

# Nueva metodología para la formulación de la vacuna Heberpenta-L

## New methodology for the formulation of the vaccine Heberpenta-L

Imeray Díaz\*, Maikel Villegas\*\*, Luis Carlos Hidalgo\*\*\*

### Resumen

La vacuna Heberpenta-L, está indicada para la inmunización activa contra la difteria, tétanos, tos ferina (pertussis), hepatitis B y *Haemophilus influenzae* tipo b. En el Centro Nacional de Biopreparados se diseñó una nueva planta de producción de productos parenterales, resultando la vacuna pentavalente uno de los productos recién introducidos. Con tal propósito se diseñó una nueva metodología para la formulación de la vacuna, adecuando los procedimientos normalizativos de operación vigentes a esta nueva instalación. La validación con medio de cultivo caldo triptona soya, resultó una de las etapas más importantes para garantizar, tanto las operaciones de esterilización y enfriamiento de las soluciones, como todos los pasos críticos en la formulación y operaciones asepticas para futuros productos. Se estableció una nueva metodología en el proceso de formulación para la preparación de las soluciones, la cual tuvo lugar en un área independiente al área de la formulación final del producto. Los resultados satisfactorios obtenidos en la formulación de tres lotes de consistencia de la vacuna Heberpenta-L, no solo garantizaron el cumplimiento de los requisitos de calidad establecidos para esta vacuna, sino que además constituyeron la base preliminar a largas campañas de otros productos.

**Palabras clave:** vacuna pentavalente, parenterales, producción.

### Abstract

The vaccine Heberpenta-L, is suitable for the active immunization against the diphtheria, tetanus, ferocious cough (pertussis), hepatitis B and *Haemophilus influenzae* type b. In the National Center of Bioproducts a new plant of production of products parenterals was designed, being the vaccine pentavalent one of the recently introduced products. With such a purpose a new methodology was designed for the formulation of the vaccine, adapting the procedures effective operation normalizative to this new installation. The validation with culture medium broth triptone soy was one of the most important stages to guarantee, so much the sterilization operations and cooling of the solutions, as all the critical steps in the formulation and aseptic operations for future products. A new methodology settled down in the formulation process for the preparation of the solutions, which took place in an independent locate to the locate of the final formulation of the product. The satisfactory results obtained in the formulation of three batch of consistency of the vaccine Heberpenta-L, they guaranteed the execution of the established requirements of quality for this vaccine and constituted the preliminary base to long campaigns of other products.

**Key words:** pentavalent vaccine, parenteral, production.

**Recibido:** agosto 26 de 2013

**Aprobado:** mayo 5 de 2014

### Introducción

El desarrollo de la biotecnología en Cuba ha evolucionado en los últimos años de manera vertiginosa; nuevos productos con grandes potenciales han ido culminando su etapa de desarrollo para llegar a ser productos comercializables con posibilidades de convertirse en productos líderes del mercado local. Dentro de este grupo se encuentran: la vacuna Heber-

biovac HB, Heberprot-P, Interferón alfa, vacuna bivalente HB-Hib, vacuna Quimi-Hib, Trivac-HB, la vacuna Heberpenta-Líquida, entre otros.

La Heberpenta-L es una vacuna pentavalente líquida que inmuniza contra la difteria, el tétanos, la tosferina, la hepatitis B y la bacteria *Haemophilus influenzae* tipo b, que provoca enfermedades como la meningitis, neumonías y la otitis en niños (Pérez, 2004). Es un lí-

\* Licenciada en Ciencias Farmacéuticas.

\*\* Licenciado en Biología.

\*\*\* Ingeniero Químico Centro Nacional de Biopreparados. Carretera a Beltrán Km 1 ½. Bejucal, Mayabeque. Cuba. imeray.diaz@biocen.cu, villegas@biocen.cu, lchidalgo@biocen.cu

quido grisáceo, libre de partículas que al estar en reposo se separa en dos fases: un sedimento blanco y un sobrenadante transparente que al agitarse se resuspende fácilmente. Es un inyectable para administración intramuscular que clasifica como parenteral de bajo volumen (BioCen, 2003).

