

Título: Nueva vacuna pentavalente cubana, Heberpenta-L.

Autores principales: Eduardo Martínez Díaz (eduardo.martinez@cigb.edu.cu), Néstor S. Expósito Raya, Verena Lucia Muzio González, Mabel Izquierdo López, Luis Herrera Martínez

Total de autores: 50 y total de colaboradores: 96

Centro de procedencia: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
Otras instituciones participantes: Biocen, I. Finlay, LAGS-UH (CQB), IPK y MINSAP.

Palabras claves:

Vacunas combinadas, Enfermedades infecciosas, Difteria, Tétanos, Tos ferina, hepatitis B, *Haemophilus influenzae* tipo b.

PREMIO en la Instancia Nacional del Concurso

Introducción:

Las vacunas combinadas tienen varias ventajas sobre las monovalentes que las hacen atractivas para su aplicación en los programas masivos de inmunización, que van desde la disminución del número de inyecciones hasta la reducción de los costos generales de los programas de vacunación (Urbitzondo, 2001). Debido a estas ventajas la mayoría de los países prefieren el uso de estas vacunas combinadas y muchos han aprobado su introducción. La vacuna combinada pentavalente DPT-HB-Hib es considerada en la actualidad como una de las vacunas de mayor importancia e impacto en los programas masivos de inmunización en todo el mundo.

En Cuba logramos registrar una vacuna pentavalente basada en los antígenos de Difteria (D), Tétanos (T), células enteras de *B. Pertussis* (P), Hepatitis B (HB) y *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) en el año 2006, la cual constituyó la segunda vacuna de ese tipo registrada a nivel mundial. Esta primera variante de vacuna pentavalente consiste en la mezcla antes de la aplicación de la vacuna tetravalente DPT-HB con la vacuna Hib, similar a la única vacuna de ese tipo que existía hasta ese momento en el mundo, de la compañía GSK. Aunque este tipo de vacuna pentavalente donde los componentes deben mezclarse antes del uso fue un paso de avance, una variante superior lo constituye una vacuna pentavalente donde los componentes D, P, T, HB y Hib se encuentren formulados en un mismo vial. Este tipo de formulación ha presentado problemas para su introducción a nivel mundial debido ha dificultades técnicas relacionadas con problemas de interferencia inmunológica e incompatibilidad química entre los antígenos (Nolan, 2001).

Objetivos:

- Diseño y desarrollo de una formulación que combina los antígenos D, P, T, HB y Hib para dar lugar a una nueva vacuna pentavalente.
- Demostrar la seguridad y eficacia de la vacuna en estudios pre-clínicos y clínicos.
- Lograr el escalado de la vacuna e introducción en el sistema productivo.

- Lograr el registro sanitario y la introducción de la nueva vacuna pentavalente en el cuadro básico de medicamentos de Cuba.

Diseño Metodológico:

1. Desarrollo Farmacéutico

Para el desarrollo de la formulación se emplearon diferentes sales de aluminio como adyuvantes (Gel de hidróxido y Fosfato de Aluminio). Se estudiaron varios parámetros en el proceso de formulación como son el pH, tiempo y velocidad de agitación, orden de adición de los antígenos y porcentaje de adsorción. Se seleccionaron las variables óptimas para lograr la compatibilidad de los antígenos en la nueva formulación.

2. Estudios pre-clínicos

Para evaluar la seguridad de la nueva formulación se realizaron estudios de toxicidad aguda, tolerancia local y dosis repetida en ratas Sprague-Dawley.

La respuesta inmunológica se evaluó en varios modelos animales. La potencia de HB se midió en ratones Balb/C. La potencia de los antígenos D, T y P se analizaron en ratones OF-1. La inmunogenicidad de Hib se evaluó en conejos New Zeland.

