

Estudios de estabilidad de vida de estante y en condiciones de estrés de la vacuna antileptospirósica vax-SPIRAL®

Maylen Machado, Tatiana Mahy, Elizabeth Pérez, Martha Noroña, Esther María Fajardo, Luis Izquierdo, Eduardo Álvarez, Bernardo Ortiz, Yaumara Hernández.

Instituto Finlay. Centro de Investigación -Producción de Vacunas. Ave. 27 No.19805. La Lisa. A.P. 1601 C.P. 11600, Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: tmahy@finlay.edu.cu

Los estudios de estabilidad constituyen requisito fundamental para avalar el Registro Médico Sanitario de un nuevo medicamento. Por tal motivo se diseñó y llevó a cabo un proyecto de estudio de estabilidad de vida de estante y en condiciones de estrés térmico a la vacuna antileptospirósica cubana vax-SPIRAL®, donde se evaluaron las propiedades fisicoquímicas y biológicas fundamentales del producto (características organolépticas, pH, concentración de tiomersal, inocuidad inespecífica, potencia y esterilidad), con el objetivo de recomendar las condiciones de almacenamiento que garantizarán su calidad y se propone la fecha de vencimiento. Para esto, parte de las muestras se conservaron a temperatura de 2-8 °C durante 30 meses (vida de estante), y las muestras restantes de cada uno de los lotes en estudio se incubaron a 37 °C por 7 días; 25 °C por 30 días y 45 °C por 3 días (temperaturas de estrés). Se concluyó que la vacuna vax-SPIRAL® puede ser considerada un producto estable para los parámetros evaluados en el presente estudio, siempre que se mantenga a la temperatura de 2-8 °C. Se propone un período de validez de 24 meses para esas condiciones.

Palabras clave: *Leptospira interrogans*, vacuna antileptospirósica, estabilidad, vida de estante, estrés térmico, Cuba.

Introducción

Los estudios de estabilidad permiten conocer la capacidad que tiene un medicamento para conservar a lo largo del tiempo la integridad de sus propiedades físicas, químicas y biológicas necesarias para ejercer en el organismo el efecto para el cual ha sido diseñado. En el caso de los productos de origen biológico, como las vacunas, debido a la naturaleza compleja de su estructura, y a la elevada influencia que los métodos de producción y el almacenamiento pueden tener sobre ella, estos estudios revisten especial importancia. Por ejemplo la vacuna antileptospirósica cubana vax-SPIRAL® está constituida por células enteras, inactivadas, de los serovares *canicola canicola*, *icterohaemorrhagiae copenhageni* y *pomona mozdok* de *Leptospira interrogans*, adsorbidas en gel de hidróxido de aluminio. En productos biológicos los métodos de ensayo influyen en los resultados obtenidos. Además estos productos son particularmente sensibles a los factores ambientales tales como los cambios de temperatura, la oxidación, la luz y el contenido iónico entre otros, por lo que para preservar la actividad biológica y evitar la degradación, se deben mantener en estrictas condiciones de almacenamiento.

Para dichos productos, la información que avala el tiempo y las condiciones de almacenamiento debe partir de estudios de estabilidad realizados a largo plazo en tiempo y condiciones de almacenamiento reales, (estudios de estabilidad de vida de estante). No obstante, los estudios acelerados y de estrés son también necesarios, pues permiten tener un mejor conocimiento del medicamento sometido a condiciones anormales de almacenamiento; estos estudios aportan valiosa información sobre múltiples elementos, muchos de los cuales deben tener su seguimiento en los estudios a largo plazo (1).

Por ejemplo, los estudios de estrés pueden aportar información sobre parámetros de ensayos específicos que constituyen indicadores de la estabilidad, sobre patrones de degradación, así

como del comportamiento del producto ante periodos cortos fuera de las condiciones de almacenamiento establecidas, lo que ayuda en la predicción de sus afectaciones ante fallos durante el embarque o el almacenamiento.

El objetivo del presente trabajo es conocer la estabilidad de la vacuna antileptospirósica trivalente vax-SPIRAL® durante el almacenamiento en condiciones normales (vida de estante) y en condiciones de estrés térmico.

Materiales y Métodos

Se diseñó y se ejecutó un proyecto de estudio de estabilidad, donde se evaluaron las principales propiedades fisicoquímicas y biológicas de la vacuna mediante un estudio de vida de estante y en condiciones de estrés térmico, con el objetivo de obtener información sobre el comportamiento de su estabilidad en el período de tiempo y condiciones recomendadas para su conservación y satisfacer la información solicitada para su Registro Médico Sanitario.

