

# Escalado de Producción de la vacuna cubana antitifoídica de polisacárido Vi de *Salmonella typhi*

Luis Riverón<sup>1</sup>, Alina Miranda<sup>1</sup>, Julio Oramas<sup>1</sup>, Ana Fernández<sup>2</sup>, Enrique Muñoz<sup>1</sup>, Pedro Gil<sup>1</sup>, Luis Izquierdo<sup>1</sup>, Gustavo Sierra<sup>1</sup>, Ramón Barberá<sup>1</sup>, Mario Vieyto<sup>1</sup>, Liliam Nápoles<sup>1</sup>, Johana Díaz<sup>1</sup>, Alina Puig<sup>1</sup>, Xenia Muñoz<sup>1</sup>, Clara Parra<sup>1</sup>, Marixa Hernández<sup>1</sup>, Ana Puig<sup>1</sup>, Ileana Martínez<sup>1</sup>, Marta Noroña<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Facultad de Biología de la Universidad de La Habana, Cuba.

En el Instituto Finlay se viene desarrollando desde el año 1995 un proyecto para producir en Cuba la vacuna antitifoídica de polisacárido Vi. Durante la fase investigativa se obtuvieron todos los parámetros de operación y control en las distintas etapas del proceso, de forma tal que facilitara una caracterización del mismo y nos brindaran las ecuaciones de escala necesarias para obtener los parámetros de operación y control a gran escala. Se garantizó así sistemas geométrica y dinámicamente similares, lográndose resultados semejantes tanto en la fase de investigación como en la fase de producción. Por último, se produjeron tres lotes consecutivos de vacuna final (8001, 8002 y 8003) que cumplieron con las especificaciones de calidad establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para este producto.

**Palabras claves:** Vacuna, antitifoídica, escalado, polisacárido Vi.

## Introducción

La fiebre tifoidea es una enfermedad septicémica que causa significativos niveles de morbilidad y mortalidad, principalmente en países en vías de desarrollo. Se ha estimado que anualmente ocurren alrededor de 33 millones de casos, de los cuales 0,5 millones tienen un desenlace fatal (7). La incidencia de la infección varía desde uno o menos casos por 100 000 habitantes en países como en Estados Unidos, hasta 100 o más casos por 100 000 habitantes en países como Chile, Indonesia y el subcontinente indio, donde se considera una enfermedad severa, y donde de un 12% a un 32% de los casos mueren.

El agente etiológico de la fiebre tifoidea es *Salmonella typhi*; una bacteria encapsulada que fue descubierta en 1880 por C. Eberth y aislada como cultivo puro en 1884 por G. Gaffky.

Los buenos resultados logrados mediante la inmunización con polisacáridos capsulares contra otras enfermedades invasivas causadas también por bacterias encapsuladas, tales como los grupos A y C de *Neisseria meningitidis*, los neumococos y el tipo b de *Haemophilus influenzae*, sentaron las bases para el desarrollo de la vacuna de polisacárido capsular Vi (1), la que ha logrado una eficacia en distintos ensayos de campo entre 70%-75% (8), además de haber presentado una baja reactogenicidad.

En el mundo existen en estos momentos varias tendencias en este sentido que son: i) la vacuna antitifoídica de células enteras inactivadas (con acetona o con calor y fenol) que es altamente reactogénica y en las diferentes pruebas de campo ha alcanzado una eficacia entre 51% y 67% (9), ii) la vacuna oral viva atenuada (7) y iii) la vacuna químicamente definida de polisacárido Vi.

El polisacárido Vi es un homopolímero lineal del ácido 1-4 N-acetil- $\alpha$ -D galactosa minurónico, O-acetilado parcialmente en el carbono 3 (6) que ha encontrado también aplicaciones destacadas al conjugarse covalentemente con una proteína como portadora (4). En estos momentos su empleo se ha extendido también al campo de las vacunas combinadas (10).

El objetivo de este trabajo es mostrar los resultados obtenidos en el escalado realizado a partir de las investigaciones de procesos para la obtención de polisacárido Vi.

## Materiales y Métodos

En la escala investigativa y en la productiva se trabajó con una cepa de *S. typhi* Ty2, donada por la Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay", de la cual se prepararon los lotes de trabajo.

