

Estudio de un método de desadsorción de los componentes de VA-MENGOC-BC® para el control de calidad por HPLC

Aida Yaima Merchán Milia y Matilde Cuevas Valdespino

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana. Cuba.
E-mail: mcuevas@finlay.edu.cu

En estos momentos en que la vacunación masiva se impone como la alternativa más promisorio en la práctica médica para el control de la enfermedad meningocócica, la caracterización exhaustiva de cada uno de los componentes que conforman la vacuna VA-MENGOC-BC®, ofrece una información de extraordinaria importancia para enfocar las estrategias de producción y mejoramiento de la misma. Recientemente se ha promovido una tendencia mundial de eliminar el tiomersal de las formulaciones vacunales, por lo que en este trabajo se propone una metodología de desadsorción, que permite el posterior análisis cromatográfico y comparación de muestras del producto final VA-MENGOC-BC® con y sin tiomersal para estudiar la posible afectación de sus componentes activos. Se estudiaron tres lotes de vacuna en tiempo 0, almacenadas de 2°C a 8°C, a los cuales se les aplicaron diferentes variantes de desadsorción. Se demostró que la solubilización del gel de hidróxido de aluminio con HCL para la liberación del complejo vacunal nativo no es posible, y que el método de desadsorción más eficiente para el estudio cromatográfico de los antígenos constituyentes de la vacuna, con el cual se logra un 20% de desadsorción, queda establecido de la forma siguiente: el precipitado obtenido de 3 mL de vacuna se resuspende en 2 mL de solución amortiguadora de fosfato 5 mM, pH 7,2-7,3, se incuba 2 h a 4°C, se centrifuga y se colecta el sobrenadante.

Palabras claves: desadsorción; antígenos; vacuna

Introducción

La enfermedad meningocócica (EM) es una patología infecciosa causada por *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), este es uno de los agentes etiológicos más frecuentemente aislado en las meningitis bacterianas. Dentro de las meningitis bacterianas, la meningocócica es la única capaz de provocar epidemias, que se presentan en cualquier parte del mundo (1).

Su distribución mundial, que puede aparecer de manera esporádica, en forma de brotes localizados o como epidemias diseminadas, con una incidencia anual promedio sólo en países industrializados de 1 a 3 por cada 100 000 habitantes (2) y un elevado índice de letalidad estimado en 171 000 personas anualmente (3). Los grupos de edades que se afectan con más frecuencia son los niños menores de cinco años.

En el año 1988 se aplica en todo el país la vacuna cubana VA-MENGOC-BC®, producida por el Instituto Finlay, Cuba, inicialmente en los grupos de edad de

mayor riesgo, y posteriormente a toda la población entre 3 meses y 24 años, disminuyendo el número de casos hasta alcanzar en 1993 una tasa por debajo de 1 por 100 000 habitantes; estos valores continúan disminuyendo hasta nuestros días, en que se mantienen en 0,55 por cada 100 000 habitantes (4).

El incremento de las exigencias en el control de la calidad de las vacunas impone la caracterización exhaustiva de cada uno de los componentes que conforman las mismas, siendo esto de extraordinaria importancia para enfocar las estrategias de producción y mejoramiento de las vacunas con las que disponemos hoy en día para el control de esta enfermedad.

El tiomersal es uno de los aditivos más antiguo empleado en la Industria Biofarmacéutica para la conservación y preservación de vacunas y otros medicamentos fácilmente atacados por bacterias y otros microorganismos. Es bien conocida la importancia que reviste el control de este tipo de sustancia química en materiales biológicos debido a su alta toxicidad (toxicidad del mercurio) para el

organismo, especialmente en niños pequeños, pues se ha reportado que este afecta el sistema nervioso central con síntomas, tales como letargo, pérdida de apetito, de peso, de memoria, confusión, pérdida de los dientes (5), reacciones alérgicas (6), así como efectos nefrotóxicos cuando se administran altas dosis (7).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto es que se ha promovido una tendencia mundial de eliminar el tiomersal de las formulaciones vacunales (8), por lo que en este trabajo proponemos una metodología de desadsorción, que permita el posterior análisis por HPLC (9) y comparación de muestras vacunales con y sin tiomersal para estudiar la posible afectación de sus componentes activos.

