido de aluminio, el tiomersal, el formaldehído y las identidades de los cuatro antígenos son elementos que influyen en las características organolépticas de la vacuna, ya que pudieran formarse grumos, turbiedad o cambio de coloración y afectar este parámetro imprescindible para la integridad y la calidad de la vacuna. La tecnología de adición utilizada, así como la agitación controlada durante el proceso de formulación, también influyen en las características organolépticas. Por tanto, el procedimiento seleccionado garantizó no solo esto, sino que la mezcla de los antígenos, el adyuvante, el preservante y los excipientes evidenció que el producto no mostró indicios de toxicidad durante 30 meses, y se identificó cada uno de los antígenos de la vacuna en el período evaluado.

Potencia de los antígenos

Durante el período de estudio de los lotes se pudo observar que todos los resultados de las potencias de los cuatro antígenos constituyentes de la vacuna Trivac HB[®], se mantuvieron dentro de los límites establecidos. Sin embargo, sí hubo una variación en el tiempo, debido a la utilización de sistemas biológicos, los cuales implican variabilidad en los resultados. Esta variabilidad se evidenció en la potencia de la anatoxina tetánica, cuyos resultados alcanzaron valores por encima de esta especificación. No ocurre así en la potencia de anatoxina diftérica, cuyos resultados, excepto casos específicos, expresaron valores muy similares, en los diferentes tiempos y lotes. La variabilidad en los resultados de los componentes de AgsHB y de *B. pertussis* fue menos evidente.

Es necesario destacar que la humedad relativa en las cámaras frías de almacenaje es superior al 90%. Ello fue un reto para la conservación de la vacuna Trivac HB[®], ya que este valor es mayor que la media anual de las regiones húmedas tropicales (70%), según reportó Cartwright [18].

La esterilidad de la vacuna, almacenada durante 30 meses, evidenció que el envase y cierre inmediato eran adecuados para la conservación del producto.

Hubo correspondencia entre los resultados de la identificación de los cuatro antígenos después de la desadsorción y la potencia de cada uno de ellos en la vacuna. Siempre se identificaron y la potencia cumplió las especificaciones para el ensayo. Los resultados durante 30 meses, demostraron una seguridad en tiempo de uso del producto para el estudio clínico.

Etapa de estudios preclínicos

El peso corporal de los animales inmunizados aumentó en el tiempo, sin diferencias significativas entre los sexos y los grupos evaluados.

En el control clínico diario, los animales no mostraron signos de toxicidad ni alteraciones en su comportamiento. No se evidenció mortalidad en los animales evaluados, ni en el grupo control ni en los animales tratados.

En el examen macroscópico de los órganos examinados se observó la presencia de calcificaciones del pericardio, indistintamente, en los grupos tratados y en el grupo control. Este aspecto es poco significativo, debido a que es frecuente encontrarlo en ratones de la línea balb/c, pues su causa es genética y

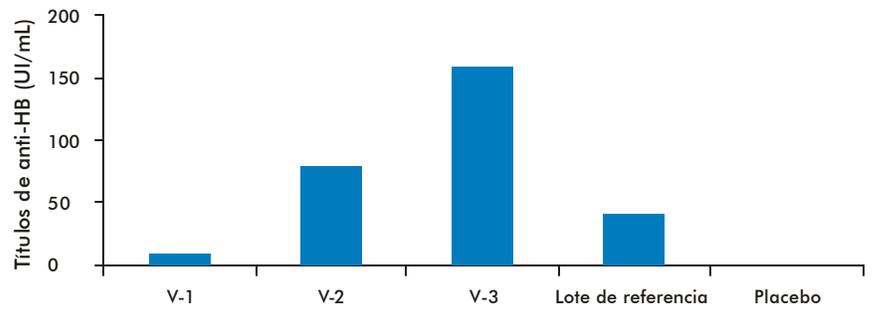


Figura. 1 Título de anticuerpos anti-HB. Las variantes 1, 2 y 3 se presentan como V-1, V-2 y V-3, respectivamente; además aparecen los títulos alcanzados en animales del lote de referencia de HB y el placebo. Los títulos anti-HB obtenidos en los animales se expresan en UI/mL de suero.

se modifica severamente según la edad, el sexo y la dieta (alto contenido de grasa). La balanopostitis con semen inspido fue despreciable, pues se reportó en pocos animales. Se ha descrito que esta aparece frecuentemente de forma espontánea por causas múltiples que no forman parte del objeto de estudio de esta investigación [19].