Muestras. Se estudiaron tres lotes de la vacuna antileptospirósica trivalente vax-SPIRAL® producidos en el Instituto Finlay e identificados con los números 6018, 6019 y 6021, con presentación de 10 dosis (5 mL por frasco).

Cepas de reto. Para el ensayo de potencia se emplearon cepas virulentas de *Leptospira interrogans* de los serovares *canicola canicola*, *icterohaemorrhagiae copenhageni* y *pomona mozdok* conservadas apropiadamente (2, 3).

Animales. Se utilizaron ratones OF1 (Oncins France cepa 1) con un peso entre 17 y 22 g, curieles de la línea Hartley con peso de 250 a 350 g y hámsters variedad Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*), con un peso de 45 a 60 g. Todos los animales fueron suministrados por el Centro Nacional para Animales de Laboratorio (CENPALAB), Cuba.

Análisis estadístico. Se hizo un análisis de datos de las muestras en estudio. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) en bloques al azar para comparar los parámetros cuantitativos entre los lotes en estudio. Los factores utilizados para el análisis fueron: 1. Lote, 2. Tiempo. Se utilizó el programa computadorizado *Státística '98 Edition, Release 5.1.*

Diseño de los estudios de estabilidad

Condiciones normales de almacenamiento (vida de estante). Las muestras de cada lote se obtuvieron aleatoriamente y se almacenaron a temperatura de 2 a 8 °C. Los ensayos considerados como tiempo 0 fueron realizados como control de calidad para la liberación del lote y se repitieron cada seis meses durante un período de 30 meses.

Condiciones de estrés térmico. Diferentes muestras de cada uno de los lotes en estudio, conservadas a temperaturas de 2 a 8 °C, fueron seleccionadas aleatoriamente, después de haber transcurrido cuatro meses de la fecha de fabricación y se incubaron a 37 °C por 7 días, 25 °C por 30 días y 45 °C por 3 días; posteriormente fueron sometidas a los diferentes ensayos.

Ensayos físico-químicos

pH. Se utilizó un medidor de pH (RADIOMETER modelo PHM 83, Dinamarca) y soluciones de referencia de pH 4.005 y 7.000 (RADIOMETER analytical, France). El ensayo se consideró satisfactorio si la muestra tuvo un pH de 6,8 a 7,4 [Instituto Finlay. Procedimiento Normalizado de Operación (PNO 12-003). Determinación de pH, 2006].

Concentración de tiomersal. Se empleó el método espectrofotométrico (4). El ensayo se consideró satisfactorio si la concentración era de 0,05-0,2 mg/mL.

Características organolépticas. Se realizó la evaluación sensorial de apariencia (suspensión), color (blanco opalescente) y olor (característico a tiomersal). Dicha evaluación se realizó a cuatro bulbos durante la ejecución de la Determinación de pH.

Ensayos Biológicos

Inocuidad inespecífica. Se utilizaron 2 curieles y 6 ratones por cada lote de vacuna en estudio. Los ratones fueron inoculados con una dosis de 0,5 mL de vacuna por vía intraperitoneal, mientras que los curieles recibieron 1 mL por igual vía. Estos animales fueron observados diariamente y pesados al inicio y al final del ensayo, 7 días posteriores a la inoculación (5, 6). Para considerarse satisfactorio el ensayo, los animales deben observarse en buen estado de salud (5) e incrementar el peso corporal durante el tiempo establecido.

Potencia. Se utilizaron 18 hámsters por cada lote, que se inmunizaron con una dilución 1:5 de la vacuna por vía intramuscular, con una dosis de 0,5 mL. Por cada ensayo se

separaron, además, 15 animales no inmunizados como controles. Después de 14 días los animales (6 inmunizados y 5 controles para cada serovar) fueron retados respectivamente con las tres diferentes cepas virulentas de *Leptospira interrogans*, en inóculos que contenían de 1 000-500 000 DL₅₀. Los animales se observaron durante 14 días y se registraron las muertes ocurridas.

El ensayo se consideró válido cuando la supervivencia de los animales inmunizados y la mortalidad de los controles fue mayor o igual a 80%.

Preparación de la dosis de reto y determinación de la Dosis Letal media (DL₅₀)

Para ello se partió del lote semilla de trabajo de las cepas anteriormente mencionadas; se cultivaron en medio Ellinghausen (2) durante 6 días a 28 °C. Estos cultivos se ajustaron para garantizar 1 000-500 000 DL₅₀ en la dosis de reto (3). Para evaluar la virulencia (en términos de la DL₅₀) de la dosis de reto empleada en cada ensayo, se separaron 25 animales para cada serovar, desde el principio del ensayo, distribuidos en grupos de 5. El día del reto fueron inoculados respectivamente con cada una de cinco diluciones (10⁻² a 10⁻⁶) de la cepa en cuestión, preparadas a partir de la dilución de reto. Los hámsters se observaron durante 14 días y se registraron las muertes. La determinación de la DL₅₀ se realizó mediante el método descrito por Reed y Muench (7).

