

Candidato vacunal heptavalente conjugado contra los neumococos: de la hipótesis de investigación a la evaluación clínica fase-I.

Autores Principales: Lic. Yury Valdés Balbín¹, Dr. Vicente Vérez Bencomo¹

Otros Autores: Dra. Violeta Fernández¹, Lic. Darielys Santana¹, Dra. Dagmar García Rivera¹, Dr. Janoi Chang¹, Ing Annette Villar¹, MsC Ubel Ramírez¹, Lic. Laura Martha Rodríguez Noda¹, MsC Jessy Pedroso Fernández¹, Lic. Beatriz Paredes Moreno¹, Dr. Carlos Dotres Martínez², Dr. Rinaldo Puga Gómez², Ing. Domingo González³, MsC. Humberto González Rodríguez³

Colaboradores: Dra. Nadezhda González¹, Dr. José Cremata⁴, MsC. Mayelín Miraba¹, MsC. Janet Lora¹, MsC Bertha Guillén¹, MsC Yohanna Serrano¹, Lic. Amarilis Pérez¹, Dr. Raine Garrido¹, Lic. Félix Cardoso¹, Dra Sonia Pérez⁵, Dr. Carlos A. González⁵, MsC, Jean Pierre Soubal¹, Lic. Marisel Martínez¹, MsC. Dainés Mariño¹, MsC Yilian Luque¹, Lic. Pablo Cabrera¹, Dr. Ramón Barberá³, Dr. Daniel Cardoso³, Dra. Concepción Campa³, Lic. Marixa Hernández³, MsC Yana González⁶

Filiaciones:

¹ Centro de Química Biomolecular (CQB).

² Hospital Pediátrico Juan Manuel Márquez.

³ Instituto Finlay

⁴ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

⁵ Centro Nacional de Toxicología.

⁶ Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPA-LAB)

Autor para la correspondencia: Centro de Química Biomolecular
BioCubaFarma, Ave 21 esq. 200, Atabey, La Habana.
Tel: 2713994. E-mail: dagarcia@finlay.edu.cu

1. Resumen

Las vacunas conjugadas constituyen la mejor alternativa para la protección de los niños menores de 5 años contra las enfermedades causadas por *Streptococcus pneumoniae*, sin embargo, el desarrollo de una vacuna multivalente conjugada presenta una elevada complejidad científica y tecnológica, desde el propio diseño del producto hasta la fase de evaluación clínica por ser las poblaciones pediátricas la diana de esta vacunación. La presente propuesta de premio a la ACC describe el desarrollo en Cuba de un candidato vacunal conjugado heptavalente contra los neumococos (VCN7), basado en la conjugación individual de los polisacáridos capsulares de los siete serotipos (1, 5, 6B, 14, 18C, 19F, 23F) de *S. pneumoniae* a la proteína portadora toxoide tetánico. El trabajo resume la investigación-desarrollo realizada entre los años 2006-2014, desde la obtención de los polisacáridos capsulares (PsC), el establecimiento de los métodos de conjugación, adyuvación y formulación de la vacuna, el desarrollo de la batería analítica que garantiza los controles de procesos y de calidad, el desarrollo de una metodología evaluativa preclínica que demuestra la inmunogenicidad y seguridad del producto, así como tres ensayos clínicos fase I que aportan evidencias de la seguridad del candidato vacunal en población adulta y pediátrica y permiten demostrar el concepto de que la conjugación es capaz de activar el sistema inmune contra los PsC.

Como resultados de la fase de investigación-desarrollo de este proyecto, se establecieron los procedimientos de fermentación y purificación de los PsC, así como conjugación/adyuvación/formulación del candidato vacunal, se establecieron y validaron las técnicas analíticas requeridas para el control de calidad de todas las etapas, se demostró que VCN7 es inmunogénica y segura en animales de laboratorio, se realizó el desarrollo tecnológico que ha permitido la producción de 6 lotes de VCN7, para los cuales se han demostrado 2 años de estabilidad. Se han realizado 3 ensayos clínicos fase I en jóvenes sanos de 18-35 años, niños sanos de 4-5 años y lactantes sanos de 7-11 meses, aportando evidencias de que el candidato vacunal es seguro, al no reportarse ningún evento adverso grave relacionado con su administración, y ha aportado los primeros resultados de inmunogenicidad en humanos, demostrando el concepto inicial de desarrollo del producto, que es convertir a los PsC de la bacteria en inmunógenos mediante la conjugación.

