

Desarrollo de la formulación, escalado y estabilidad de la vacuna antialérgica de *Dermatophagoides siboney* adyuvada con gel de hidróxido de aluminio

*Formulation development, scale-up, and stability of a *Dermatophagoides siboney* allergy vaccine, adjuvanted with Alum Hydroxide gel*

Roxana Samalea-Díaz^a, Damaris Torralba-Averoff^a, Deibbys Martínez-García^a, Wendy Ramírez-González^a, Maytee Mateo-Morejón^a, Yunia Oliva-Díaz^a, Vilmail Quintana^a, Oliver Pérez-Martín^b y Alexis Labrada-Rosado^{a,*}

^a Centro Nacional de Biopreparados, Cuba.

^b Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", Universidad de Ciencias Médicas de La Habana, Cuba.

* labrada@biocen.cu

Recibido: 4 de abril de 2017; **Aceptado:** 19 de diciembre de 2017.

RESUMEN

La adsorción de las proteínas alergénicas al gel de hidróxido de aluminio (GHA) es importante para la seguridad y efectividad de las vacunas empleadas para la inmunoterapia alérgico-específica. La adsorción de los alérgenos del ácaro del polvo *Dermatophagoides siboney* al GHA puede ser afectada por el tampón fosfato (PBS). El objetivo de este trabajo fue evaluar comparativamente cambios en la composición de una vacuna en fase de desarrollo en cuanto a reducción de PBS, GHA y tiomersal, tanto a escala de laboratorio como piloto en condiciones de Buenas Prácticas de Fabricación. Se evaluó el orden de adición de los componentes y se empleó un diseño factorial para evaluar la influencia de las variables: contenido de PBS y GHA. A escala piloto se formularon tres lotes de tres variantes con reducción gradual de PBS (1 - 10 mmol/L) y GHA (0,5 - 2 mg/mL) con respecto a la variante original. Se determinó la adsorción del alérgeno principal Der s 1 y la actividad alérgica total mediante ELISA y se realizó un estudio de estabilidad a 2 - 8 °C durante 24 meses. Los resultados indicaron que la adsorción de Der s 1 mejora considerablemente cuando el PBS se reduce o elimina. Sin embargo, la variación del GHA no ocasionó una influencia de consideración. Los cambios en cuanto a PBS y GHA y la eliminación del tiomersal no provocaron alteraciones en la estabilidad del producto. Los resultados demostraron la consistencia del proceso de formulación aséptica en todas las variantes, contribuyendo a definir el espacio de diseño de la vacuna.

Palabras clave: alérgeno; alúmina; vacuna; formulación

ABSTRACT

Adsorption of allergenic proteins onto aluminum hydroxide gel (AHG) is important for the safety and efficacy of vaccines used for allergen-specific immunotherapy. The adsorption of *Dermatophagoides siboney* dust mite allergen to AHG can be hampered by phosphate buffer (PBS). The aim of this work was to assess changes of product composition, in terms of reducing the content of PBS and AHG, as well as, removal of thiomersal, both at laboratory and GMP pilot scale. A factorial design was used to evaluate the influence onto antigen adsorption of two independent variables: PBS and AHG content. Three batches of three formulation variants with gradual reduction of AHG (0,5 - 2 mg/mL) and PBS (1 - 10 mmol/L) content, together with a control variant were prepared at pilot scale. The adsorption of Der s 1 allergen and total allergenic activity were measured by ELISA and a real-time stability study was performed at 2 to 8 °C during 24 months. The results indicate that Der s 1 adsorption considerably improves when the PBS is reduced or completely removed. However, the variation of AHG showed no significant influence on Der s 1 adsorption. Changes regarding PBS and AHG, and thiomersal removal did not cause alterations in product stability during 24 months. The results demonstrated the consistency of aseptic formulation process for every variant, contributing to define the product design space during pharmaceutical development.

Key words: Plant species; allergen; alum; vaccine; formulation

INTRODUCCIÓN

Los ácaros del polvo doméstico del género *Dermatophagoides* son aeroalergenos muy comunes asociados al asma y otras manifestaciones alérgicas respiratorias. En Cuba entre 70 y 85 % de los asmáticos muestran sensibilización alérgica a la especie *Dermatophagoides siboney*.¹ La inmunoterapia alergeno-específica (IT), modifica el curso natural de la alergia interfiriendo con los mecanismos inmunológicos subyacentes y es el único tratamiento con efectividad duradera. En la actualidad, se intentan desarrollar nuevas vacunas terapéuticas antialérgicas que permitan mejorar la eficacia de la IT en pacientes asmáticos.² Una de las tendencias principales es el empleo de adyuvantes con el objetivo de modular el sistema inmunológico hacia un patrón Th1 y Treg y la inducción de anticuerpos bloqueadores, y así obtener vacunas más eficaces y seguras con una dosis más reducida de alérgeno.^{3,4}

A pesar de que los geles de sales de aluminio se caracterizan por inducir un patrón de respuesta inmune de tipo Th2, son ampliamente empleados en vacunas antialérgicas, principalmente por el efecto de depósito que provee la liberación lenta del alérgeno reduciendo así el riesgo de reacciones anafilácticas inmediatas, y también, porque refuerzan la respuesta de anticuerpos protectores IgG. El gel de Hidróxido de aluminio constituye un “sistema de entrega” dirigido a la fagocitosis del antígeno por las células presentadoras de antígenos y permite la incorporación en el mismo, de forma relativamente sencilla, no solo de varios antígenos, sino también, de otros adyuvantes capaces de interactuar con receptores de la inmunidad innata, entre ellos los llamados ligandos de TLRs (siglas en inglés, “*Toll-like receptors*”).^{5,6}

Este trabajo aborda el desarrollo de la formulación de una novedosa vacuna antialérgica denominada PROLINEM-DS, que tiene como componentes: alérgenos purificados del ácaro *Dermatophagoides siboney* en calidad de ingrediente activo; el proteoliposoma (PL) de *Neisseria meningitidis* B como adyuvante inmunomodulador y gel de hidróxido de aluminio (GHA) como adyuvante de depósito y sistema de entrega. PROLINEM-DS persigue proveer un tratamiento de la enfermedad alérgica con pocas inyecciones. Estudios previos han evidenciado el efecto adyuvante antialérgico de la combinación de PL y GHA en conjunto con alérgenos de ácaros.⁷ No obstante, lograr niveles óptimos de adsorción al gel de aluminio de los componentes de la vacuna es importante para su efectividad y seguridad. Uno de los problemas identificados en estudios anteriores ha sido que no se lograban niveles óptimos de adsorción de Der s 1 (alérgeno principal de *D. siboney*) al GHA, por interferencia de los iones fosfato del tampón fosfato salino (PBS, siglas del inglés).⁸ De ese modo, la reducción o eliminación del fosfato en la disolución tampón ha sido propuesta como solución. Por otra parte, la reducción del contenido de GHA pudiera también considerarse como una mejora en términos de seguridad, al reducir la formación indeseable de nódulos subcutáneos en el sitio de la inyección.⁹ Otro de los componentes del producto es el tiomersal, empleado como preservante antimicrobiano, el cual, a pesar de ser ampliamente usado en vacunas, ha sido cuestionado por su toxicidad, y acumulación en el medio ambiente. De ese modo, una tendencia actual en el desarrollo de vacunas es reducir o eliminar el tiomersal en las mismas.⁹