La vacuna Heberpenta-L se produce actualmente en la Planta de Productos Parenterales 2 (PPP2) del Centro Nacional de Biopreparados (BioCen), centro que constituye la rama productiva de la mayoría de los productos desarrollados en Cuba. Debido al incremento en las exigencias de las normas de operación y control, declaradas por las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) de productos biofarmacéuticos y el aumento de la exportación de productos biotecnológicos cubanos; se diseñó una nueva Planta de Producción de Parenterales (PPP3), con mejores condiciones de diseño, instalación y tecnología, que la existente PPP2.

La formulación de la vacuna Heberpenta-L, es actualmente la más compleja y crítica que se ejecuta en el área de producción, debido a la cantidad de Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA) que la componen y a las diferentes etapas durante el proceso, que a su vez, son semejantes a las de futuros productos. Esto justificó el hecho de formular la vacuna pentavalente para validar el proceso de formulación y realizar los lotes de consistencia en la nueva planta; por tal motivo, el objetivo de este trabajo consistió en diseñar una nueva metodología para la formulación de la vacuna, que cumpliera con todos los requisitos establecidos en las BPF de productos estériles.

## Materiales y métodos

La formulación de la vacuna Heberpenta-L fue el primer proceso ejecutado en la nueva PPP3, por lo que se realizó la validación de la misma en el período del 2 al 7 de octubre del 2011, mediante una prueba de simulación del proceso con medio de cultivo caldo triptona soya (CTS). El CTS es un medio establecido para la ejecución de validaciones de procesos, pues su composición permite el crecimiento de una amplia gama de bacterias, incluyendo las más exigentes.

Se realizaron tres réplicas simulando la formulación de la vacuna pentavalente en bolsas plásticas de 100 L. Se simuló cada una de las etapas del proceso de formulación, separando un resto de medio de cultivo en cada botellón empleado; los cuales se incubaron 15 días a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , y al cabo de este tiempo, se tomaron 25 bulbos estériles, para realizar ensayo de promoción de crecimiento (BioCen, 2011).

La formulación de la vacuna pentavalente, es más compleja que la del resto de los productos formulados en BioCen debido al número y diversidad de antígenos presentes en la misma. El gráfico 1 muestra de manera general el método de formulación en forma de diagrama de bloques.

**Tabla 1.** Composición de la vacuna pentavalente

Componente
Proteína antigénica de superficie del VHB (Antig. HB)
Anatoxina diftérica (Antig. TD)
Anatoxina tetánica (Antig. TT)
Células enteras muertas de <i>Bordetella pertussis</i> (Antig. P)
<i>Haemophilus influenzae</i> tipo B (Antig. Hib)
Hidróxido de Aluminio ( $\text{AlOH}_3$ )
Fosfato de Aluminio ( $\text{AlPO}_4$ )
Cloruro de Sodio (NaCl)
Hidrogenofosfato de disodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
Dihidrogenofosfato de sodio dihidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
Tiomersal
Agua para inyección

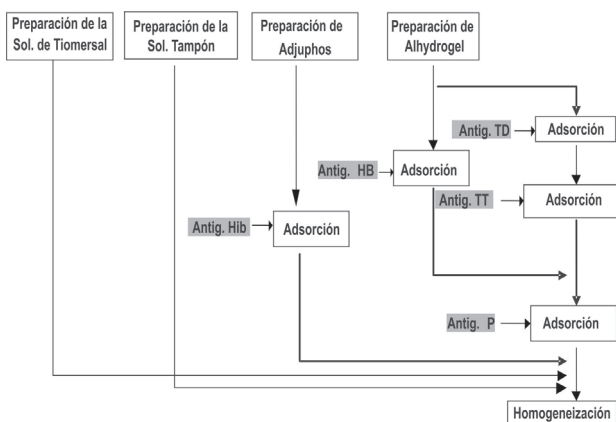
La nueva metodología para la formulación de la vacuna Heberpenta-L en la PPP3, consistió en que las soluciones preparadas y esterilizadas (solución gel de hidróxido de aluminio, solución fosfato de aluminio, solución tampón de fosfatos) en un área grado C, fueron transferidas por un pase a pared (lazo con conexión estéril) hacia el área de formulación, terminando bajo el flujo laminar (área grado A) (BioCen, 2012; BioCen 2013).