El proyecto ha sido gerenciado institucionalmente de forma tal que ha permitido avanzar en cada una de las fases de investigación-desarrollo teniendo en cuenta la complejidad de un candidato vacunal multivalente, haciendo efec-

tiva la interacción de las áreas de Investigación-Desarrollo-Calidad-Clínica y garantizando el más alto estándar en cada etapa, según se establece por la OMS para este tipo de vacunas conjugadas. En conclusiones, se ha desarrollado una tecnología de producción del candidato vacunal conjugado heptavalente contra los neumococos y la novedad científica está sustentada en los resultados de investigación básica, preclínica y de desarrollo tecnológico, con aportes al conocimiento en esta temática.

El trabajo se encuentra avalado por el Grupo Nacional de Pediatría, la Sociedad Cubana de Pediatría y el Programa Materno Infantil del MINSAP. Los resultados han sido publicados en la revista *Vaccine* (2 artículos), *Medic Review* (1 artículo) y en revistas nacionales (3 artículos). Ha sido parte de una tesis de doctorado y cuatro tesis de Maestrías, varias tesis de diploma de estudiantes de licenciatura en química, farmacia, bioquímica, y se ha presentado en numerosos eventos nacionales e internacionales, incluyendo las 3 últimas ediciones del *International Symposium of Pneumococcal and Pneumococci Diseases*, el evento más importante de la temática a nivel mundial.

2. Comunicación Corta

2.1. Introducción

Las infecciones causadas por la bacteria *Streptococcus pneumoniae* constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad por una enfermedad infecciosa potencialmente evitable por vacunación, siendo el principal agente causal de neumonía, sepsis y meningitis a nivel mundial. Este conjunto de enfermedades provocan más del 25 % de los diez millones de muertes que ocurren anualmente en niños menores de cinco años de edad[1]. Existen más de 90 serotipos de la bacteria de acuerdo a la estructura del polisacárido capsular, su principal factor de virulencia. La vacunación antineumocócica es la medida más eficaz para la prevención de estas enfermedades, pero tiene la complejidad de ser serotipo específico, lo que complejiza el diseño de cualquier candidato vacunal porque se requieren vacunas multivalentes.

La conjugación de los PsC a una proteína portadora es la forma más eficaz para la protección de la población infantil contra este patógeno, pues convierten al polisacárido capsular de un antígeno timo-independiente a un antígeno timo-dependiente. Con las vacunas conjugadas se logra que el sistema inmune de los niños menores de cinco años genere una respuesta inmune contra

la bacteria potente, específica, protectora y duradera en el tiempo[2]. Existen en el mundo tres vacunas antineumocóccicas conjugadas, Prevenar 7® y 13® de la compañía Wyeth Lederle-Pfizer y Synflorix® de 10 valencias de la compañía GSK. Estas vacunas han demostrado una elevada eficacia en la prevención de las enfermedades neumocóccicas invasivas y han tenido un gran impacto en salud en los países donde se han introducido[3, 4]. Sin embargo, a pesar que la OMS recomienda como una prioridad la introducción de esta vacunación en los esquemas nacionales de inmunización, el elevado precio de estas vacunas hace que solo el 31 % de los niños del mundo la reciban[5]. Estos datos reflejan la necesidad de incorporar a nuevos productores de vacunas conjugadas a pesar de la alta complejidad científico–tecnológica que encierran estos proyectos.

El esquema nacional de vacunación en Cuba es uno de los principales logros de la salud pública, garantizando a nuestra infancia la inmunización contra 13 enfermedades, pero no ha sido posible la vacunación contra neumococos, porque el alto precio de estos productos a nivel mundial lo hace insostenible para nuestro país.

En el año 2006, el Centro de Química Biomolecular enfoca su investigación en un proyecto para el desarrollo de una vacuna antineumocóccica conjugada para la infancia con premisas fundamentales: la necesidad de una vacuna sostenible para Cuba, con urgencia y prioridad porque cada día enferman y mueren niños por este patógeno, y el hecho de que sería un producto de elevada complejidad, probablemente el más complejo de las vacunas profilácticas que se han desarrollado en el país.

2.2. Discusión de los resultados

El desarrollo de una vacuna multivalente conjugada presenta una elevada complejidad científica y tecnológica, desde el propio diseño del producto; donde se tienen en cuenta varios elementos como la selección de los serotipos a incluir en la vacuna, la talla molecular de los PsC, la selección de la proteína portadora, el método de conjugación, los procedimientos analíticos y biológicos para la evaluación, así como la fase de evaluación clínica por ser las poblaciones pediátricas la diana de esta vacunación. A continuación se resumen los principales resultados de las etapas fundamentales de este proyecto.