Durante la investigación se obtuvo un medio de cultivo óptimo que maximiza la expresión de polisacárido Vi y luego se utilizó un fermentador CHEMAP de 35 L de capacidad nominal, donde se ajustaron los parámetros fundamentales (pH, aireación, agitación y temperatura) que garantizaran los mejores rendimientos de polisacárido Vi en cultivo sumergido. Además se caracterizó el proceso fermentativo de forma tal que permitiera adoptar el modelo de fermentación deseado y así poder reproducir el mismo a mayor escala.

A escala productiva se utilizaron fermentadores CHEMAP de 300 L de capacidad nominal y se introdujo la utilización de centrifugas continuas para la obtención del complejo policetavión.

El modelo de fermentación, así como los demás parámetros que caracterizan el proceso fermentativo fueron calculados

utilizando el programa de computación "Cinética de Fermentaciones" desarrollado en la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana.

A partir del sobrenadante se realizó la purificación del polisacárido Vi por el método de fenol en frío (1, 4, 5) y fue ajustado este procedimiento para obtener un mayor rendimiento del mismo.

Se tomaron los últimos cinco procesos tanto de la etapa investigativa como de la etapa de producción para realizar las comparaciones.

## Resultados y Discusión

En las Figuras 1 y 2 se observan los perfiles de fermentación obtenidos en cada etapa, donde se evidencia la repetibilidad alcanzada en ambos casos.

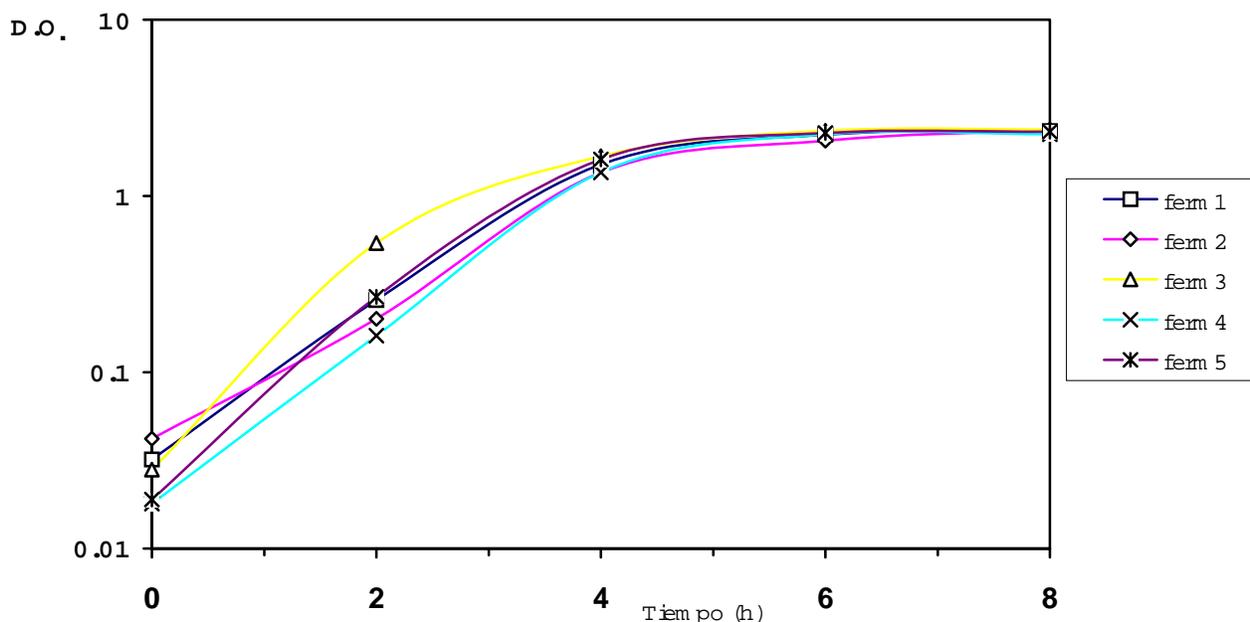
En la Tabla 1 se muestra que la velocidad específica de crecimiento máxima promedio ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) alcanzada tanto en la fase investigativa como en la de producción fue similar, así como los tiempos de duplicación promedio y el modelo de fermentación. Si se tiene en cuenta que los polisacáridos requieren energía para su síntesis, la cinética de formación de este producto es de la llamada no asociada al crecimiento (10,

11) y con el modelo que mejor se correlaciona es con el logístico. Estas tres evidencias avalan el buen criterio de escalado utilizado.