La existencia de un área para preparar soluciones y otra para formular la vacuna, brindó una mayor seguridad al producto, debido a que los reactivos que conforman las soluciones no están en contacto con los componentes estériles de la formulación. De esta manera se elimina el riesgo de contaminación cruzada, garantizando mejoras al procesamiento aséptico y una mayor garantía y facilidad durante las diferentes operaciones asépticas del proceso de formulación.

**Tabla 2.** Resumen de los lotes formulados

Producto	Lote	Fecha	Rendimiento (%)
Heberpenta-L	1	14/12/2011	95-99
Heberpenta-L	2	16/12/2011	95-99
Heberpenta-L	3	21/12/2011	95-99

Cada solución se preparó independientemente en un reactor (tanque de acero inoxidable de 150L de capacidad) y se transfirió a botellón o bolsa, bajo flujo laminar en el área de formulación, donde se llevaron a cabo las adiciones y adsorciones de los Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA): Antig. TD, Antig. TT, Antig. HB, Antig. P, Antig. Hib. Se mantuvieron las condiciones de agitación de la bolsa (bolsa agitada de 100L) para homogeneizar todos los componentes (BioCen, 2012; BioCen, 2013).



**Gráfico 1.** Esquema general de formulación de la vacuna pentavalente

## Resultados y discusión

Se verificó la esterilidad del formulado y de los botellones utilizados en la simulación de la formulación, en la tabla 3 se aprecia que en las muestras no se observó crecimiento microbiano. Los resultados demuestran que las operaciones críticas del proceso de formulación tales como, simulaciones de las transferencias, adsorciones y adiciones de los IFA; arrojaron resultados satisfactorios conllevando al cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Estériles (BPF).

Los resultados obtenidos en las muestras tomadas después de los 15 días de incubación y que se exponen en la tabla 4, demuestran que el medio de cultivo utilizado en las pruebas promueve el crecimiento de los controles microbiológicos utilizados, *Bacillus subtilus* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus niger* ATCC 19404, lo cual confirmó que el medio de cultivo empleado en todas las operaciones de formulación presentó la funcionalidad biológica para el desarrollo microbiano.

A continuación, se muestran los resultados de los lotes obtenidos en los ensayos realizados por los laboratorios de Control de la Calidad.

Los resultados referentes a la esterilidad de la vacuna respondieron a los requisitos establecidos en las especificaciones para la misma, al no detectarse presencia de microorganismo durante la realización del ensayo, criterio esencial para los productos parenterales.

Las características organolépticas de la vacuna cumplieron con lo establecido en las especificaciones. Visualmente se detectaron las características y la coloración típica de la vacuna, durante la adición de los componentes. Los resultados demuestran que las etapas de formulación fueron ejecutadas correctamente.

Los valores alcanzados en la concentración de tiomersal, ión aluminio y pH se encontraron en los rangos establecidos para el producto. En el caso del tiomer-

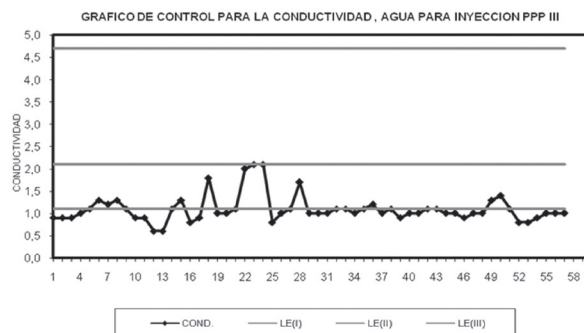
sal (preservante de la formulación) la concentración reportada en los resultados, al encontrarse dentro del rango de aceptación, influye favorablemente en la calidad del producto, previniendo el crecimiento microbiano en la vacuna durante su almacenamiento y uso, así como en la esterilidad durante el llenado en las líneas de producción. Los resultados reflejados para la concentración de ion aluminio garantizaron que las soluciones preparadas de hidróxido y fosfato de aluminio permitieran la completa adsorción de los IFA, obteniéndose valores de potencia y toxicidad dentro de los rangos de aceptación. La preparación exacta de la solución tampón de fosfatos permitió la obtención de una vacuna con valores de pH dentro de los límites de especificación, favoreciendo a su vez la actividad biológica de los IFA empleados.