Materiales y Métodos

- 1) Se estudiaron tres lotes de vacuna en tiempo 0 almacenadas de 2 a 8°C, las cuales fueron desadsorbidas según el método descrito para el ensayo de identidad del Polisacárido C presente en VA-MENGOC-BC® envasada (10).
- 2) Se realizó la solubilización del gel de hidróxido de aluminio con HCL 1M, controlando las condiciones de temperatura y pH y se neutralizó con NaOH, para obtener los componentes vacunales libres.
- 3) Se realizó un estudio de capacidad de desadsorción, bajo diferentes condiciones:

La muestra de vacuna se centrifugó a 3500 rpm a 4 °C durante 30 min. El precipitado se disolvió en 2 mL de diferentes soluciones amortiguadoras de fosfato de sodio (5, 7, 10, 25, 50,100,150, 200, 250, 300 y 400 mM) y se incubaron durante los siguientes tiempos (0, 10, 20, 30 y 40 min, 1, 2, 3, 4, 6, 16, 24 y 48 h). En todos los casos se controló el pH entre 7,2 y 7,3.

Se seleccionó la concentración de la solución amortiguadora de trabajo y el tiempo de incubación más efectivos.

Posteriormente, se estudió la influencia de otros parámetros importantes como son: la temperatura, las proporciones de vacuna y solución amortiguadora de desadsorción, así como la posible influencia de la agitación durante el proceso de desadsorción. Estos

parámetros se evaluaron con las especificaciones siguientes:

- Temperatura: ambiente y 4°C
- Proporción vacuna (solución amortiguadora de desadsorción): 3:2; 6:4 y 10:1 (v/v)
- Agitación orbital: 2, 3, 4 y 5 h.

Se determinó la concentración de proteínas por Lowry (11) a las muestras desadsorbidas y fueron evaluadas a 206 nm contra blanco de agua destilada y solución amortiguadora de fosfato a la concentración correspondiente en cada caso.

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la utilización del método de desadsorción, recomendado para el ensayo de identidad del Polisacárido C, presente en VA-MENGOC-BC® envasada (10), no es favorable para los objetivos propuestos por los bajos rendimientos de desadsorción de los antígenos (3%) y por la interferencia que ocasiona la solución de desadsorción en la detección cromatográfica a 206 y 280 nm, donde esta posee una adsorbancia de: 1.373 y 0.030, respectivamente.

La solubilización del gel de hidróxido de aluminio utilizando HCl 1 M, bajo condiciones controladas de pH, no mostró buenos resultados pues se afectaba el complejo de antígenos presente en la vacuna, a pesar de que se estudiaron diferentes soluciones para lograr amortiguar y mantener el pH lo más estable posible. Esto fue debido a que las cantidades de ácido necesarias para lograr este propósito fueron muy altas, lo que se corresponde con lo planteado por otro autor (12), quién demostró que el gel de hidróxido de aluminio posee una velocidad de solubilización muy baja en una solución de citrato.

Con la experiencia de las variantes anteriores y en la búsqueda de una menor interferencia de la solución de desadsorción que a su vez garantice un mayor rendimiento, se ensayaron 11 concentraciones diferentes de soluciones amortiguadoras de fosfato a diferentes tiempos. En la Figura 1 se muestra la concentración de proteínas de las muestras desadsorbidas con las diferentes soluciones de fosfato contra el tiempo de desadsorción y en la Figura 2 aparece la absorbancia a 206 nm de esas mismas muestras en el tiempo.

Figura 1. Determinación de la concentración de proteínas de las muestras desadsorbidas con diferentes concentraciones de fosfato (mM) contra el tiempo de desadsorción.