Estas modificaciones en la composición vacunal pueden afectar potencialmente la estabilidad del producto, aspecto que debe ser evaluado propiamente en estudios de estabilidad para el período de validez propuesto.¹⁰⁻¹² Por último, el escalado del producto y su producción de

forma consistente en condiciones de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) constituye un requisito para su evaluación clínica. Es un reto para los desarrolladores conjugar el cumplimiento de las BPF y disponer del espacio de flexibilidad necesario en esa etapa del proceso de desarrollo que permita la optimización de los procesos y los cambios necesarios.¹³ El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar comparativamente a escala de laboratorio y piloto en condiciones de BPF, cambios en la composición de la vacuna Prolinem-DS que pudieran constituir mejoras al producto en términos de calidad, eficacia y seguridad. En particular, en cuanto a reducción del contenido de los iones fosfatos y de GHA y la eliminación del tiomersal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Composición del producto

La vacuna terapéutica antialérgica Prolinem-DS contiene como ingrediente activo una fracción de proteínas (DS), purificada a partir del extracto del ácaro de *Dermatophagoides siboney* (VALERGEN-DS, BIOGEN, Cuba).¹⁴ La concentración de Der s1, alérgeno principal en el producto final es 8 µg/mL. Además, incluye proteoliposoma de membrana externa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B (100 µg/mL), producido por Instituto Finlay, Cuba y gel de hidróxido de aluminio 2 mg/mL (Brenntag Biosector A/S). Se emplean como excipientes: disolución salina tamponada con fosfato PBS 0,01 mol/L (9 g/L; fosfato monosódico 0,32 g/L y fosfato disódico 1,09 g/L) y como preservante, tiomersal 0,025 mg/mL. En este estudio se empleó también una variante de PBS con reducción a la mitad de la concentración de ambas sales de fosfato (es decir, 0,005 mol/L), manteniendo la concentración original de cloruro de sodio a la que denominamos abreviadamente ½PBS.

Experimentos de variación del orden de adición de los componentes

Se realizaron a escala de laboratorio a un volumen final de 10 mL. Al gel de aluminio se le adicionaron los componentes lentamente, con agitación a 200 r/min durante 1 h a 4 °C para cada paso de adición. Se formularon cuatro variantes cambiando el orden de adición de los cuatro componentes. Variantes: 1 (orden: GHA, PBS, PL y DS); 2 (GHA, PL, DS y PBS); 3 (GHA, DS, PL y PBS) y 4 (GHA, Mezcla de PL+DS y PBS). De cada una de las variantes 2, 3 y 4 se formuló una variante con tampón PBS completo y otra con ½PBS. Entre cada paso de adición, después de 1 h de agitación, se tomaron muestras que se analizaron en cuanto a absorbancia a $\lambda = 280$ nm, contenido de proteínas totales y de Der s1.

Experimentos de reducción del contenido de tampón fosfato y GHA

El experimento se realizó a escala de laboratorio, 10 mL. Se empleó un diseño factorial con dos factores: concentración de tampón fosfato y de GHA. En el factor fosfato los niveles fueron: 0 y 0,005 mol/L (corresponde a ausencia de fosfato, o sea, solo disolución salina, y ½PBS, respectivamente). En el factor GHA se seleccionaron tres niveles de concentración: 2, 1 y 0,5 mg/mL. Se empleó la tercera variante de orden de adición de los componentes evaluados en el experimento anterior.

Proceso de formulación a escala piloto

Fueron evaluadas cuatro variantes (Tabla 1). Se fabricaron tres lotes consecutivos de cada variante, con tamaño de lote de 1 000 bulbos de 0,5 mL cada uno, empleando bulbos 2R de vidrio calidad hidrolítica I y tapones de clorobutilo (COMEI, Italia). El orden de adición de los componentes de la formulación fue el siguiente: GHA, Alergeno DS, PL, tiomersal y finalmente PBS. Para cada componente se prepararon disoluciones concentradas estériles (para GHA y PBS, esterilizada en autoclave, el resto por filtración estéril 0,2 μ m). Se adicionó la cantidad necesaria de cada disolución concentrada para alcanzar las concentraciones finales respectivas (según Tabla 1), lentamente, empleando un agitador magnético a 200 r/min, para un volumen final de 800 mL. Por último, se realizó el llenado 0,5 mL por bulbo. Todo el proceso se realizó en condiciones asépticas, en áreas e instalaciones calificadas de BIOCEN, Cuba, con cumplimiento de BPF. Los lotes fueron liberados por la Dirección de Aseguramiento de la Calidad de esa institución.

Tabla 1. Variantes de formulación para la fase piloto y concentración final de los componentes.

Componentes	Variantes			
	A	B	C	D
GHA, mg/mL	2	2	2	1
PBS, mmol/L	10	5	0	5
Tiomersal, mg/mL	0,025	0	0	0

Métodos analíticos

Determinación del contenido de Der s 1. Se realizó mediante ELISA “sandwich” con anticuerpos monoclonales específicos a ese alérgeno (BIOCEN, Cuba) según se ha descrito previamente.¹⁵ Se recubrieron placas de poliestireno con 100 μ L/pozo del anticuerpo monoclonal anti Der s1 5F7/H8 a 5 μ g/mL en tampón carbonato-bicarbonato de sodio, pH 9,6, durante toda la noche a 4 °C. El bloqueo se realizó durante una 1 h a 37°C con PBS-BSA 1 %. Posteriormente, se adicionaron 100 μ L/pozo de las muestras en PBS-BSA 1 %. Se empleó como control positivo la Referencia Interna del extracto alérgico de *Dermatophagoides siboney* (BIOCEN, Cuba). Las muestras se incubaron durante 1,5 h a 37 °C con agitación. Luego se añadió el anticuerpo monoclonal E10E10 biotinilado en una dilución 1/4 000 y se incubó durante 1 h a 37 °C. Después se adicionó el conjugado estreptavidina-peroxidasa (SIGMA, EE.UU.) dilución 1/10 000 y se incubó durante 0,5 h a temperatura ambiente. Se aplicó como sustrato peróxido de hidrógeno 0,03 % y como agente cromógeno Tetrametil-bencidina (TMB, SIGMA, EE.UU.) en tampón citrato-fosfato pH 5. Se esperó el desarrollo de la coloración durante cinco minutos. La reacción se detuvo con 50 μ L/pozo de ácido sulfúrico 2,5 mol/L. Se determinó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas ELISA (PR-521, TecnoSUMA, Cuba). Entre los pasos se realizaron lavados. La adsorción de Der s 1 se calculó como el cociente entre el contenido de Der s1 en el sobrenadante de la vacuna y el contenido de partida determinado en el IFA.