Los resultados analíticos obtenidos en la validación y formulación de los tres lotes de consistencia, demostraron que la nueva metodología fue válida y correcta para formular la vacuna Heberpenta-L. Además, permitieron la introducción de lotes de varios productos en la nueva planta.

Se analizaron los resultados de los suministros de apoyo crítico a la producción, utilizados en los procesos de formulación durante el período en que se fabricaron los lotes de consistencia de Heberpenta-L. A través de estas figuras se puede apreciar que el agua para inyección (API) utilizada, se encontraba conforme para iniciar la preparación de las soluciones y con ello la formulación.

En la figura 1, se muestran los valores de conductividad de los puntos muestreados en el período en que se formularon los lotes 1, 2 y 3, los cuales cumplían con el intervalo reportado en las especificaciones (1,1- 4,7  $\mu\text{s}/\text{cm}$ ) (USP 35-NF-30, 2012). Los resultados tuvieron un impacto significativo en la pureza química del agua y en su aptitud para usarla en el proceso de formulación.

El carbono orgánico total es una medida indirecta de las moléculas orgánicas presentes en las aguas para uso farmacéutico, determinadas como carbono. Los valores de carbono orgánico resultaron conformes, demostrando la calidad del API empleada en el proceso. (figura 2)



**Figura 1:** Resultados de conductividad del API

**Tabla 3.** Verificación de la esterilidad en las muestras tomadas a partir del formulado y botellones incubados.

Lote	Código de la muestra	Verificación de la esterilidad
MCF (02/10/11)	MCF (02/10/11)- Antig. TD	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. TT	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. P	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. HB	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. Hib	Conforme
	MCF (02/10/11)- Sol. Tiomersal	Conforme
	MCF (02/10/11)- Alydrogel	Conforme
	MCF (02/10/11)- Adjuphos	Conforme
	MCF (02/10/11)- Sol. Tampón	Conforme
MCF (03/10/11)	MCF (02/10/11)- Antig. TD	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. TT	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. P	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. HB	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. Hib	Conforme
	MCF (02/10/11)- Sol. Tiomersal	Conforme
	MCF (02/10/11)- Alydrogel	Conforme
	MCF (02/10/11)- Adjuphos	Conforme
	MCF (02/10/11)- Sol. Tampón	Conforme
MCF (06/10/11)	MCF (02/10/11)- Antig. TD	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. TT	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. P	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. HB	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. Hib	Conforme
	MCF (02/10/11)- Sol. Tiomersal	Conforme
	MCF (02/10/11)- Alydrogel	Conforme
	MCF (02/10/11)- Adjuphos	Conforme
	MCF (02/10/11)- Sol. Tampón	Conforme

**Tabla 4.** Resultados de la prueba de promoción de crecimiento en los lotes formulados.

Lote	Muestra	Resultados
MCF (02/10/11)	25 bulbos estériles	Conforme
MCF (03/10/11)	25 bulbos estériles	Conforme
MCF (06/10/11)	25 bulbos estériles	Conforme

Los valores de la cuantificación de endotoxinas bacterianas gramnegativas en el API, usando un lisado de amebocitos del cangrejo herradura (*Limulus spp.*), concluyeron conforme de acuerdo a la figura 3, al encontrarse inferior al valor permisible para la prueba (0,25 UE/mL). Del mismo modo respondieron a las especificaciones de la vacuna, los datos relacionados con los conteos totales de aerobios mesófilos (figura 4), con un crecimiento microbiano que no sobrepasó las 0,1 UFC/

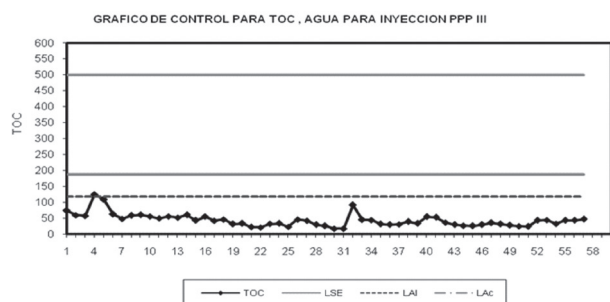
mL; ambas pruebas evidenciaron la calidad microbiológica del API utilizada (USP 35-NF-30, 2012).