Etapa de estudios clínicos

Fase I

En la fase I de la etapa de estudios clínicos (reactogenicidad), se evaluaron las principales reacciones adversas evidenciadas en los niños luego de ser vacunados. Entre ellas, las fundamentales fueron:

1. Predominaron los eventos sistémicos (74.5%), como fiebre y febrícula en el 45 y el 23%, respectivamente, de los niños vacunados.

2. El 85.5% de las reacciones adversas se reportaron en las primeras 24 horas.

3. Solo 112 niños (41.9%) manifestaron reacciones adversas, fundamentalmente leves. No se reportó ninguna reacción adversa grave.

Los resultados de esta etapa demostraron que la vacuna Trivac HB es atóxica y bien tolerada por los niños.

Fase II

En la fase II de la etapa de estudios clínicos (immunogenicidad), se evaluaron dos aspectos fundamentales: porcentaje de seroprotección, es decir, cuántos niños vacunados alcanzaron los niveles necesarios para quedar protegidos contra cada antígeno, y se evaluaron, además, los títulos de la media geométrica (TMG), o sea, los títulos de anticuerpos alcanzados después de la vacunación. El porcentaje de seroprotección global fue 98.8% de los anticuerpos anti-HB, 97.9% de los anticuerpos antitoxina tetánica, 100% de los anticuerpos antitoxina diftérica y 93.1% de los anticuerpos antipertussis.

La media geométrica global de los títulos de anticuerpos anti-HB fue de 387.07 U/mL, de la antitoxina tetánica fue de 0.56 U/mL, de la antitoxina diftérica fue de 1.13 U/mL y 21.67 UN (Unidades Novatec) para los títulos de anticuerpos anti-pertussis.

Los resultados de la vacunación con Trivac HB[®] fueron satisfactorios: el porcentaje de seroprotección de los anticuerpos estuvo por encima del 97%, y una respuesta entre el 80 y el 90% para la *B. pertussis* se

18. Cartwright AC. Stability Test on Active Substances and Finished Products: New European Guideline. Drug Development and Industrial Pharmacy 1989;5(10): 1743-57.

19. Faccini JM, Abbott DP, Paulus GJ. Mouse histopathology. A glossary for use in toxicity and carcinogenicity studies. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1990.

considera muy buena. En el caso de los TMG estuvieron muy por encima de lo necesario para conferir protección. Los valores más bajos de los títulos fueron el de la anatoxina tetánica, que estuvieron 5 veces por encima de lo necesario para conferir protección.

Los resultados de esta etapa demostraron que la vacuna combinada Trivac HB[®] brinda una adecuada protección a los niños vacunados.

Etapas de escalado

Los resultados del estudio con los seis lotes, a escala de 20 y 100 litros, cumplieron las especificaciones establecidas para su control.

Los resultados del estudio de la potencia de *B. pertussis* en los lotes formulados a escala de 100 litros, fueron mejores que los obtenidos a escala de 20 litros. Ello demostró que el proceso de escalado no afectó la calidad de la vacuna.

Conclusiones

Luego del estudio de preformulación con tres variantes tecnológicas para la elaboración de la vacuna combinada DPT-HB, se seleccionó la va-

riante 3 como el candidato tecnológico para ser escalado e insertado en el estudio de estabilidad real. Este demostró que la vacuna es estable durante 24 meses, almacenada a una temperatura de 5 ± 3 °C. El envase primario utilizado es el adecuado para mantener la esterilidad y calidad del producto. Entre él y la vacuna no ocurren interacciones, tal como evidenciaron los resultados.

Los estudios preclínicos mostraron que la vacuna es atóxica. Con el estudio clínico se demostró que los cuatro antígenos que forman la vacuna brindan una protección elevada a los niños inmunizados. Esta es una vacuna segura y eficaz.

Uno de los objetivos más importantes de la etapa productiva de la vacuna tetravalente Trivac HB[®] es el escalado de la formulación, el cual resultó muy eficaz, según los resultados. Basados en ellos, el Centro para el Control de los Medicamentos otorgó la Licencia Sanitaria de Operación Farmacéutica y el Registro para la producción y comercialización de la vacuna.

Este logro permitió introducir la vacuna Trivac HB[®] en el Programa Nacional de Vacunación de Cuba.