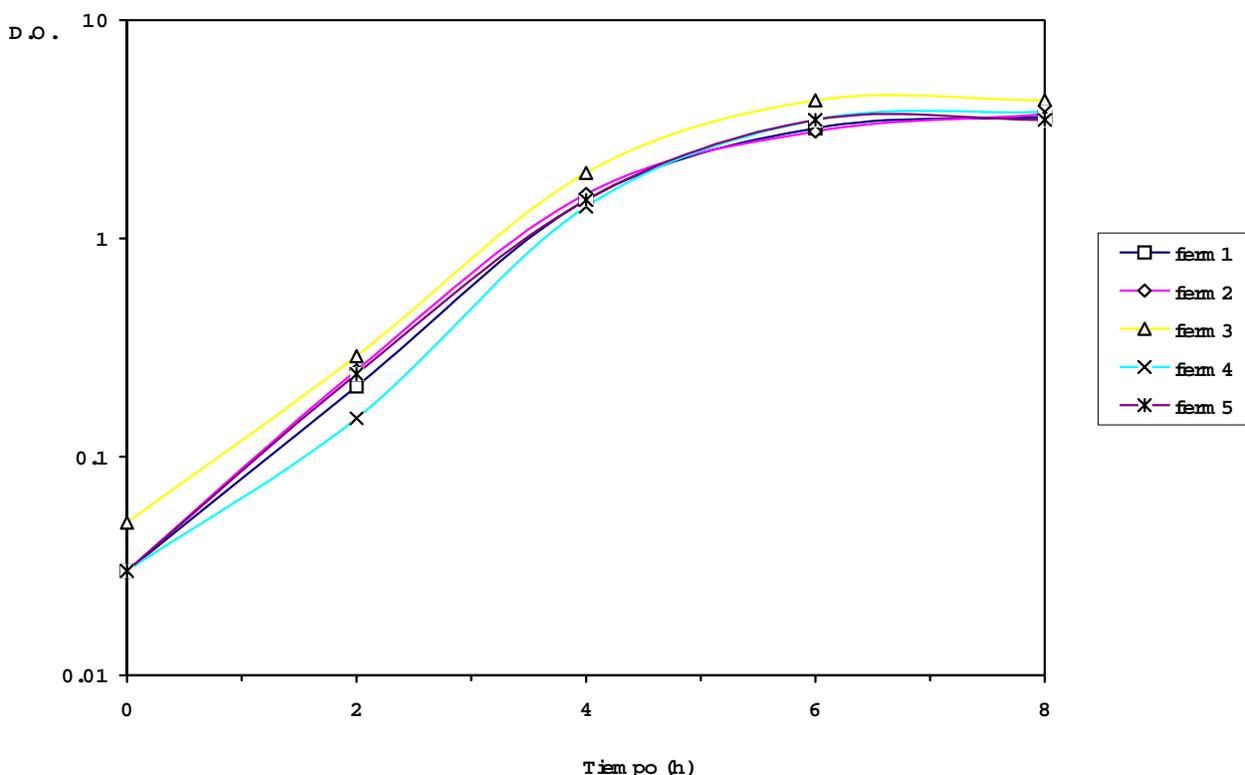
Los rendimientos en mg de polisacárido purificado/L de cultivo promedio (Tabla 2) reflejan una ligera disminución en la fase productiva, porque fue necesario utilizar centrifugas de flujo continuo y se probaron diferentes variantes de centrifugación hasta obtener la que aportó mejores rendimientos. Si se comparan los rendimientos obtenidos en los procesos a escala productiva donde se utilizó la mejor variante de centrifugación (4º y 5º proceso) que fueron de 176,90 mg/L de cultivo y 172,27 mg/L de cultivo respectivamente, siendo el promedio de 174 mg/L de cultivo, con los procesos llevados a cabo en la fase investigativa, queda demostrada la semejanza en cuanto a los rendimientos de polisacárido Vi purificado.

Además, se formularon tres lotes consecutivos de vacuna final (8001, 8002 y 8003) a partir de los lotes de polisacárido Vi 7003, 7004 y 7005, respectivamente, que dieron lugar aproximadamente a 20 000 dosis de vacunas, llenadas en condiciones asépticas en bulbos de 10 dosis y que cumplieron con las regulaciones establecidas para este producto por la OMS (1).