Proteínas totales. Se realizó mediante dos métodos: (i) Determinación de la absorbancia o Densidad Óptica (DO) a 280 nm y (ii) por el Método de Bradford,¹⁶ con un patrón de BSA en el intervalo de 50 - 400 μ g/mL y medición de la absorbancia a 620 nm en un lector de placas. La adsorción de proteínas totales se calculó como el cociente entre los valores determinados

en el sobrenadante de la vacuna y la suma de los valores de partida en el IFA y el adyuvante PL.

Actividad alergénica no adsorbida. Se determinó mediante el ELISA de inhibición de IgE. Se recubrieron microplacas de poliestireno con Extracto Alergénico de Referencia Interna (RI). Se bloquearon los sitios de unión inespecífica de la placa con PBS-BSA 1 %. A continuación se realizó la inhibición de la IgE sérica de la mezcla de sueros humanos, mediante la incubación del suero con cantidades crecientes de las muestras y de la RI, en paralelo. Después de efectuar el procedimiento de lavado, se realizó la detección de la IgE unida al alérgeno fijado a la placa, mediante un conjugado anti-IgE-Peroxidasa (Sigma, USA) dilución 1/2 000. El revelado se realizó mediante la adición del sustrato peróxido de hidrógeno 0,03 % y como agente cromógeno TMB en tampón citrato-fosfato pH 5. Se determinó la absorbancia a 450 nm en el lector de placas ELISA. La interpretación de los resultados del ensayo se realizó mediante el método de las rectas paralelas. Se construyeron curvas de inhibición para la RI y las muestras respectivamente. Se llevó a cabo una regresión lineal con los valores de Absorbancia en función del % de inhibición, para comprobar el paralelismo (prueba de Student, $p < 0,05$) de cada muestra con la RI y se calculó la potencia relativa como el antilogaritmo de la distancia horizontal entre las rectas paralelas.

Aluminio. Se realizó mediante valoración química. A 1 mL de muestra, se añadió 1 mL de ácido sulfúrico y 125 μ L de ácido nítrico 65 %. Se calentó a 100 °C durante 10 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadieron dos gotas de la disolución indicadora anaranjado de metilo 0,04 %. Se adicionó lentamente disolución de hidróxido de sodio 50 % hasta tomar coloración amarilla. Se adicionaron 25 mL de agua destilada, 10 mL de disolución de EDTA sal disódica 0,01 N y 5 mL de disolución reguladora de acetato. Se sometió a ebullición durante tres min. Se añadió 1 mL de disolución indicadora de 1-piridil-2-azonaftol 0,1 %. Se valoró en caliente con sulfato de cobre II 0,01 mol/L hasta que se tornó rojo púrpura. Se procedió a calcular el contenido de GHA por el volumen consumido.¹⁷

Tiomersal. A 0,36 mL de muestra se adicionaron 0,2 mL de disolución de ácido sulfúrico 1 N; 3,44 mL de etanol absoluto (95 %) diluido en agua 1:2 y 2 mL de disolución de ditizona 0,3 mg/mL. Se determinó la absorbancia de la disolución de referencia y de la muestra a una longitud de onda de 482 nm.¹⁸

Seguridad General y Esterilidad. Se realizaron estos ensayos a los lotes a escala piloto según la Farmacopea Estadounidense.^{19,20}

Estudio de Estabilidad

Se realizó según metodología de ICH,¹⁰ con una duración de dos años, a temperatura de 2 a 8 °C, con bulbos en posición normal e invertida. Se evaluaron tres lotes consecutivos producidos en condiciones de BPF a escala piloto. Se realizaron los ensayos cada tres meses para los siguientes parámetros: características organolépticas, pH, contenido de GHA, contenido de tiomersal, adsorción de Der s 1, adsorción de proteínas y actividad alergénica no adsorbida. El ensayo de esterilidad se realizó solo al inicio y final del estudio.^{10, 11}

Métodos estadísticos

Se realizó mediante el programa Statistica 8.0 (StatSoft Inc., EE.UU.). A escala de laboratorio se empleó un diseño experimental factorial completo de tipo mixto de 2 y 3 niveles, según Connor and Young,²¹ con los factores: concentración de tampón fosfato (niveles: 0 y 5 mmol/L) y concentración de GHA (niveles: 0,5; 1 y 2 mg/mL) para evaluar la influencia de estos en la adsorción del alérgeno Der s 1 y de las proteínas totales al GHA. En otros experimentos, para la comparación entre variantes, así como entre diferentes pasos del proceso, se empleó ANOVA simple (complementado con test de Tukey) o de dos vías, complementado con test de Bonferroni (GraphPad Prism v5.03, GraphPad Software, EE. UU). Para la evaluación de tendencias y estimación del período de validez en el estudio de estabilidad se empleó regresión lineal con el mismo software estadístico.

RESULTADOS

Influencia del orden de adición de los componentes en la adsorción

En un primer experimento donde se varió el orden de adición de los componentes, los valores finales de adsorción de Der s 1, fueron superiores al 95 % mientras que la adsorción de proteínas, determinada por DO a 280 nm fue algo inferior con valores entre 89,7 y 95,1 %. La primera variante en la que se adiciona el tampón PBS antes que el alérgeno y el PL, fue la de peores resultados tanto en cuanto a adsorción de Der s 1 como de proteínas totales. En cambio, el valor promedio de las otras tres variantes, en las cuales el PBS se adicionó al final fue claramente superior. La diferencia entre la variante 1 y el resto fue significativa, mientras que no lo fue entre las variantes 2, 3 y 4 (ANOVA, $p < 0,05$) (Fig. 1). Por otra parte, el control intermedio practicado durante el proceso de formulación permitió evidenciar que el paso de adición del tampón PBS al final, provocó en las variantes 2, 3 y 4 la reducción significativa, tanto de la adsorción de Der s 1, como de proteínas, sin diferencias significativas entre estas tres variantes para ambas variables (ANOVA de dos vías $p = 0,05$) (Fig. 1).