3. Estudios clínicos

La evaluación de la seguridad y eficacia de la vacuna en niños lactantes se realizó mediante un estudio abierto de no inferioridad comparado con la variante de vacuna penta 4+1. Se evaluaron dos esquemas de inmunización, el primero a los 2, 4 y 6 meses de edad y el segundo a las 6, 10 y 14 semanas.

4. Escalado e introducción en el sistema productivo

Se realizó el escalado de la producción de la vacuna hasta 50 litros en bolsas Hyclone en el Centro Nacional de Biopreparados. Se produjeron 5 lotes consecutivos para demostrar la consistencia del proceso de formulación de la vacuna.

Resultados y Discusión:

El desarrollo de la nueva formulación de vacuna pentavalente DPT-HB-Hib líquida en un solo vial tuvo en cuenta la existencia de una patente de formulación donde se protege la adsorción del antígeno de HB en fosfato de aluminio (Petre, 1998) y la existencia de reportes sobre la despolimerización del antígeno Hib en presencia de hidróxido de aluminio (Sturgess y col., 1999). Por una parte la patente nos bloqueaba la posibilidad de usar el gel de fosfato de aluminio para la adyuvación del antígeno de HB en la formulación y por otra parte los reportes de degradación de Hib en presencia de hidróxido de aluminio podría traernos problemas con la estabilidad de este antígeno si este fuera seleccionado como adyuvante. A partir de esta problemática se diseñó una formulación novedosa que utiliza el gel de hidróxido de aluminio para la adsorción de los antígenos D, T, P y HB y el gel de fosfato de aluminio para la adsorción del antígeno Hib. La formulación final presenta una mezcla de ambos adyuvantes.

Después de estudiar el comportamiento de los diferentes parámetros de adsorción de cada uno de los antígenos se procedió a realizar un estudio de inmunogenicidad y potencia de cada uno de ellos en la nueva formulación propuesta. Como se puede observar en la figura 1, los valores de potencia de los antígenos D, T, P y HB siempre se encuentran por encima de las especificaciones establecidas para cada caso en 4 lotes diferentes de vacuna.

