

Nueva tecnología para la producción a escala industrial del antígeno sintético conjugado contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib).

New technology for the industrial scale production of synthetic antigen conjugate against *Haemophilus influenzae* type b (Hib).

Belinda Díaz Montel, Denia González León

Introducción

El desarrollo de las vacunas preventivas ha permitido el control de las enfermedades infecciosas provocadas por bacterias y virus. *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) es entre las bacterias un importante patógeno humano que por muchos años, antes de la introducción de la vacunación, constituyó el principal responsable de tres enfermedades invasivas de la edad pediátrica: meningitis, neumonía y epiglotitis en todas las regiones del planeta [1-4].

En sentido general los procesos productivos para la obtención de las vacunas preventivas se basan en la fermentación del germen para extraer el antígeno clave o mediante procesos recombinantes que permitan su expresión. En particular para la obtención de las vacunas contra Hib la tecnología tradicional consiste en la obtención del polisacárido Poliriborilribitol fosfato (PRP) purificado a partir de la fermentación de la bacteria [5, 6].

En un inicio se utilizó el polisacárido capsular de la bacteria purificado sin embargo; debido a la naturaleza T-independiente de la respuesta inmune del polisacárido, el PRP es conjugado a una proteína portadora la cual le confiere a esta vacuna características T-dependiente e intensifica la respuesta inmunológica. Entre las proteínas utilizadas se encuentra: el toxoide tetánico, el toxoide diftérico, la variante no tóxica de la toxina diftérica (CRM197) y el complejo proteico de la membrana externa de la bacteria *Neisseria meningitidis* del serogrupo B (OMP) [7, 8]. Con estas preparaciones de antígeno, se obtuvo un nivel protector de anticuerpos y una elevada respuesta inmunológica a partir de los dos meses de edad. Estas vacunas se denominan vacunas conjugadas y han sido reportadas como vacunas de gran eficacia y seguridad [1, 9, 10]. Las recomendaciones para la producción y control de las vacunas contra Hib se encuentran bien establecidas por la Organización Mundial de la Salud [11].

En la vacuna cubana se emplea el PRP conjugado al toxoide tetánico y fue registrada después de complementar los estudios clínicos con el nombre de Quimi-Hib®. A diferencia de las otras vacunas comerciales el PRP se obtiene en un proceso novedoso por síntesis química, lo que la convierte en la primera y hasta el presente la única vacuna registrada en el mundo basada en un proceso químico para la obtención de un antígeno con propósitos vacunales [12-17].

La incidencia de las infecciones producidas por Hib en Cuba disminuyeron significativamente de 1,5 por 100 000 habitantes en 1998 a 0,9 en 2001 después de su introducción en el esquema nacional de vacunación [18-21].

La tecnología para la producción del PRP y el IFA se estableció a escala industrial en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología en el 2003 [12]. En los últimos años ha sido necesario aumentar la producción, producto del incremento de la demanda comercial por la introducción de las vacunas combinadas y su proyección comercial. Esto fue posible sobre la base de la tecnología existente simultaneando las operaciones principalmente: reacciones químicas en reactores de 10 L, extracciones sólido-líquido en mantas de calentamiento de 5 L y aumentando el número de corridas de purificación y el tiempo de secado de los productos por evaporación lo que ha incrementado la manipulación y el riesgo industrial.

No obstante, la demanda comercial se ha incrementado hasta valores de 20 millones de dosis anuales que no se pueden alcanzar en las condiciones de la tecnología establecida, la que también requiere ser ajustada al estándar regulatorio actual, así como disminuir riesgos industriales presentes en este proceso. A la vez, el propio ambiente regulatorio genera restricciones, puesto al tratarse de productos vacunales registrados, la secuencia de la ruta de síntesis y reactivos no deben sufrir modificaciones que impliquen la necesidad de evaluar en humanos el producto que se obtenga bajo una nueva tecnología, incrementando los costos y el tiempo de su comercialización.