Por otra parte, la evaluación de la concentración de proteínas no absorbidas mediante el ensayo de Bradford arrojó valores por debajo del límite de cuantificación del ensayo (10 $\mu\text{g/mL}$), indicativo de una adsorción mayor de 90,7 % de las mismas en todos los casos, si se toma en cuenta que los valores iniciales se encontraban entre 107,5 y 118,1 mg/mL.

De ese modo, el orden de adición de los ingredientes no resultó un factor importante, excepto en el caso del tampón, que cuando se añadió al inicio produjo niveles claramente inferiores de adsorción. Así, se seleccionó la variante 3 (adición de Der s 1, seguido de PL y finalmente tampón) para el siguiente experimento en que se evaluó la reducción de fosfatos y aluminio.

Influencia de la reducción del contenido de GHA y del tampón PBS en la adsorción

En un segundo experimento a escala de laboratorio se evaluó la adsorción del alérgeno Der s 1 y de las proteínas totales en dependencia del contenido de tampón y de GHA, a partir de un diseño factorial (Fig.2). De modo general, la reducción del tampón resultó en un incremento de la adsorción de Der s 1, y dicho efecto fue significativo ($p < 0,05$). El valor máximo (99,8 %) se alcanzó en ausencia de tampón. En contraste, la variación del contenido

de GHA en el intervalo de 0,5 a 2 mg/mL mostró menor influencia sobre la adsorción de Der s 1. En el modelo lineal, dicho factor no fue significativo ($p > 0,05$) y en el modelo con efecto cuadrático alcanzó solo por escaso margen la significación estadística ($p = 0,03$).

La adsorción de las proteínas totales determinada por DO a 280 nm mostró un comportamiento similar, aunque ninguno de los dos factores resultó estadísticamente significativo, lo cual obedece a una mayor dispersión de los datos. Los valores de adsorción de proteínas oscilaron entre 92,1 y 96,2 %, para un promedio de 94,1 % (IC95%: $\pm 0,8$ %). Por otra parte, con el empleo del método analítico alternativo (Bradford), los valores de concentración de proteínas en el sobrenadante resultaron inferiores al límite de detección del ensayo (10 $\mu\text{g/mL}$) indicando una adsorción superior a 91,4 % en todos los casos, relativa a los valores iniciales situados en el intervalo de 116,3 a 119,4 mg/mL.

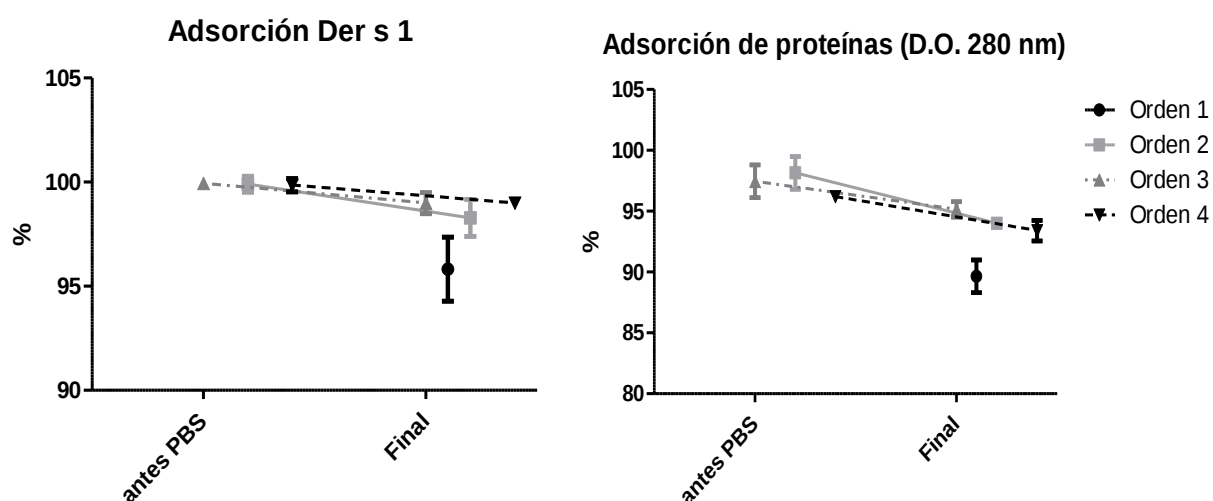


Figura 1. Valores de adsorción de Der s 1 al GHA en dependencia del orden de adición. Orden 1: PBS seguido de alérgeno y PL; Orden 2: alérgeno, PL y PBS; Orden 3: PL, alérgeno y PBS; Orden 4: mezcla de alérgeno más PL y PBS. Las barras verticales indican IC95 %.

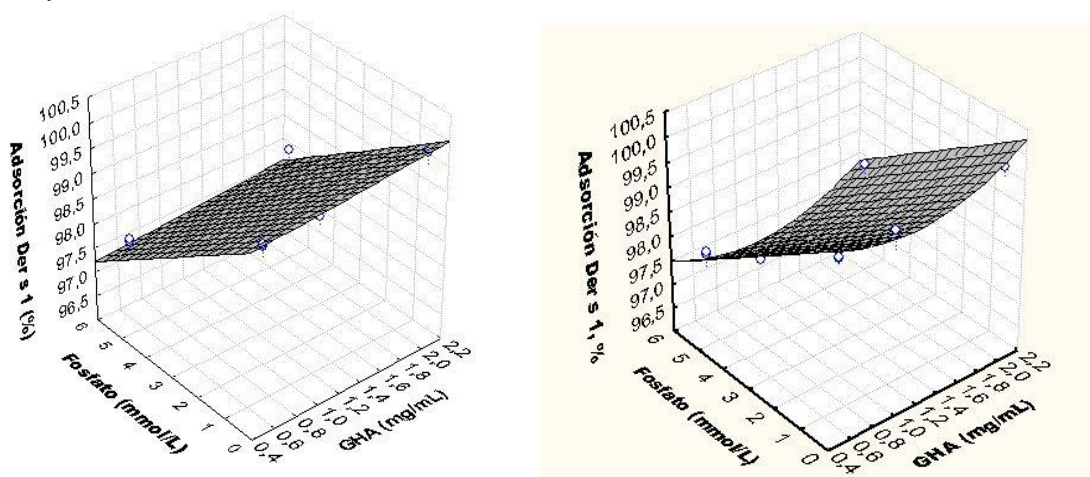


Figura 2. Gráfico de superficie del diseño factorial que describe la dependencia de la adsorción de Der s 1 de la concentración de tampón fosfato y de gel de hidróxido de aluminio (GHA). Izquierda: teniendo en cuenta solo efectos lineales, resultó significativo solamente el factor fosfato ($p < 0,001$). Ecuación: $z = 99,61 + 0,172x - 0,410y$; $r^2 = 0,949$. Derecha: efectos cuadráticos. Resultaron significativos ambos factores, fosfato ($p < 0,001$) y GHA ($p = 0,03$). Ecuación: $z = 100,49 - 1,65x + 0,709x^2 - 0,410y$; $r^2 = 0,973$.