Ensayo de esterilidad. Se empleó el método de filtración por membrana (8). Se realizó solamente al inicio y al final del estudio.

Resultados y Discusión

El comportamiento de los parámetros físicoquímicos correspondientes a cada uno de los lotes a lo largo del estudio de estabilidad de vida de estante, en condiciones de estrés, se mantuvo dentro de los límites de aceptación, como puede observarse en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de los ensayos de determinación de pH y tiomersal realizados a la vacuna vax-SPIRAL® en el estudio de vida de estante.

Ensayo	Lote	Tiempo de muestreo (meses)					
		0	6	12	18	24	30
pH	6018	7,2	7,2	7,2	7,3	7,2	7,2
	6019	7,2	7,3	7,2	7,3	7,3	7,2
	6021	7,1	7,2	7,2	7,3	7,2	7,2
Tiomersal (mg/mL)	6018	0,09	-	-	0,12	0,1	0,11
	6019	0,08	-	-	0,12	0,13	0,12
	6021	0,09	-	-	0,12	0,12	0,11

- Ensayo no realizado

Tabla 2. Resultados de los ensayos de determinación de pH y tiomersal realizados a la vacuna vax-SPIRAL® en el estudio en condiciones de estrés.

Ensayos	Lotes	Fecha de cada análisis en cada tiempo de estudio			
		T=0 (2-8 °C)	T=3días (45 °C)	T=7 días (37°C)	T=1 mes (25 °C)
pH	6018	7,1	7,1	7,1	7,1
	6019	7,1	7,1	7,1	7,2
	6021	7,1	7,2	7,2	7,1
Tiomersal	6018	0,10	0,09	0,09	-
	6019	0,09	0,09	0,09	-
	6021	0,12	0,11	0,13	-

- Ensayo no realizado

El ensayo de inocuidad inespecífica fue satisfactorio para todos los lotes en todos los tiempos de muestreos y para ambos estudios realizados. Todos los lotes pasaron satisfactoriamente el ensayo de esterilidad.

Los resultados del ensayo de potencia de ambos estudios en términos de la supervivencia de los animales inmunizados se muestran en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

Tabla 3. Resultados del ensayo de potencia de la vacuna vax-SPIRAL®. Muestras almacenadas a temperatura de 2 – 8 °C.

Lote y serovar		Supervivencia (%) de animales inmunizados en los diferentes tiempos de muestreos (meses) para los diferentes serovares de <i>L. interrogans</i>					
		t = 0	t = 6	t = 12	t = 18	t = 24	t = 30
6018	C	100	100	100	100	100	100
	I	100	83	100	100	100	100
	P	100	100	83	100	100	100
6019	C	100	100	100	100	100	100
	I	100	100	100	100	83	83
	P	100	100	100	100	100	100
6021	C	100	100	100	100	100	100
	I	83	100	100	83	100	83
	P	100	100	100	100	100	100

C: *Canicola canicola*

I: *Icterohaemorrhagiae copenhageni*

P: *Pomona mozdok*

Tabla 4. Resultados del ensayo de potencia de la vacuna vax-SPIRAL®. Muestras sometidas a estrés térmico.

Lote y serovar		Supervivencia (%) de animales inmunizados			
		t 0	t 1 semana T 37 °C	t 3 días T 45 °C	t 1 mes T 20-25 °C
6018	C	100	100	100	100
	I	100	100	67	100
	P	100	100	100	100
6019	C	100	100	100	100
	I	100	83	100	67
	P	100	100	100	83
6021	C	100	100	100	100
	I	83	100	83	100
	P	100	100	100	100

C: *Canicola canicola*

I: *Icterohaemorrhagiae copenhageni*

P: *Pomona mozdok*

La Tabla 3 muestra un comportamiento homogéneo de los tres lotes en estudio con relación a la protección contra cada serovar estudiado, ya que en todos los casos esta fue superior al 80%. Sin embargo, hubo cierta disminución en los porcentajes de protección al serovar, *icterohaemorrhagiae copenhageni* para todos los lotes. No obstante, a los 30 meses los por cientos de supervivencia se encontraban por encima del límite mínimo de aceptación. Las

fluctuaciones observadas son aceptadas en los ensayos biológicos, siempre que el por ciento de supervivencia se mantenga por encima del requisito mínimo establecido, aunque se ve una tendencia marcada a ocurrir solamente con este serovar.