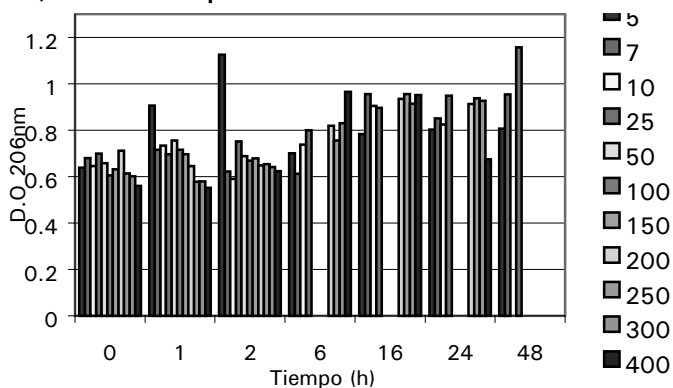
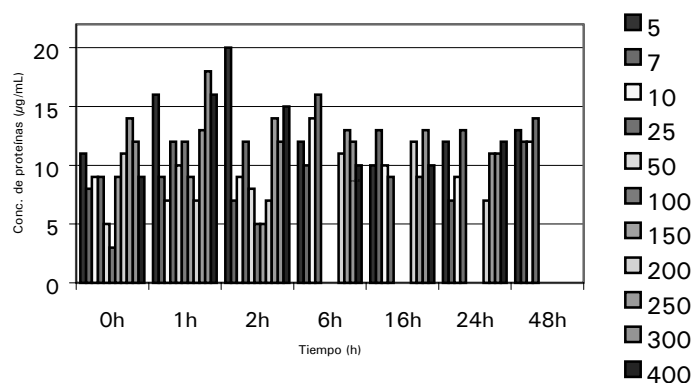


Figura 2. Determinación de la absorbancia a 206 nm de las muestras desadsorbidas con las diferentes concentraciones de fosfato (mM) contra el tiempo de desadsorción.



Se observó que la solución amortiguadora de fosfato 5 mM es la que propicia una mejor desadsorción, por lo que en la Figura 3 se muestran los resultados del estudio de la influencia de la temperatura y el tiempo de incubación en el proceso de desadsorción utilizando la solución antes mencionada. Como se observa en la Figura todas las muestras evaluadas mostraron mejores resultados a 4°C, temperatura que se definió como ideal para el proceso. No se estudió una temperatura superior (por ejemplo 37 °C) en aras de lograr un complejo antigénico desadsorbido lo más estable posible, ya que está demostrado que a temperaturas altas los antígenos pueden sufrir variaciones en su estructura

(13).

Por otra parte, en la Figura 4 se puede observar que con el aumento del tiempo de incubación aumenta la cantidad de proteína desadsorbida demostrándose que utilizando las condiciones menos agresivas (5 mM, 4°C). el tiempo óptimo de incubación era de 2 h.

El estudio de proporción vacuna: solución mortiguadora

Figura 3. Influencia de la temperatura en el proceso de desadsorción con solución amortiguadora fosfato 5 mM.

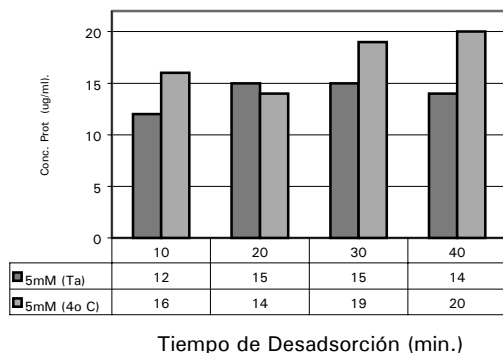
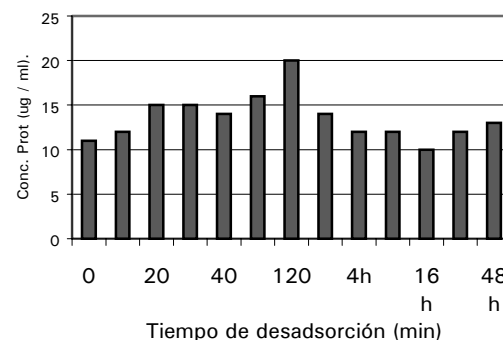


Figura 4. Influencia del tiempo de incubación en el proceso de desadsorción con solución amortiguadora fosfato 5 mM a 4 °C.



de desadsorción óptima demostró que al duplicar las cantidades de vacuna y solución amortiguadora los resultados del proceso de desadsorción no mejoran, de igual forma ocurre al aumentar las cantidades de vacuna y disminuir la cantidad de solución amortiguadora, por lo que se decidió continuar trabajando con la proporción 3:2, establecida para desadsorción de este tipo de preparado farmacéutico con otros fines (10).