Resultado del escalado y estudio de estabilidad

A partir de los resultados a escala de laboratorio se seleccionaron cuatro variantes de formulación (denominadas A, B, C y D, Tabla 1) para su evaluación a escala piloto en condiciones de BPF. La variante A se corresponde con la formulación original del producto. Se obtuvieron 12 lotes, en total, tres por cada variante con rendimientos entre 799 y 1 044 bulbos, para un promedio de 874,1 y CV de 9,5 %, sin diferencias significativas entre variantes (ANOVA, $p > 0,05$).

El promedio de los valores de pH fue de $6,98 \pm 0,06$ sin diferencias significativas entre variantes, a pesar de la reducción o eliminación del tampón en la variante C. Por otra parte, de las tres variables que miden los niveles de adsorción, la de proteínas totales fue como promedio $98,6 \pm 2,6$ %, sin diferencias significativas entre variantes. La actividad alérgica residual resultó como promedio $8,7 \pm 1,4$ % indicando que el 91,3 % de los componentes alérgicos fueron adsorbidos, tampoco sin diferencias significativas entre variantes. En contraste, el contenido del alérgeno Der s 1, el cual contribuye de forma importante a la actividad alérgica total, sí mostró diferencias entre variantes con menores valores para la variante A (PBS 10 mmol/L) y B (PBS 5 mmol/L) con respecto a C (sin PBS) (Fig. 3). Estas diferencias fueron significativas (ANOVA, $p < 0,05$).

Desde el punto de vista del control de calidad, todos los ensayos realizados al producto terminado se encontraron dentro de los límites propuestos en el proyecto de especificación de calidad. Específicamente, los niveles de adsorción de Der s 1 fueron superiores a 90 %, la actividad residual no adsorbida fue menor de 20 % (o sea, más de 80 % de adsorción) y la adsorción de las proteínas totales fue mayor del 80 %. En general, el proceso demostró consistencia, con valores relativamente bajos de dispersión en las variables principales; específicamente, el CV promedio en las tres variables que indican adsorción fue de 2,3 %.

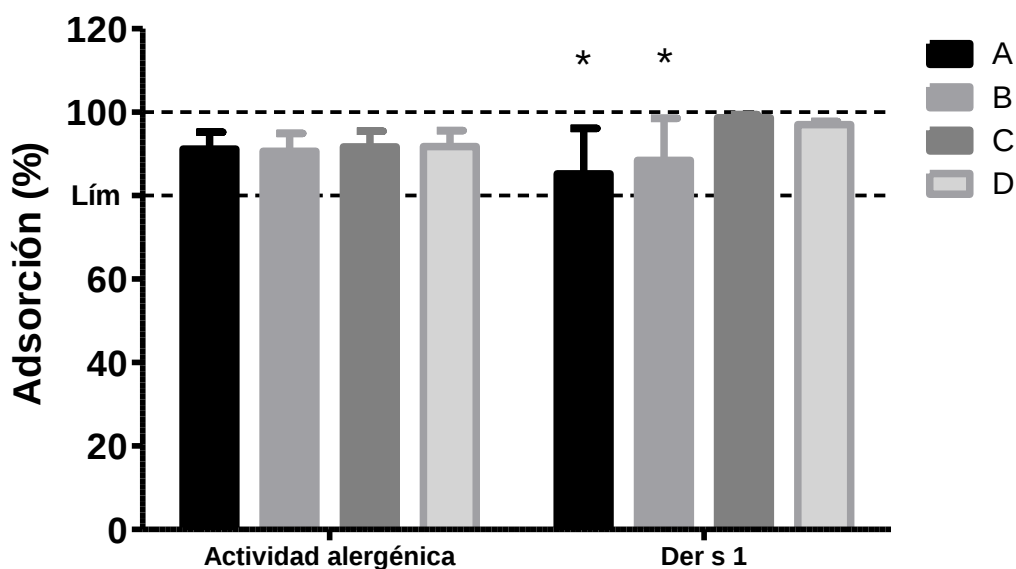


Figura 3. Comparación entre las variantes de formulación a escala piloto en cuanto a las variables que reflejan adsorción de la actividad alérgica total y del alérgeno Der s 1. Las barras verticales indican el IC95 %. Las variantes A y B mostraron diferencias significativas (ANOVA 2 vías, $p < 0,05$) en cuanto a adsorción de Der s 1 con respecto a C y D.

Muestras de los lotes pilotos fueron sometidas a un estudio de estabilidad en tiempo real a temperatura de 2 - 8 °C, evaluando todos los parámetros de la especificación de calidad. Después de 24 meses de conservación todas las variables se encontraban dentro de los límites establecidos. En el análisis de tendencia de las variables consideradas como más susceptibles de ser afectadas por los cambios en la formulación: adsorción de Der s 1, actividad alergénica total no adsorbida y pH (Fig 4), los resultados fueron similares entre la posición normal e invertida, lo cual evidencia la no influencia del contacto con el tapón de clorobutilo sobre la estabilidad del producto (Fig.4).

Las variables actividad alergénica total y pH no mostraron diferencias significativas entre variantes de formulación. En contraste, la adsorción de Der s 1 mostró una tendencia creciente en el tiempo (es decir en sentido positivo) para las variantes A (PBS 10 mmol/L) y B (PBS 5 mmol/L), acercando sus valores promedios a los de las variantes C y D. En este caso, las diferencias entre las variantes A-B con C y D, en cuanto a pendientes de regresión, fueron significativas (ANOVA, $p < 0,05$). A partir del límite extremo del intervalo del 95 % de confianza de la pendiente se calculó el período de validez como la intercepción de la recta con el límite de especificación. De acuerdo a los resultados de esta estimación para las variables seleccionadas (Tabla 2), la actividad alergénica no adsorbida arrojó el menor valor: 28.3 meses, en el caso de la variante A en posición invertida. En general, todas las estimaciones fueron mucho mayores que el período evaluado: 24 meses y ninguna de las variantes de formulación mostró claras ventajas sobre otras.

El ensayo de esterilidad realizado al final del estudio evidenció la preservación de este parámetro importante para un producto inyectable, lo cual demuestra la integridad del sistema de envase-cierre y la posibilidad de prescindir del preservativo tiomersal (variantes B, C y D) sin afectar la calidad microbiológica.