El diseño de una nueva tecnología para esta producción consiste en seleccionar y dimensionar el nuevo equipamiento para los procesos de reacción, extracción y evaporación con mayor capacidad de procesamiento y estándar regulatorio y determinar en cada uno de ellos, las mejores condiciones de operación. Además, se debe realizar un estudio de las condiciones de purificación de los intermediarios que permitan aprovechar la capacidad de la resina empleada y las dimensiones de las columnas que hagan más eficiente este proceso. Como principio se mantiene la ruta de síntesis, los reactivos y controles del proceso establecido con el objetivo de garantizar que no se afecte la estructura de cada uno de los intermediarios obtenidos (evaluados por Resonancia Magnética Nuclear) y evitar cambios que tengan impactos en la calidad de la vacuna y en los resultados obtenidos en los ensayos clínicos realizados.

Teniendo en cuenta estos elementos se definió como problema de la investigación:

Problema científico: La tecnología existente para la producción del Poliribosilribitol fosfato (PRP) y el ingrediente farmacéutico activo (IFA de Hib) tiene una capacidad limitada de 10 millones dosis anuales, incluyendo operaciones de alto riesgo industrial y un bajo estándar regulatorio, lo que impide satisfacer la demanda comercial estimada de la vacuna Quimi-Hib® y sus combinaciones.

Objetivo general: Implementar una nueva tecnología para la producción a escala industrial del antígeno sintético conjugado contra Hib.

Métodos de investigación

- Método de la observación científica. Este método se empleó para la definición del problema de investigación, formular la hipótesis, elaborar los objetivos, el marco teórico y el informe de los resultados.
- Método inductivo. Este método se empleó en el diseño de los experimentos y en la conducción de la investigación que arribaron a los principales resultados.
- Método hipotético-deductivo. Este método se empleó en el análisis de los resultados a partir de las demostraciones o inferencias particulares del contraste con la

literatura. Además arribar a conclusiones particulares a partir de la hipótesis formulada.

- Método experimental. Este método se empleó para crear las condiciones de trabajo, demostrar la hipótesis planteada y dar cumplimiento al objetivo general del trabajo.
- Método de la medición: Este método se empleó para evaluar las principales variables del proceso y su relación con los resultados.

Resultados esperados

- La nueva tecnología para la producción del IFA de Hib incrementará la capacidad de producción hasta 20 millones de dosis anuales y se realizarán las reacciones químicas y las separaciones cromatográficas y no cromatográficas con mayor eficiencia, un menor riesgo industrial y un estándar regulatorio superior.
- Los atributos de calidad del PRP de la nueva escala productiva no variarán respecto al proceso previamente establecido, manteniéndose las especificaciones de calidad y evaluando nuevas características del PRP sintético como son el porcentaje de pureza y el tamaño molecular.
- Los atributos de calidad del IFA con la nueva tecnología no variarán respecto al proceso previamente establecido, manteniéndose las especificaciones de calidad, y la consistencia de la producción.
- La nueva tecnología de producción del IFA de Hib incrementará la productividad del proceso con un impacto económico positivo.

Se implementa una nueva tecnología para la producción del antígeno sintético conjugado contra *Haemophilus influenzae* tipo b a una capacidad de 20 millones de dosis anuales con operaciones de menor riesgo industrial, más eficiente y un mayor estándar regulatorio, aprobada por la agencia sanitaria cubana (CECMED, Centro para el Control Estatal de Medicamentos y Equipos Médicos). Esta tecnología constituye hasta el presente la primera y única a nivel mundial para fabricar antígenos sintéticos como componente de las vacunas humanas.

Discusión

En esta sección se debe abordar el análisis detallado de los resultados alcanzados con la implementación de la nueva tecnología, reflexionando sobre los beneficios obtenidos y los retos asociados.

- Comparación entre la capacidad productiva anterior (10 millones de dosis anuales) y la capacidad lograda.
- Evaluación de cómo la tecnología reduce riesgos industriales y mejora el cumplimiento de los estándares regulatorios.
- Revisión de la consistencia y calidad del antígeno producido, considerando las especificaciones previamente establecidas y las nuevas características evaluadas (pureza y tamaño molecular).
- Implicaciones económicas y comerciales del aumento en la productividad y la satisfacción de la demanda.

- Posición de esta tecnología en el contexto internacional, destacando su carácter único como tecnología para la producción de antígenos sintéticos en vacunas humanas.