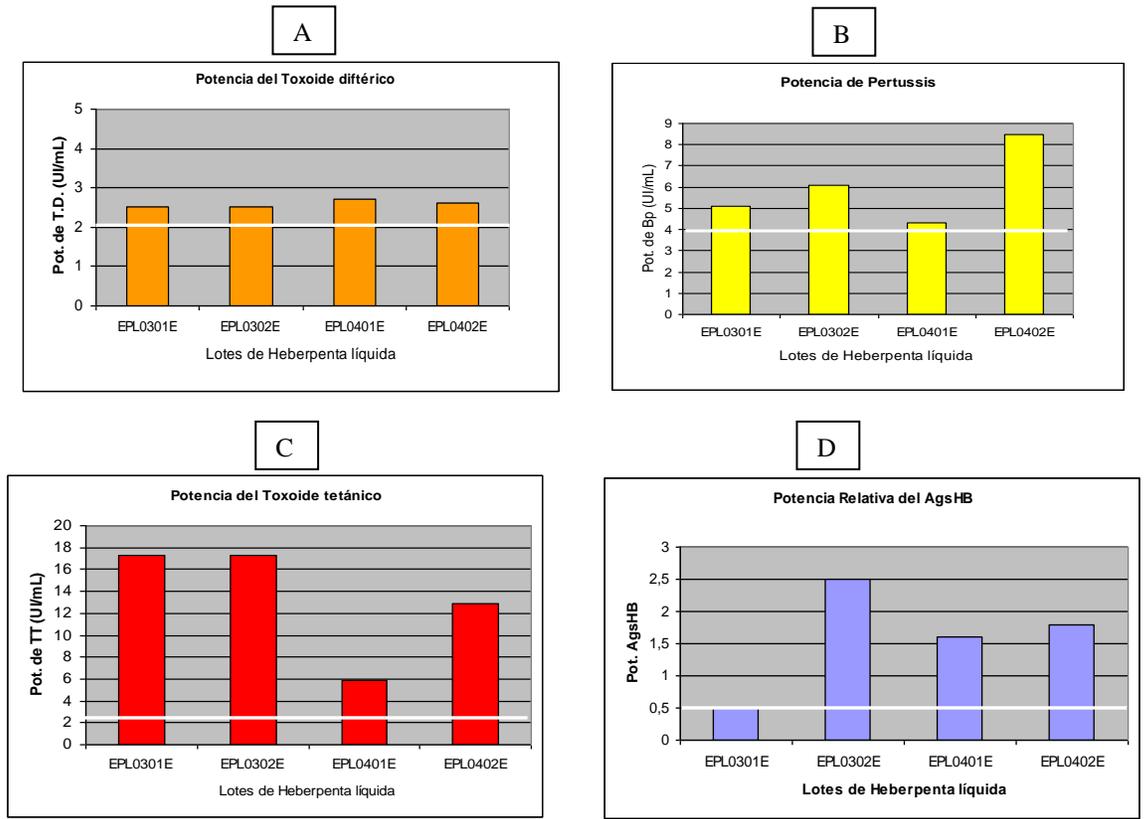
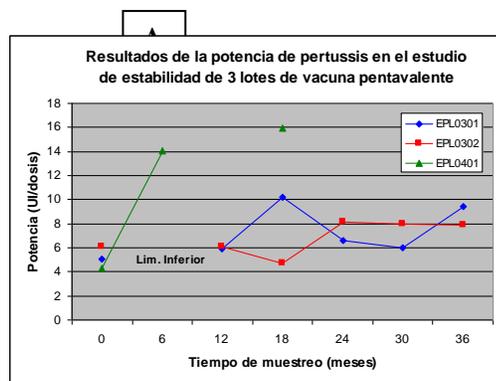
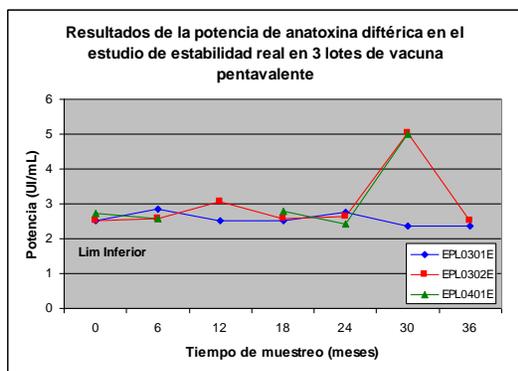
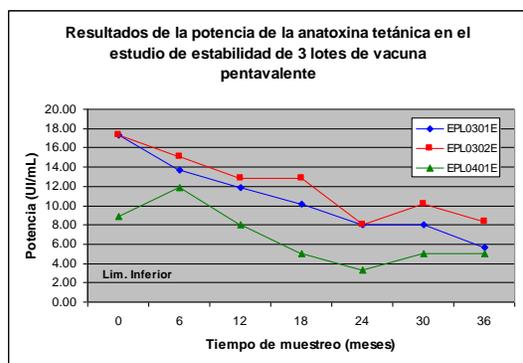


Figura 1. Potencia de los antígenos de anatoxina diftérica (A), B. Pertussis (B), anatoxina tetánica (C) y Hepatitis B (D) en los 4 lotes de vacuna pentavalente líquida. La línea blanca indica el límite de aceptación de potencia para cada antígeno.

Cuando se analiza el comportamiento de los valores de potencia de esos 4 antígenos en el tiempo, hasta 30 o 36 meses, encontramos que también se mantienen establemente por encima de los niveles establecidos como especificación (figura 2). Estos resultados evidencian que la respuesta inmunológica que generan los antígenos D, P, T y HB, dentro de la nueva formulación de la vacuna pentavalente, mantienen el mismo comportamiento que el observado en la vacuna tetravalente Trivac-HB. Además estos resultados demuestran que la incorporación de un nuevo antígeno, en este caso Hib, no interfiere en la respuesta inmune de los antígenos D, T, P y HB.