Al estudiar el efecto de la agitación durante la incubación, se observó que este parámetro no proporcionó un aumento en el porcentaje de desadsorción en ninguno de los cuatro tiempos ensayados, por lo que decidimos no incorporarlo en el proceso.

Se llegó a la conclusión de que el método de desadsorción más eficiente para el estudio cromatográfico de VA-MENGOC-BC®, con el que cual se logra un 20% de desadsorción, queda establecido de la forma siguiente: El precipitado obtenido de 3 mL de vacuna se resuspende en 2 mL de solución amortiguadora de fosfato 5 mM, pH 7,2-7,3 y se incuba 2 h a 4 °C, transcurrido este tiempo recupere el sobrenadante mediante centrifugación.

Referencias

1. Jodar L, Feavers IA, Salisbury D and Granoff DM. Development of vaccines against meningococcal disease. *The Lancet*. 2002; 359:1499-508.
2. Rosenstein NE, Perkins BA. Update on *Haemophilus influenzae* serotype b and meningococcal vaccines. *Pediatr Clin. North Am*. 2000; 47:337-52.
3. World Health Report. Geneva: World Health Organization; 2000.
4. Valcarcel M, Rodríguez R, Terry H. La Enfermedad Meningocócica en Cuba. Cronología de una Epidemia. 1ra ed. Ciudad de La Habana. ECIMED. Editorial Ciencias Médicas de Cuba. 1991:319-397.
5. MacIntyre R, Burgess M and McIntyre P. Thimerosal fact sheet. <http://www.ncirs.usyd.edu.au/facts/f-thiomersal.html>, february 2003.
6. Cox NH, Forsych A. Thimerosal allergy and vaccination reaction. *Contact Dermatitis* 1988; 18:229-33.
7. Pfab R, Muckter H, Roeder G, Zilfer T. Clinical course of severe poisoning with thiomersal. *Clin Toxicol*. 1996; 34:453-60.
8. Clements CJ, Ball LK, Ball R, Pratt RD. Thiomersal in vaccines: is removal warranted?. *Drug Saf* 2001; 24(8):567-74
9. Bradshaw T P. Introduction to Peptide and Protein HPLC (Volume I). Copyright Phenomenex; USA; 1998.
10. Fajardo EM, Martínez I, Noroña N, Sotolongo Y. Propuesta de ensayo de Identidad del componente polisacárido de la Vacuna antimeningocócica cubana VA-MENGOC-BC® mediante aglutinación de Latex. *VacciMonitor*. 1999; 8(1):2-5.
11. Lowry OH, Rosebrogh NJ, Farr AL, Randall RH. Proteins measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193:265-273.
12. Hem SL. Elimination of aluminum adjuvants. *Vaccine*. 2002; 20: S40 - S43.
13. Achtman M. Comparison of the variable antigens expressed by clone IV-i and subgroup III of *N. meningitidis* serogroup A. *J Infect Dis*. 1992; 165:53-68.

A disadsorption method for HPLC quality control of VA-MENGOC-BC® vaccine components

Abstract

The exhaustive characterization of all components of our vaccine (VA-MENGOC-BC®), is a very important information to the new strategies of production and the best quality of it. Recently some regulatory authorities have recommended to remove thiomersal from vaccines altogether. In this paper we propose a disadsorption method for later chromatographic analysis of vaccine samples with or without thiomersal to know the possible antigenic variation. Three vaccine batches, stored between 2-8 °C, were studied at 0 time using different variants of disadsorption. We have demonstrated that solubilisation of the aluminium hydroxide by HCl to release the native vaccine complex is not possible and that the most efficient disadsorption method for the chromatographic analysis of VA-MENGOC-BC® is the following: the precipitate obtained from 3 mL of vaccine is diluted in 2 mL of phosphate buffer 5mM, pH 7,2-7,3, and allowed stand exactly 2 hours at 4°C. Afterwards, the samples were centrifuged and the supernatant collected. With this method we have obtained a 20% disadsorption of the sample. The result is very useful for showing the advantages of new formulations.

Key words: disadsorption; antigen; vaccine.