DISCUSIÓN

Evaluar posibles mejoras en el proceso de formulación que contribuyan a incrementar la adsorción del alérgeno Der s 1 al GHA, y con ello contribuir a mejorar, eventualmente, la seguridad y eficacia de la vacuna terapéutica, es el propósito de este trabajo. Los resultados demostraron que el orden de adición de los componentes no constituyó un factor importante para la adsorción de Der s 1, a excepción de la variante donde se agregó el tampón PBS al inicio, en la cual se alcanzaron niveles claramente inferiores de adsorción. Este resultado concuerda con lo obtenido en estudios anteriores sobre la influencia negativa del contenido de iones fosfato sobre la adsorción de Der s1 al GHA; probablemente, porque los mismos compiten con el alérgeno por la unión al gel.⁸ El efecto negativo del fosfato fue confirmado en este trabajo cuando se redujo a la mitad o se eliminó completamente el contenido de sales de fosfatos en tres variantes de formulación, obteniéndose, valores cercanos al 100 % de adsorción, tanto a escala de laboratorio como en lotes pilotos en condiciones de BPF.

Otro objetivo fue evaluar la posible reducción del contenido de GHA, el cual tiene un doble rol en la vacuna: en la seguridad, para la disminución del riesgo de reacciones anafilácticas mediadas por IgE, y también en la efectividad, como potenciador de la respuesta de anticuerpos IgG. El grado de adsorción de los antígenos es importante en ambos roles. En particular, en la vacuna Prolinem-DS el GHA sirve como sistema de entrega que permitiría la presentación antigénica mediante macropinocitosis y, por lo tanto, la presentación

simultánea del antígeno y el ligando TLR (o sea el PL) en el mismo fagosoma, factor que se considera importante para la efectividad del adyuvante inmunomodulador.^{7,22-24}

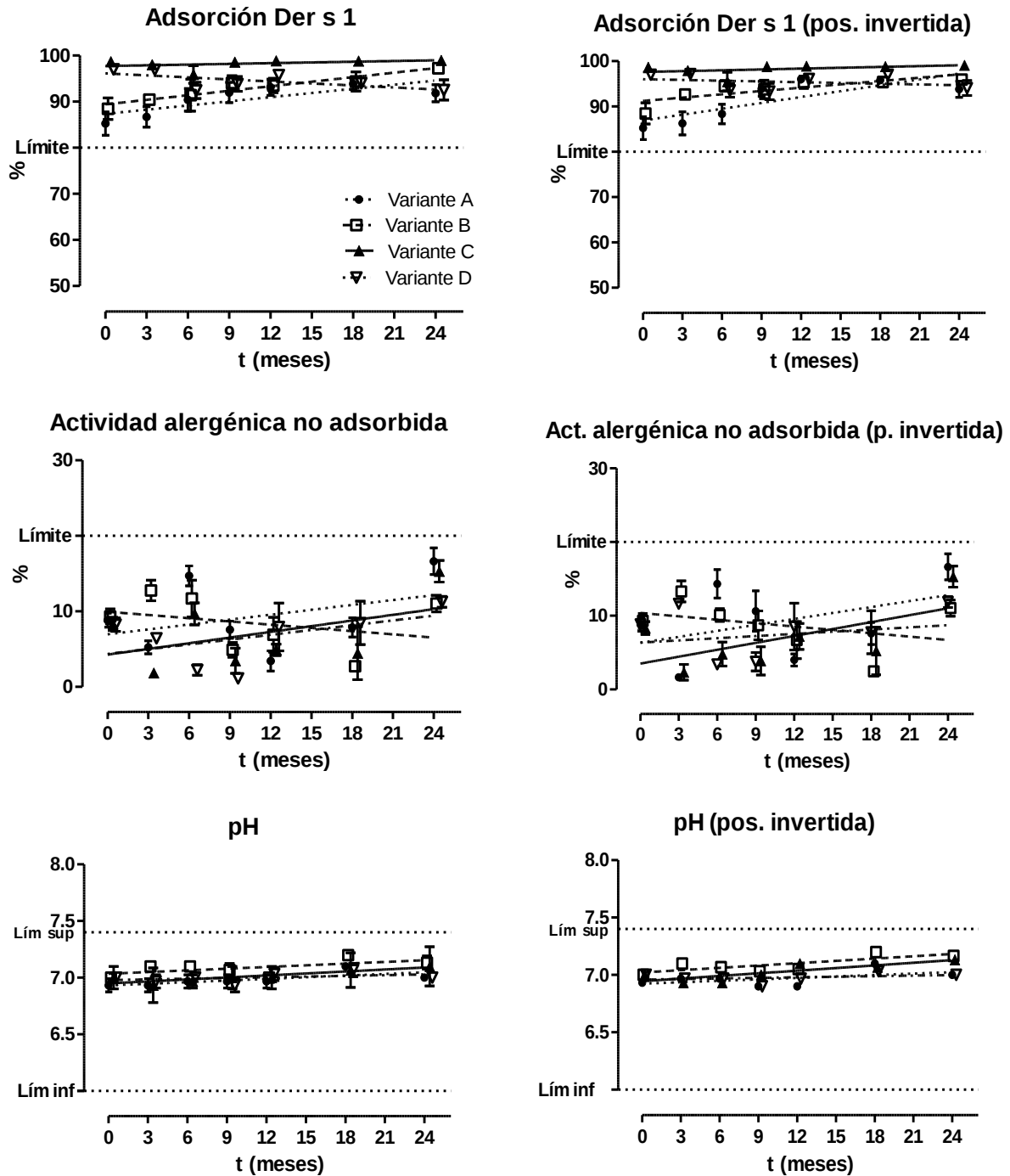


Figura 4. Análisis de regresión lineal de la estabilidad de las variables seleccionadas: adsorción de Der s1, actividad alérgica no adsorbida y pH, para los bulbos en posición normal (izquierda) e invertida (derecha) a partir del promedio de los tres lotes de cada variante de formulación.

Tabla 2. Resumen del análisis de regresión de las variables principales del estudio de estabilidad, indicando el signo y la significación estadística ($p < 0,05$) de la pendiente promedio para cada variante de formulación, por separado para los bulbos conservados en posición normal (N) o invertida (I), y la predicción del tiempo de validez.