C



D

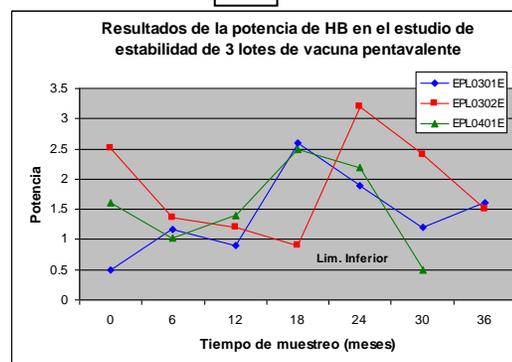


Figura 2. Comportamiento en el tiempo de las potencias de los antígenos anatoxina diftérica (A), B. Pertussis (B), anatoxina tetánica (C) y Hepatitis B (D) de 2 lotes de vacuna pentavalente líquida.

Como se mencionó inicialmente, la respuesta encontrada para el caso de los componentes D, T, P y HB de la vacuna eran de esperar teniendo en cuenta los resultados previos obtenidos con la vacuna tetravalente DPT-HB. Sin embargo, el comportamiento del antígeno Hib debíamos estudiarlo a profundidad ya que no teníamos antecedentes de su comportamiento cuando se combinaba en una misma formulación con los antígenos D, P y T que no tienen un alto grado de purificación como si lo tiene el antígenos de HB.

La vacuna Quimi-Hib® basada en el antígeno Hib obtenido por vía sintética ha demostrado su efectividad en la clínica donde se ha observado una respuesta inmunológica adecuada para la protección en humano. Esta vacuna no utiliza adyuvantes y se presenta en forma líquida donde es estable hasta 36 meses. En los estudio, donde se combina esta vacuna con la tetravalente Trivac-HB® momentos antes del uso para formar una vacuna pentavalente variante 4+1, también se encontraron resultados satisfactorios en cuanto a la inmunogenicidad en la clínica.

Como ya se mencionó, la nueva vacuna pentavalente DPT-HB-Hib líquida en un solo vial se diseño de forma tal que los antígenos D, T, P y HB se encuentran adsorbidos en gel de hidróxido de aluminio como adyuvante, de la misma forma que en Trivac-HB®. En el caso de Hib no era conveniente adsorberlo al hidróxido de

aluminio debido a que existen reportes en la literatura sobre la degradación del polisacárido adsorbido a este adyuvante. Teniendo en cuenta estos elementos, inicialmente se estudio la adsorción de este antígeno al gel de fosfato de aluminio. Se realizó un experimento donde se adsorbieron diferentes cantidades del antígeno Hib al fosfato de aluminio y se estudio la respuesta inmunológica del mismo comparado con el antígeno sin adsorber. Los resultados de este estudio se presentan en la figura 3. Como se puede observar la respuesta inmune del antígeno Hib se incrementa significativamente cuando este es adyuvado a fosfato de aluminio que cuando no lo es. Además existe una relación entre la magnitud de la respuesta y la cantidad de antígeno adsorbido.