Definición de la composición antigénica de la vacuna: Dada la complejidad de que existen más de 90 serotipos de neumococo, la definición de la composición vacunal es un elemento clave en el impacto en salud que se espera con el producto. Este candidato vacunal fue diseñado para ser usado en Cuba y otros países con la mayor relación costo-efectividad posible. A diferencia de las otras vacunas de 10 y 13 valencias donde algunos serotipos aportan muy poco a la protección porque su circulación es baja pero le incrementan el precio, el candidato cubano mantuvo en siete el número de serotipos pero seleccionó los de mayor prevalencia a nivel mundial, con los cuales se logra una cobertura superior al 70 % y se puede avanzar en menos tiempo en el desarrollo del producto. El candidato vacunal cubano incluye los serotipos 1, 5, 6B, 14, 18C, 19F y 23F, serotipos seleccionados a partir de los estudios de incidencia y prevalencia nacionales y globales así como por las recomendaciones sobre la composición de nuevos candidatos para introducir en el mercado mundial realizados por la OMS[6, 7]. A continuación se describen los principales resultados de cada una de las etapas del proyecto.

Obtención de los PsC y la proteína portadora: Los PsC purificados de los serotipos 1, 5, 6B, 14, 18C, 19F y 23F de *S. pneumoniae* y la anatoxina tetánica purificada son obtenidos por el Instituto Finlay y suministrados al CQB. Los PsC se obtienen por fermentación a partir de cepas debidamente caracterizadas y controladas de los serotipos correspondientes, seguido de etapas de captura y procesos de purificación. El proceso de producción de los PsC culmina con el control de calidad de su identidad, estructura, tamaño molecular, contenido de grupos funcionales, para lo cual fue necesario desarrollar una batería de técnicas analíticas basada fundamentalmente en la Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Las especificaciones de calidad establecidas para los PsC están acorde con las recomendadas por las guías de la OMS[8]. La proteína anatoxina tetánica (TT) es producida en la planta II del Instituto FINLAY, el proceso de obtención consiste en tres etapas fundamentales: fermentación, destoxificación y purificación, cumpliendo con los requerimientos de BPF establecidos por la OMS.

Conjugación de los PsC a la proteína portadora TT: Los conjugados de los PsC a la proteína portadora constituyen los Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA) en este candidato vacunal. El proceso de conjugación cuenta de tres etapas fundamentales: 1) fragmentación química y activación de los PsC por oxidación peryódica según corresponda a cada serotipo; 2) conjugación

a la proteína portadora por aminación reductiva; 3) procesos de purificación por ultrafiltración y filtración esterilizante. Esta etapa de conjugación ha sido una de las más complejas en el desarrollo de este candidato vacunal, debido a la diversidad estructural en las moléculas de PsC por la presencia de sustituyentes, cadenas laterales, grupos funcionales, que pueden afectarse durante la modificación/conjugación. Por tanto, fue preciso establecer, para cada estructura polisacáridica, condiciones de fragmentación y activación que favorezcan la conjugación de manera eficiente, pero sin afectar los epítopes de la estructura del PsC que son relevantes en la inducción de la respuesta inmune protectora. Varios de estos resultados se encuentran publicados en las revistas *Vaccinmonitor*, *Biotechnología Aplicada* y *Revista CINC de Ciencias Químicas*.

Un ejemplo relevante es el caso del serotipo 18C, el cual tiene en su estructura grupos acetatos y glicerol-fosfatos, pero no existían reportes en la literatura de la relevancia de estos grupos para inducir una respuesta inmune protectora. En este trabajo demostramos que los grupos O-acetilos son irrelevantes para la inducción de una respuesta inmune protectora contra 18C, pero que los grupos glicerol-fosfatos deben ser conservados en la estructura del antígeno vacunal. Por tanto, fue preciso establecer condiciones de fragmentación, activación y conjugación del PsC 18C que conservaran el glicerol-fosfato en su estructura. Este fue el primer reporte en la literatura de la relevancia de estos grupos en la inmunogenicidad de conjugados de 18C, y constituye una de las novedades científicas de esta investigación, la cual fue publicada en la revista *Vaccine*.

En resumen, se ha desarrollado una tecnología BPF para la producción de los conjugados monovalentes y se han producido varios lotes de IFA durante la etapa de desarrollo. Los ensayos de control de calidad incluyen análisis como identidad, esterilidad, distribución de talla molecular, relación carbohidrato/proteína, contenido de proteína y carbohidrato no enlazados, propiedades organolépticas, pH, toxicidad específica del TT y contenido de endotoxinas, para lo cual fue preciso desarrollar y validar las técnicas analíticas correspondientes.