Ensayos	Variables	Variantes de formulación							
		A N	I	B N	I	C N	I	D N	I
Adsorción Der s 1	Pendiente	> 0	> 0	> 0	> 0	n.s.	n.s.	< 0	n.s.
	Tiempo de validez (meses)	∞	∞	∞	∞	∞	∞	60,9	90,5
Actividad alergénica no adsorbida	Pendiente	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	> 0	n.s.	n.s.
	Tiempo de validez (meses)	31,5	28,3	∞	∞	34,6	33,4	40,1	47,0
pH	Pendiente	> 0	n.s.	> 0	> 0	n.s.	> 0	n.s.	n.s.
	Tiempo de validez (meses)	61,4	58,6	46,5	40,5	41,5	34,3	86,8	83,4

Como aspecto negativo ligado al uso del GHA se encuentra la formación de nódulos en el sitio de la inyección,²⁵ que provocan malestar y dolor en el paciente. Los resultados mostraron que la reducción de este componente en la formulación, de 2 a 0,5 mg/mL, no influye negativamente en la adsorción de Der s 1 y del resto de las proteínas al gel. De ese modo, al menos desde el punto de vista estrictamente del desarrollo farmacéutico de la formulación, esta reducción sería factible. Se necesitaría un estudio de inmunogenicidad en modelos animales para evaluar el efecto de esta reducción en cuanto a efecto farmacológico.

El escalado del proceso de formulación de los productos biofarmacéuticos para uso inyectable supone retos importantes desde el punto de vista de su procesamiento aséptico para mantener su esterilidad. De ese modo, es necesaria la producción de lotes a escala piloto en instalaciones con cumplimiento de las BPF, con vistas a establecer los parámetros de proceso y evaluar la estabilidad en conservación. Los resultados demostraron la posibilidad del escalado de las variantes de laboratorio, ya que los principales parámetros evaluados como adsorción de Der s1, actividad alergénica, y proteínas totales mostraron resultados similares entre ambas escalas dentro del rango de variabilidad de los métodos analíticos empleados.²⁶ La consistencia de los parámetros de calidad entre lotes es un requisito esencial de las BPF.^{27,28} Los resultados de los tres lotes de cada variante por separado y del conjunto de los lotes producidos evidenciaron el cumplimiento consistente de los límites de calidad propuestos y una variabilidad aceptable desde el punto de vista regulatorio, con vistas al uso de los productos en ensayos no clínicos que requieran BPF y en ensayos clínicos tempranos, Fase I y II.

Otro aspecto evaluado en la fase de escala piloto fue la reducción o eliminación del tiomersal, empleado como agente antimicrobiano. El uso de preservos es requerido para productos inyectables con contenedores multiuso, pero es posible su eliminación en vacunas en presentación monodosis, si se asegura su esterilidad durante el proceso de formulación y llenado aséptico, lo cual es muy dependiente de las instalaciones y equipamientos. Los resultados demostraron, precisamente, que las variantes sin tiomersal (B, C y D) mantuvieron el requisito de esterilidad durante el proceso, en el producto terminado y al final del estudio de estabilidad de 24 meses. La eliminación del tiomersal propuesta aquí sigue la

tendencia mundial en vacunas^{8,28} y permite obtener un producto más seguro al evitar el peligro potencial de neurotoxicidad y la bioacumulación en el ambiente.

La estabilidad de las vacunas y otros productos biofarmacéuticos basados en proteínas suele ser muy limitada. Entre los factores críticos que influyen en la velocidad de degradación de las proteínas se encuentran la temperatura, el pH, la presencia de microorganismos, así como, la interacción con excipientes y el sistema de envase-cierre, en este caso vidrio de calidad hidrolítica I y tapones de clorobutilo.¹⁰ Para evaluar apropiadamente la estabilidad en conservación de este tipo de producto son requeridos estudios de estabilidad en tiempo real en las condiciones de conservación propuestas, en este caso, en refrigeración de 2 - 8 °C. Aunque, como es usual, el estudio de estabilidad evalúa todos los atributos de calidad establecidos en las especificaciones, este trabajo se enfoca en las variables que miden la adsorción de los alérgenos (Der s1 y actividad alérgica no adsorbida), precisamente a partir de las diferencias apreciadas entre variantes en este sentido y por su importancia para la efectividad y seguridad del producto.

Por otra parte, la reducción o eliminación de las sales del tampón fosfato pudiera afectar el comportamiento del pH a largo plazo, factor importante para la estabilidad de las proteínas. Además, el pH en un producto inyectable debe encontrarse cerca del rango fisiológico.^{3,29} Sin embargo, los resultados del estudio de los lotes pilotos evidenciaron la estabilidad de las cuatro variantes de formulación en todos los atributos de calidad. La adsorción de Der s 1 fue la única variable que mostró claramente una tendencia significativa en el tiempo, aunque en sentido positivo, pues se incrementó en las variantes que tenían valores de partida inferiores (las variantes con menos contenido de PBS). Este incremento pudiera realmente obedecer a un incremento de la adsorción del Der s 1 debido a procesos de modificación química comunes en las proteínas, o también, a una mayor degradación del antígeno en disolución con respecto al adsorbido, teniendo en cuenta la cinética mayor de las reacciones en medio acuoso. Estudios de la estructura del antígeno arrojarían más luz en ese sentido.

Por otra parte, no se apreciaron cambios de consideración en el pH, incluso en la variante sin tampón fosfato. Una posible explicación puede ser la presencia residual de sales del tampón provenientes del IFA, cuya concentración en el producto final sería 10 % del nivel usual del PBS, o sea, 1 mmol/L. Es conocido que dicha disminución del contenido de tampón conlleva reducción de su capacidad amortiguadora, no obstante, el efecto no fue apreciable en este trabajo.

La predicción estadística del período de validez superó los 50 meses, lo cual ofrece un amplio margen sobre el período de validez propuesto de 24 meses. Este período se considera apropiado para la comercialización y coincide con el establecido para otras vacunas disponibles actualmente en el mercado con igual período de validez.³⁰ Por otra parte, los resultados sugieren la posibilidad de evaluar la extensión de este período más allá de los 24 meses, lo cual pudiera ser conveniente para cadenas logísticas en países subdesarrollados.

En general, el presente trabajo evaluó un rango de valores en cuanto al contenido de componentes de una formulación vacunal (fosfatos, GHA, tiomersal), su impacto en los principales atributos de calidad del producto durante su escalado en condiciones de BPF y su estabilidad en conservación en tiempo real. El método y los resultados alcanzados son congruentes con el concepto regulatorio de “Espacio de Diseño”, introducido por las guías ICH Q8 sobre desarrollo farmacéutico.¹³ Este concepto plantea que el trabajo dentro de un

rango de valores de las variables de diseño, determinado previamente mediante experimentación, no se considera como “cambio” en la formulación, en el sentido regulatorio de este término, aspecto que sin dudas representa una ventaja para la futura etapa productiva del producto y para su sistema de aseguramiento de la calidad.