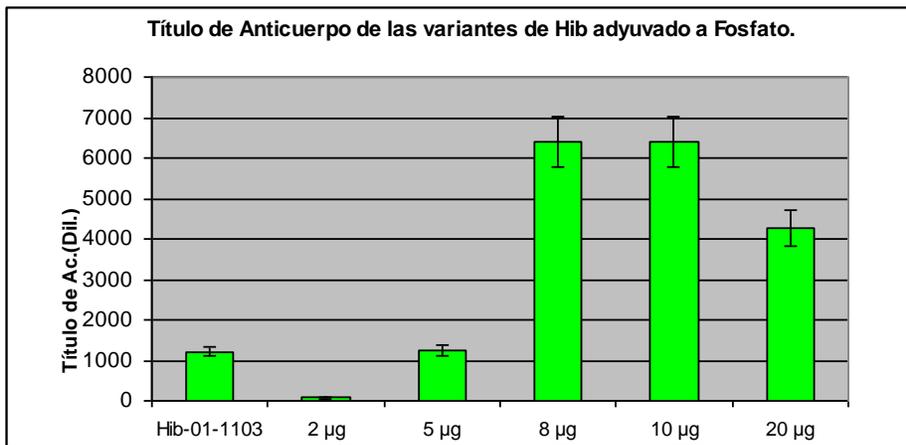


Figura 3. *Títulos de anticuerpos anti-Hib expresados como el inverso de la dilución. Hib-01-1103: Lote de vacuna de referencia sin adsorber (10 µg). Las vacunas con el antígeno Hib adyuvado en fosfato de aluminio a diferentes concentraciones se representan con la cantidad de antígeno que fue adsorbido (2, 5, 8, 10 y 20 µg respectivamente).*

Posteriormente se analizó el comportamiento de la respuesta inmune del antígeno Hib adsorbido a fosfato de aluminio junto con el antígeno de HB con el objetivo de estudiar la posible interferencia de este último en la respuesta de Hib. Como se puede observar en la figura 4, la respuesta inmunológica del antígeno Hib siguió siendo varias veces superior que la del antígeno sin adsorber. Estos resultados indican que el antígeno de HB no interfiere en los niveles de respuesta inmunológica inducida por Hib.

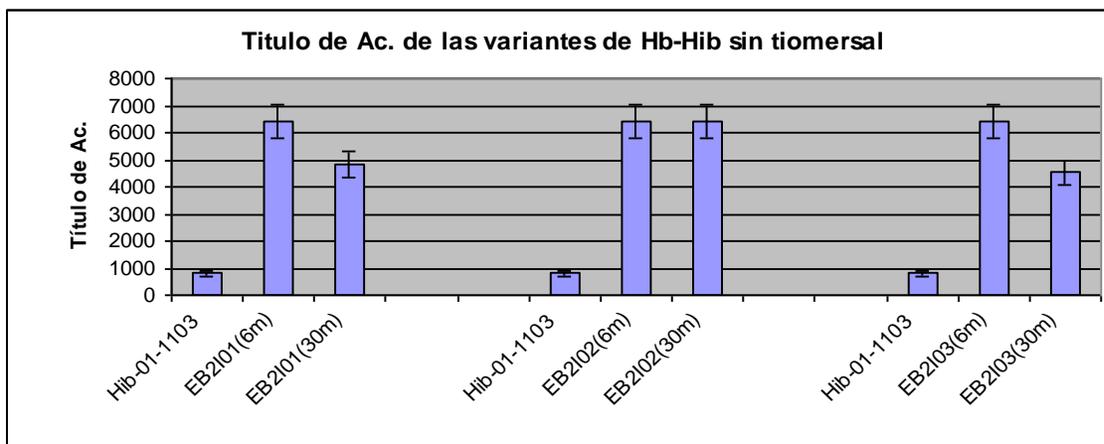


Figura 4. *Títulos de anticuerpos anti-Hib expresados como el inverso de la dilución, de tres lotes de vacuna bivalente HB-Hib donde ambos antígenos se encuentran adsorbidos a fosfato de aluminio. Hib-01-1103: Lote de vacuna de referencia sin adsorber (10 µg). Los lotes de vacunas bivalentes se identifican como EB2I01, EB2I02 y EB2I03 y en todos los casos aparecen los títulos de anticuerpos a los 6 y 30 meses de estabilidad.*

Realizamos otro estudio con una vacuna bivalente donde el antígeno de HB estaba adsorbido a hidróxido de aluminio y Hib a fosfato de aluminio. De esta forma podíamos evaluar la influencia del hidróxido de aluminio sobre el antígeno Hib previamente adsorbido a fosfato de aluminio. Los resultados de este estudio (figura 5) demuestran que la respuesta inmune contra Hib no se afecta por la presencia de otro antígeno adsorbido al gel de hidróxido de aluminio en el contexto de la misma formulación.