### Conclusiones

Los resultados satisfactorios obtenidos en la validación de las etapas del proceso de formulación de la vacuna Heberpenta-L, posibilitaron la producción de tres lotes de consistencia.

**Tabla 5.** Resumen de los resultados analíticos obtenidos de lotes formulados

Ensayos	Resultados			Límite de aceptación
	1	2	3	
Esterilidad	Responde	Responde	Responde	Pasa la prueba
Características organolépticas	Responde	Responde	Responde	Responde
Contenido de tiorosal	Responde	Responde	Responde	Conforme
Contenido de Ion Aluminio	Responde	Responde	Responde	Conforme
pH	Responde	Responde	Responde	Conforme
Hib adsorbido (PRP)	Responde	Responde	Responde	Conforme
Potencia de anatoxina diftérica	Responde	Responde	Responde	Conforme
Potencia de anatoxina tetánica	Responde	Responde	Responde	Conforme
Potencia de Bordetella pertussis	Responde	Responde	Responde	Conforme
Toxicidad específica de la anatoxina diftérica y tetánica	Responde	Responde	Responde	Conforme
Toxicidad de Bordetella pertussis	Responde	Responde	Responde	Conforme



**Figura 2:** Resultados de TOC del API

Los resultados de los lotes 1, 2 y 3 formulados según la nueva metodología, se encontraron en los límites establecidos para el control de la calidad del producto, lo cual resultó propicio para la obtención de la licencia de fabricación de esta vacuna en PPP3.

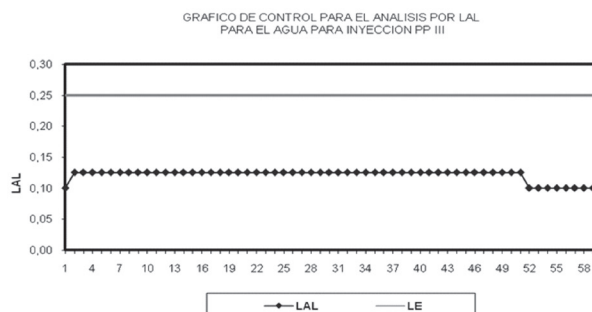
Los resultados obtenidos en la validación, así como, en la nueva metodología aplicada para la preparación de las soluciones y la formulación de la vacuna, conllevaron al desarrollo de la formulación de otros productos en la nueva planta.

### Referencias Bibliográficas

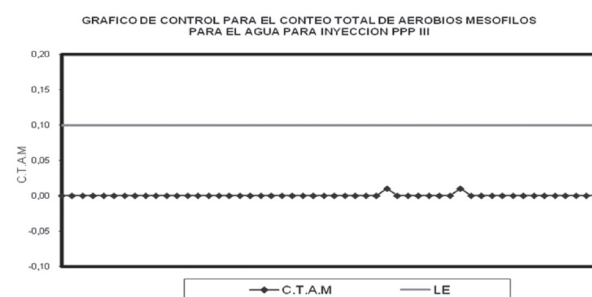
BioCen. 2003. Expediente Maestro: DTP-HB+Hib-TT. Cód. EM.126. Edición 01. 3-7

BioCen. 2013. Formulación de la vacuna Heberpenta-L en bolsas plásticas con sistema de agitación en la Planta de Productos Parenterales 3. PNO 05B.027. Edición 01. 3-8.

BioCen. 2012. Preparación de las soluciones de la vacuna Heberpenta-L en la Planta de Productos Parenterales 3. PNO 05B.028. Edición 02. 3-9



**Figura 3:** Resultados de LAL del API



**Figura 4:** Resultados de CETAM del API

BioCen. 2011. Protocolo para la validación de los procesos asepticos de formulación, llenado y liofilización en PPP 3. PRO 12.11.002.4. Edición 01. 4-8.

Pérez Joel. 2004. Incremento de la capacidad de producción del sistema de formulación Steridose. Tesis de Maestría. Facultad de Ingeniería Química. ISPJAE. 26-48.

USP 35-NF-30. 2012. Twenty Seventh Revisión. United Pharmacopoeial Convention, Inc. Rockville: Staff Liaison. 54-252.