**Figura 1.** Perfil de fermentaciones obtenidas a escala investigativa (20 L de cultivo)



**Figura 2.** Perfil de fermentaciones obtenidas a gran escala  
( 230 L de cultivo )



**Tabla 1.** Principales Características obtenidas en los procesos fermentativos en las diferentes escalas

Fermentación	Velocidad Específica de crecimiento Máxima Promedio (Desviación Promedio)	Tiempo de Duplicación Promedio (Desviación Promedio)	Coefficiente de Determinación Promedio (Desviación Promedio)	Modelo de Fermentación
Etapa Investigativa	1,3868 (0,20584)	0,5184 (0,08088)	0,9858 (0,01472)	Logístico
En La Planta de Producción	1,3118 (0,18936)	0,5418 (0,07144)	0,9800 (0,0216)	Logístico

**Tabla 2.** Principales características de los procesos de purificación obtenidas en las diferentes escalas

Proceso de purificación	Masa en g. de Polisacárido Semipurificado (Desviación Promedio)	Masa en g. de Polisacárido Purificado (Desviación Promedio)	Rendimiento en mg de Polisacárido Purificado/L de Cultivo (Desviación Promedio)
En etapa investigativa	7,135 (2,1450)	3,684 (0,52288)	184,19 (26,144)
En la Planta de Producción	152,01 (67,94)	29,044 (7,4928)	132,014 (34,0568)

## Referencias

1. OMS. *Normas para la vacuna antitifoídica de polisacáridos Vi* (Normas para Sustancias Biológicas N° 48). *Serie de Informes Técnicos*. 1994; (840).
2. Levine M. Modern Vaccines Enteric infection. *The Lancet*. 1990; 335: 958-961.
3. OMS. Normas para la vacuna de polisacáridos meningocócicos (Normas para Sustancias Biológicas N° 23). *Serie de Informes Técnicos* . 1981; (658).
4. Cryz, *et al.* Construction and Characterization of a Vi-Positive Variant of the *Salmonella typhi* Live Oral vaccine Strain Ty21a. *Infection and Immunity*. 1989; 57:3863-3868.
5. Virlogeux-Payant I. The Vi Antigen of *Salmonella typhi*. *Bull. Inst. Pasteur*. 1996; 94:237-250.
6. Lee Fanning W. Typhim Vi Vaccine. *Journal of Travel Medicine*. 1997; 4(1):32-37.
7. Acharya IL, Lowe ChU, Thapa R, Gurubacharya VL, Shrestha MB, Cadoz M, Schulz D, *et al.* Prevention of Typhoid Fever in Nepal with the Vi Capsular Polysaccharide of *Salmonella typhi*. *New England Journal of Medicine*. 1987; 317 (October 29):1101-1104.
8. Ivanoff B. *et al.* Vaccination against typhoid fever: present status. *Bulletin of the World Health Organization*. 1994; 72(6):957-971.
9. Ambrosch F., *et al.* Combined vaccination against yellow fever and typhoid fever: a comparative trial. *Vaccine*. 1994; 12 (7):625-628.
10. Gaden, E.L. Fermentation process kinetics. *Journal of Biochemical Microbiology Technical & Engineering*. 1959; 1:413.
11. Sinclair CG, Cantero D. Fermentation modelling. En: McNeil B y Harvey LM Fermentation a practical approach. Oxford, England: Press Ltd; 1990: 65-112.

## Production Scaling-up of the Cuban Typhoid Vi Polysaccharide Vaccine from *Salmonella typhi*

### Abstract

Since 1995, in our Institute we have been working on a project to produce the typhoid Vi polysaccharide vaccine in Cuba. During the research stage we obtained all the operation and control parameters in the different steps of the process, in this way enabling its characterization and obtaining the necessary equations to define the operation and control parameters for industrial scaling-up. Similar geometrically and dynamically systems were guaranteed, thus achieving similar results for the research stage, as well as for the production one. Also, three consecutive batches of final vaccine (8001, 8002, 8003 ) were produced and they fulfilled the quality specifications established by the World Health Organization ( WHO ) for this product.

**Keywords:** Vaccine, typhoid, scaling-up, Vi polysaccharide.