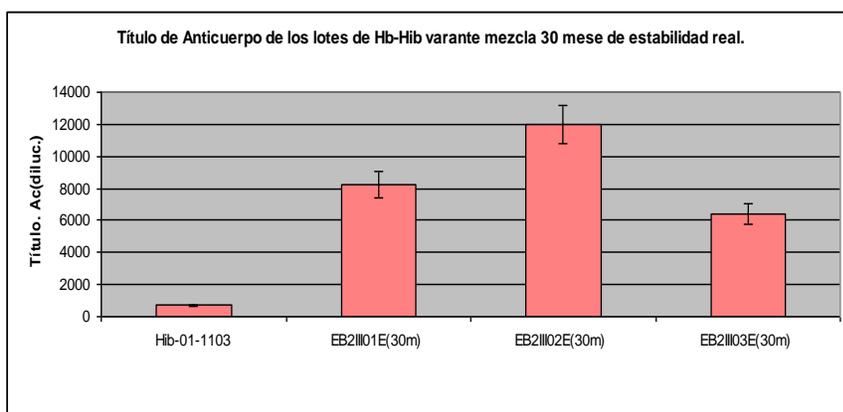


Figura 5. *Títulos de anticuerpos anti-Hib expresados como el inverso de la dilución, de tres lotes de vacuna bivalente HB-Hib donde el antígeno HB se encuentra adsorbido a hidróxido de aluminio y Hib a fosfato de aluminio. Hib-01-1103: Lote de vacuna de referencia sin adsorber (10 µg). Los lotes de vacunas bivalentes se identifican como EB2III01E, EB2III02E y EB2III03E.*

Los resultados presentados anteriormente son evidencias importantes a favor de la hipótesis que el antígeno Hib adsorbido a fosfato de aluminio y formulado junto a otros antígenos adsorbidos a hidróxido de aluminio podría mantener altos niveles de respuesta inmune y mantener esa respuesta después de 2 años de producida la vacuna.

Para completar más evidencias a favor de la hipótesis anterior se estudió la respuesta inmunológica del componente Hib en 2 lotes de vacunas pentavalente DPT-HB-Hib almacenados a 37 °C hasta 45 días. En la figura 6 se presentan los resultados de ese estudio. Como se puede observar, en esas condiciones extremas de temperaturas el antígeno Hib induce una respuesta inmunológica

significativamente superior a la vacuna Hib sin adyugar. Estos resultados son evidencias importantes de la estabilidad del antígeno Hib en la vacuna pentavalente. Sin embargo, la estabilidad final debe ser evaluada a tiempo real. En la figura 7 se presentan los resultados del comportamiento de los títulos de anticuerpos de dos lotes de vacuna pentavalente almacenados entre 2°C a 8°C. Como se puede observar, hasta los 24 meses la respuesta inmunológica que induce el componente Hib en la vacuna pentavalente es significativamente superior a la vacuna Quimi-Hib utilizada como control. Incluso, aunque existe una caída de los títulos entre los 24 y 36 meses, estos siguen siendo superior a la vacuna control.

Teniendo en cuenta que la vacuna Hib sin adyugar (Quimi-Hib), usada como control, ha sido evaluada en la clínica con resultados satisfactorios, donde la respuesta inmunológica inducida se encuentra dentro de los niveles requeridos para brindar protección, y que los resultados encontrados en este estudio indican que el antígeno Hib adyuvado induce una respuesta superior al no adyuvado, existe una alta probabilidad de encontrar una respuesta inmune adecuada de este antígeno en la vacuna pentavalente líquida. Sin embargo, esto debe ser demostrado en la clínica.