Un comportamiento similar a lo anterior en los por cientos de protección al serovar *icterohaemorrhagiae copenhageni*, lo observamos, independientemente de la temperatura de exposición,

en los animales inmunizados con las muestras de los lotes sometidos a condiciones de estrés (Tabla 4). En ese caso hubo un lote cuya potencia no fue apropiada después de estar sometido durante un mes a la temperatura de 20–25 °C. Por tanto, se recomienda no exponer la vacuna a temperaturas superiores a 37 °C por tiempos que excedan a una semana pues esto podría afectar la potencia de la misma.

A pesar de que la virulencia del inóculo (DL₅₀) sobrepasó la dosis mínima de reto establecida para la evaluación de las variantes de muestras de la vacuna contra la leptospirosis (1000-500000 DL₅₀, [Instituto Finlay. Procedimiento Normalizado de Operación (PNO 12-236). Ensayo de Potencia de la vacuna antileptospirosica trivalente vax-SPIRAL®, 2005]), se observaron, por lo general, que los por cientos de supervivencia fueron superiores al 83% en todos los lotes y durante todo el estudio, en contraste con los por cientos de mortalidad de los animales controles que se mantuvieron en valores superiores al 80% (datos no mostrados). Sólo en dos ocasiones y para lotes diferentes en cada caso, se observaron valores de supervivencia de 67% en animales inmunizados con esta vacuna. Esto puede estar relacionado con la influencia negativa que tienen las condiciones de estrés sobre la vacuna.

Conclusiones

- Se considera que la vacuna vax-SPIRAL® es estable cuando se conserva de 2-8 °C hasta 30 meses.
- Se propone un período de validez de 24 meses, siempre que se almacene a la temperatura de 2–8 °C.
- En términos de potencia, característica fundamental en una vacuna, el producto no es estable cuando se expone a temperaturas superiores a 37 °C por tiempos que excedan a una semana. Por lo que consideramos que estos resultados aportan la información requerida acerca de la estabilidad de vax-SPIRAL® para su Registro Médico Sanitario.

Stability studies of shelflife and in stress conditions of Leptospirosis vaccine vax-SPIRAL®

Abstract

Stability studies are mandatory for Registration Applications of a new drug substance. Shelf life and stress temperature stability studies were designed and carried out to the Cuban leptospirosis vaccine vax-SPIRAL®, in which main physico-chemical and biological properties of the product (organoleptic characteristics, pH, thiomersal concentration, unspecific innocuity, potency and sterility) were evaluated in order to recommend storage conditions and expiration date. For this purpose, part of the samples were stored between 2-8 °C for 30 months (shelflife), and the remaining samples from each lot under study were incubated at 37 °C for 7 days; 25 °C for 30 days and 45 °C for 3 days (stress temperatures). It was concluded that vax-SPIRAL® vaccine can be considered a stable product in terms of the parameters evaluated in the present study, provided that it is stored at 2-8 °C. Under those conditions, a validity period of 24 months is proposed.

Keywords: *Leptospira interrogans*, leptospirosis vaccine, stability, shelflife, stress temperature, Cuba.

Agradecimientos

Les agradecemos a Bernardo Ortiz, Eduardo Álvarez, Yaumara Hernández, Iyalili Labrador y Juan Francisco González, por haber brindado su valiosa ayuda en la realización de este estudio.

Referencias

1. Centro para el Control Estatal de los Medicamentos (CECMED). Regulación No. 25-2000. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos biológicos y biotecnológicos. La Habana, Cuba, 2004. (Documento regulatorio).
2. Ellinghausen HC, McCullough WG. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am J Vet Res* 1965;26:45-51.
3. Fajardo EM, Ortiz B, Chávez A, y col. Normalización de la dosis letal 50% de cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en el control de la vacuna antileptospirosica cubana para uso humano. *Rev Cub Med Trop* 1998;50 (1):22-26.
4. World Health Organization, Geneva, BLG/UNDP/82.1. Manual of details of tests required on final vaccines used in the WHO Expanded Program of Immunization. Test for Thiomersal, p. 22, 1982.
5. USP 26 NF-21 (Suplemento 2), Safety test, 2003:1703 (Documento regulatorio).
6. Normas Cubanas. 1389)NC 26-67:91. Medicamentos. Prueba de inocuidad. Métodos de ensayos.
7. Habel KH. Habel test for potency, Annex: Calculating 50% end point dilutions by the method of Reed and Muench. En: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, eds. *Laboratory techniques in rabies*, 4 ed, Geneva:WHO, 1996:371-2.
8. USP 26 NF-21 (Suplemento 2), Sterility Test, 2003; 71:1686-1690, (Documento regulatorio).

Recibido: Diciembre de 2006 Aprobado: Abril de 2007