Conclusiones

Aquí se resumen los puntos más importantes derivados de la investigación y su implementación:

1. La nueva tecnología mejora la eficiencia del proceso productivo, reduce riesgos industriales y cumple con estándares regulatorios superiores.
2. Se comprobó que la calidad del PRP y del IFA producido con la nueva tecnología es consistente con los parámetros establecidos previamente, manteniendo atributos críticos como la pureza y el tamaño molecular.
3. El proceso tuvo un impacto económico positivo debido a la mayor productividad y proyección comercial de la vacuna.
4. Esta tecnología representa una contribución científica y técnica única a nivel mundial, consolidando a Cuba como pionera en la producción de antígenos sintéticos para vacunas humanas.

Bibliografía

1. Peltola, H., Worldwide Haemophilus influenzae type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Rev Clinical Microbiology* 2000. 13: p. 302-317.
2. Agrawal, A., Murphy, T, Haemophilus influenzae infections in the H. influenzae type b conjugate vaccine era. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011. 49.
3. Biere, E., et al., Prevention and Control of Haemophilus influenzae Type b Disease Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), in *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*. 2014, Center for Surveillance, Epidemiology, and Laboratory Services, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), U.S. Department of Health and Human Services: Atlanta. p. 1-2.
4. Khatuntseva, E. and N. Nifantiev, Glycoconjugate Vaccines for Prevention of Haemophilus influenzae Type b Diseases. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2021. 47(1): p. 26-52.
5. Takagi, M., et al., Purification of capsular polysaccharide produced by Haemophilus influenzae type b through a simple, efficient and suitable method for scale-up. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2008. 35(11): p. 1217-1222.
6. Esmaily, F., et al., Comparison of bacterial biomass and PRP production between different isolates of Haemophilus influenza type b (Hib) under different culture conditions. 2011.
7. Adamo, R., Advancing homogeneous antimicrobial glycoconjugate vaccines. *Accounts of chemical research*, 2017. 50(5): p. 1270-1279.

8. Micoli, F., R. Adamo, and P. Costantino, Protein carriers for glycoconjugate vaccines: history, selection criteria, characterization and new trends. *Molecules*, 2018. 23(6): p. 1451.
9. Lindberg, A.A., Glycoprotein conjugate vaccines. *Vaccine*, 1999. 17: p. S28-S36.
10. Micoli, F., et al., Glycoconjugate vaccines: current approaches towards faster vaccine design. *Expert review of vaccines*, 2019. 18(9): p. 881-895.
11. Organization, W.E.C.o.B.S.R.W.H., Recommendations for the production and control of Haemophilus influenzae Type b Conjugate Vaccines. 2000.
12. CECMED, “Registro sanitario vacuna QuimiHib®”, C.p.e.C.E.d.l. Medicamentos, Editor. 2003: Cuba.
13. Verez-Bencomo, V., et al., A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against Haemophilus influenzae type b. *Science*, 2004. 305: p. 522–524.
14. Verez, V., V. Guillermo, and R. Roy, Oligosacáridos derivados de ribosa-ribitol-fosfato y vacunas que los contienen. 2006: ESPAÑA. p. 26.
15. Seeberger, P.H., Discovery of Semi-and Fully-Synthetic Carbohydrate Vaccines Against Bacterial Infections Using a Medicinal Chemistry Approach: Focus Review. *Chemical Reviews*, 2021. 121(7): p. 3598-3626.
16. Baek, J.Y., et al., A modular synthetic route to size-defined immunogenic Haemophilus influenzae b antigens is key to the identification of an octasaccharide lead vaccine candidate. *Chemical science*, 2018. 9(5): p. 1279-1288.
17. Mettu, R., C.-Y. Chen, and C.-Y. Wu, Synthetic carbohydrate-based vaccines: challenges and opportunities. *Journal of Biomedical Science*, 2020. 27(1): p. 1-22.
18. Toraño, G., et al., Haemophilus influenzae: Caracterización de aislamientos recuperados de enfermedades invasivas en Cuba durante el período 2008-2011, in *VacciMonitor*. 2012. p. 26-31.
19. Dickinson, F.O., et al., Impacto de la vacunación contra Haemophilus influenzae tipo b en Cuba. *Rev. Panamericana Salud Pública*, 2001. 10: p. 169-173.
20. Battle Almodóvar, M.d.C. and F.O. Dickinson Meneses, Historia de la meningitis bacteriana en Cuba: siglo XIX al XXI. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 2019. 18(4): p. 579-592.
21. Ambrón, L.L., et al., Experiencia cubana en inmunización, 1962–2016. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 2018. 42: p. e34.