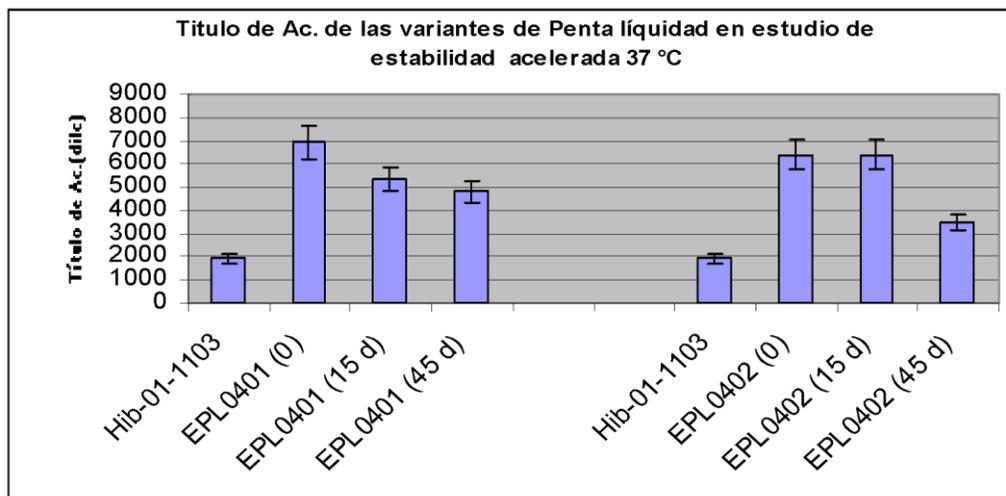


Figura 6. Títulos de anticuerpos anti-Hib expresados como el inverso de la dilución, de dos lotes de vacuna pentavalente DPT-HB-Hib almacenada a 37 °C hasta 45 días. Hib-01-1103: Lote de vacuna de referencia sin adsorber (10 µg). Los lotes de vacuna pentavalente se representan como EPL0401 y EPL0402.

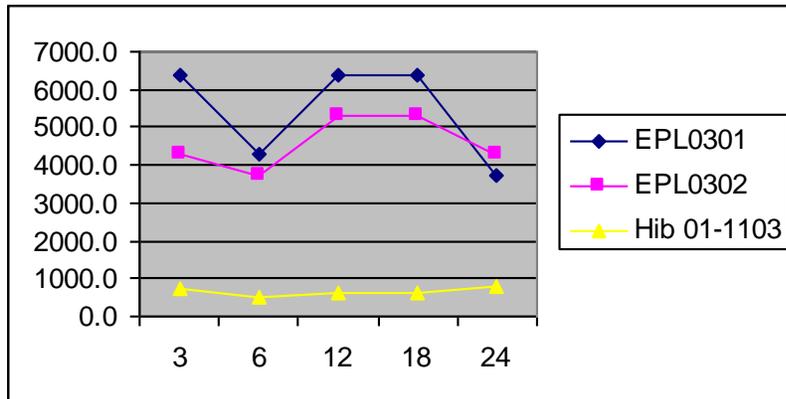


Figura 7. Títulos de anticuerpos anti-Hib expresados como el inverso de la dilución, de dos lotes de vacuna pentavalente DPT-HB-Hib almacenada de 2 a 8 °C por 36 meses. Hib-01-1103: Lote de vacuna de referencia sin adsorber (10 µg). Los lotes de vacuna pentavalente se representan como EPL0301 y EPL0302.

En su conjunto, los resultados mostrados hasta aquí sobre el comportamiento de la respuesta inmune inducida por los antígenos D, P, T, HB y Hib en la vacuna pentavalente DPT-HB-Hib indican que no existe interferencia inmunológica entre los antígenos y que cada uno de ellos tienen un comportamiento similar a la respuesta alcanzadas en las vacunas monovalentes o las combinaciones intermedias, como bivalente, trivalente y tetravalente.