CONCLUSIONES

La adsorción óptima del alérgeno Der s 1 al gel de hidróxido de aluminio se obtiene con un nivel igual o inferior a 1 mmol/L de tampón fosfato y tanto la reducción de fosfatos como de gel de aluminio constituyen mejoras farmacéuticas factibles respecto a la formulación inicial de la vacuna antialérgica PROLINEM-DS. Para elevar la adsorción de Der s1 es conveniente reducir el contenido de fosfato y adicionar este al final del proceso de formulación. Así, el espacio de diseño del producto queda definido en cuanto a rangos de variación de tampón fosfato (1 a 10 mmol/L), GHA (0,5 a 2 mg/mL) y tiomersal (0 a 0,025 mg/mL), con evidencias experimentales a escala de laboratorio y piloto, incluyendo la evaluación de la estabilidad durante 24 meses entre 2 y 8 °C. Los resultados han demostrado la consistencia del proceso, según lo requerido para la producción con destino a ensayos clínicos Fase I y II.

AGRADECIMIENTOS

A Didialys Álvarez, Benito Espinosa, Raisa Cruz, José Carlos Fraga, Miguel Pérez González, Michel Marrero Fajardo, Juan José Domínguez y Erick González por su contribución al proceso de formulación a escala piloto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castro Almarales RL, Mateo Morejón M, Naranjo Robalino RM, Navarro Viltre BI, Álvarez Castelló M, Ronquillo Díaz M, *et al.* Correlation between skin tests to *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis*. *Allergol Immunopathol.* 2006;34(1):23-6.
2. Pfaar O, Cazan D, Klimek L, Larenas Linnemann D, Calderon M. Adjuvants for immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2012; 12:648-657.
3. De Souza Rebouças J, Esparza I, Ferrer M, Sanz ML, Irache JM, Gamazo C. Nanoparticulate Adjuvants and Delivery Systems for Allergen Immunotherapy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2012:1-13.
4. Guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. WHO Technical Report Series No. 927, Annex 1. World Health Organization; 2005.
5. McKee AS, Munks MW, MacLeod MKL, Fleenor CJ, Van Rooijen N, Kappler JW, *et al.* Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. *J Immunol.* 2009; 183(7):4403-14.
6. Kool M, Soullié T, van Nimwegen M, Willart MAM, Muskens F, Jung S, *et al.* Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med.* 2008; 205(4):869-82.
7. Pérez O, Romeu B, Cabrera O, González E, Batista-Duharte A, Labrada A, *et al.* Adjuvants are key factors for the development of future vaccines: Lessons from the Finlay adjuvant platform. *Front Immunol.* 2013; 4:407.
8. Nguyen CA, HYPERLINK "<http://biblat.unam.mx/en/frecuencias/autor/alonso-yarima>" \o "Frequencies by author: Alonso, Yarima" Alonso Y , HYPERLINK "<http://biblat.unam.mx/en/frecuencias/autor/oliva-yunia>" \o "Frequencies by author: Oliva, Yunia" Oliva Y , HYPERLINK "<http://biblat.unam.mx/en/frecuencias/autor/labrada-alexis>" \o "Frequencies by author: Labrada, Alexis" Labrada A , Mayo O. Factors influencing adsorption of *Dermatophagoides siboney* allergen extract into aluminum adjuvants., *Biotechnol Apl.* 2010; 27(4):286-90.
9. Guidelines on regulatory expectations related to the elimination, reduction or replacement of thiomersal in vaccines. WHO Technical Report Series. No. 926, Annex 4. World Health Organization; 2004.
10. Stability Testing of New Drug Substances and Products. ICH Q1A (R2). European Medicines Agency; 2003.

11. CECMED. Resolución No. 34/2000. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos. La Habana. 00-19. ISSN 1684-1832; 2003.
12. Guideline on Allergen Products: Production and Quality Issues. EMEA/CHMP/BWP/304831/2007. European Medicines Agency; 2008.
13. Pharmaceutical Development. ICH Q8 (R2). ICH Harmonised Tripartite Guideline; 2009.
14. Lastre M, Pérez OG, Labrada A, Pérez DA, Bracho GR, Del Campo JM *et. al.*, inventores. Composición vacunal contra las alergias y método para su obtención y empleo en el tratamiento de las mismas. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial. Certificado No. 22983. Resolución No. 1883/2004.
15. Sewer M, Uyema K, Labrada M, González M, Coca M. Monoclonal Antibodies against Der s 1, a Major Allergen of *Dermatophagoides siboney*. Int Arch Allergy Immunol. 2000; 123(3):242–8.
16. Bradford MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976;72(1-2):248-54.
17. USP29-NF24. Contenido de Aluminio. 1:102, [21645-51-2].
18. Naresh Singh G and Kumari P. Quantitative and qualitative analysis of various constituents of vaccines by using analytical techniques. Pharmacophore. 2011;2(3):186-94.
19. USP38-NF33. 2015. Pruebas de reactividad biológica. 1:171-7.
20. USP38-NF33. 2015. Prueba de Esterilidad. 1:139-43.
21. Connor WS and Young S. Fractional factorial experiment designs for experiments with factors at two and three levels. In R. A. McLean & V. L. Anderson (Eds.). Applied factorial and fractional designs. New York: Marcel Dekker 1984.
22. Guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. WHO Technical Report Series. No. 927, Annex 1. World Health Organization; 2005.
23. Hogenesch H. Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants. Front. Immunol. 2013; 3:406.
24. Ghimire TR, Benson RA, Garside P, Brewer JM. Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro. Immunol Lett. 2012; 147(1-2):55–62.
25. Rask C, Lund L, Lund G, Heydenreich B, Wurtzen P, Bellinghausen I, et al. An alternative allergen: adjuvant formulation potentiates the immunogenicity and reduces allergenicity of a novel subcutaneous immunotherapy product for treatment of grass-pollen allergy. Clinical and Experimental Allergy. 2012;42(9):1356-68.
26. Labrada, A. Desarrollo a ciclo completo de las primeras vacunas estandarizadas de alérgenos de ácaros para la inmunoterapia del asma en Cuba. Tesis de doctorado. La Habana: Editorial Universitaria. ISBN 978-959-16-1711-8. – 193; 2012.
27. Requisitos para la eliminación, reducción o sustitución del tiomersal en vacunas. Regulación No 62-2012. CECMED; 2012. Disponible en línea: www.cecmec.cu
28. Allergen Products. Ph Eur monograph <1063>. European Pharmacopeia; 2014.
29. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. World Allergy Organ J. 2015;8(1):1–12.
30. Guidelines on Stability Evaluation of Vaccines. WHO/BS/06.2049. World Health Organization; 2006.