En paralelo se realizaron estudios toxicológicos para demostrar que la nueva formulación presentaba un perfil de seguridad similar al que se obtiene para los antígenos por separado y que la variante de vacuna pentavalente anterior. Los estudios de toxicidad aguda, tolerancia local y toxicidad en dosis repetidas demostraron la completa seguridad de esta nueva vacuna.

Con todos los resultados de estudios preclínicos y evidencias de estabilidad la autoridad nacional de control (CECMED) autorizó la realización de pruebas clínicas de la vacuna en niños lactantes. Como se puede observar en la figura 8 la vacuna logró inducir un nivel de seroprotección para cada antígeno en el rango de lo reportado internacionalmente y similar a la vacuna pentavalente 4+1.

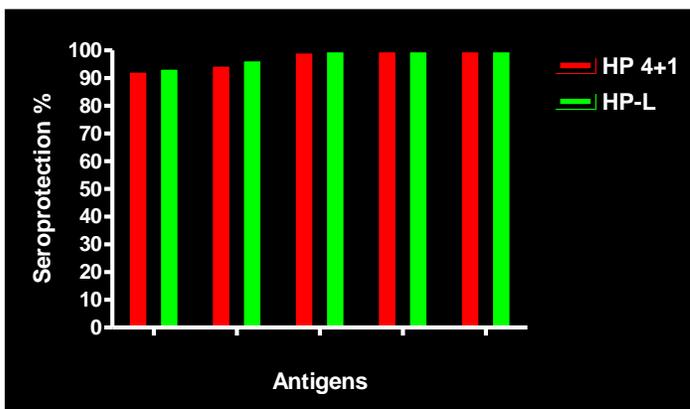


Figura 8. Niveles de seroprotección de la vacuna Heberpenta-L comparada con la vacuna pentavalente variante 4+1.

Con los resultados obtenidos en el desarrollo de esta vacuna se confeccionó el expediente y se presentó la solicitud de registro sanitario al CECMED. El registro sanitario y la licencia de producción se obtuvieron en el mes de mayo del 2010.

La formulación desarrollada también ha permitido la firma de contratos con Venezuela, Vietnam y Ecuador para el desarrollo de una vacuna pentavalente donde la parte cubana aporta la tecnología de formulación y los antígenos de HB y Hib.

Conclusiones:

En este trabajo se logró obtener una nueva formulación de vacuna pentavalente que demostró ser segura y efectiva para su aplicación en niños lactantes en los programas masivos de inmunización. Estos resultados permitieron obtener el registro sanitario de una variante de vacuna pentavalente.

La nueva formulación de vacuna pentavalente tiene ventajas significativas con respecto a la variante anterior ya que requiere menos manipulación para su aplicación, reduce las necesidades de capacidades de llenado durante la producción y las necesidades de cadena de frío y transportación lo cual la hace muy atractiva para su comercialización. Se pronostican ventas por valores superiores a los 50 millones de dólares anuales.

Referencias Bibliográficas:

- Nolan T., Hogg G., Darcy M., Skeljo M., Carlin J., Boslego J. Acombined liquid Hib (PRP-OMPC), hepatitis B, diphtheria, tetanus, and whole-cell pertussis vaccine: controlled studies of immunogenicity and reactogenicity. *Vaccine* 2001; 21:2127-2137.
- Petre J. Combined vaccines comprising hepatitis B surface antigens and other vaccines. EP 835663, 1998.
- 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
- Sturgess, A. W., Rush, K., Charbonneau, R. J., Lee, J. I., West, D. J., Sitrin, R. D., and Hennessy, J. P. 1999. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine stability: catalytic depolymerization of PRP in the presence of aluminum hydroxide. *Vaccine*, 17 (9-10):1169-1178.