Adyuvación en fosfato de aluminio y formulación: El proceso de formulación de esta vacuna es muy complejo, porque requiere asegurar una combinación precisa de los 7 componentes y la adsorción en fosfato de aluminio. El paso de formulación consiste en tres operaciones principales: a) la combinación de los siete conjugados monovalentes; b) la adyuvación de la

mezcla en fosfato de aluminio producido "in house", c) la dilución final que garantiza la dosis de cada conjugado. Los ensayos de control de calidad garantizan la identidad de cada serotipo, la esterilidad, el pH, el contenido de endotoxina, el volumen por dosis, el contenido de aluminio, la concentración de cada serotipo conjugado en la combinado, inmunogenicidad en conejos, entre otras especificaciones de calidad, para lo cual fue preciso desarrollar y validar las técnicas analíticas correspondientes, siguiendo las recomendaciones de la OMS (8). La formulación vacunal contiene 2 μg de los PsC 1, 5, 14, 18C, 19F y 23 F conjugados a TT, 4 μg del PsC 6B conjugado a TT, 0.5 mg de Al₃₊ como fosfato de aluminio, cloruro de sodio como excipiente y tiomersal como preservante. En resumen, se ha establecido una producción bajo BPF para la obtención de los PsC, los conjugados o IFAs, el adyuvante fosfato de aluminio y la formulación final del candidato vacunal.

En resumen, se ha establecido un sistema productivo bajo condiciones de BPF para la obtención de los PsC, los conjugados o IFAs, el adyuvante fosfato de aluminio y la formulación final del candidato vacunal.

Inmunogenicidad y seguridad preclínica: La estrategia desarrollada para la evaluación preclínica de VCN7 se basó en la demostración de la inmunogenicidad y seguridad de la formulación, siguiendo las regulaciones nacionales e internacionales para la evaluación pre-clínica y toxicológica de vacunas. Los métodos serológicos para evaluar la inmunogenicidad de las vacunas conjugadas contra neumococo incluyen dos pruebas críticas: la cuantificación de IgG anti-PsC y la actividad opsonofagocítica de los anticuerpos inducidos por la vacunación. Adicionalmente, otras determinaciones como las clases y subclases de anticuerpos, la memoria inmunológica, la avidéz y afinidad de los anticuerpos por el PsC complementan la información acerca de los mecanismos de respuesta inmune inducidos por la vacunación[9].

Durante la evaluación pre-clínica de la inmunogenicidad del candidato VCN7, se demostró en conejos y ratones la inducción de anticuerpos específicos por cada PsC y con actividad opsonofagocítica contra la bacteria del serotipo correspondiente. Adicionalmente, se demostró en conejos la inducción de memoria inmunológica e inmunidad mucosal. En las evaluaciones toxicológicas pre-clínicas VCN7 demostró ser segura. El estudio de toxicidad aguda no mostró efecto tóxico en ratas Cenp:SPRD, culminando con una supervivencia del 100 %. No se observaron signos clínicos tóxicos. El comportamiento del peso corporal no mostró diferencias significativas entre grupos y sexos. No se produjeron variaciones en la temperatura rectal relacionadas con la adminis-

tración de la vacuna. No se detectaron alteraciones anatomopatológicas sobre los órganos parenquimatosos. El estudio a dosis repetidas también demostró que el candidato vacunal es seguro, causando alteraciones en el sitio de la administración propias del adyuvante de aluminio utilizado.

Las evidencias preclínicas de inmunogenicidad y seguridad fueron suficientes para avanzar a la fase de ensayos clínicos del candidato vacunal, y permitieron demostrar la hipótesis de investigación del candidato vacunal, que es convertir a los PsC de la bacteria en inmunógenos mediante la conjugación.

Evaluación clínica Fase I: En el período 2012-2014 se diseñaron y ejecutaron 3 ensayos clínicos Fase I con el objetivo de demostrar la seguridad del candidato vacunal en diferentes grupos de edades. En el año 2012, concluyó un ensayo clínico monocéntrico, paralelo, controlado y aleatorizado en 40 adultos sanos entre 18 y 35 años, que tuvo como objetivo evaluar la seguridad de la VCN7 y explorar la inmunogenicidad de la misma. El candidato vacunal VCN7 demostró ser seguro después de una dosis en este grupo etario y activó una respuesta inmune contra los siete antígenos en forma de anticuerpos IgG opsonizantes.. Estos resultados fueron las primeras evidencias de inmunogenicidad de este candidato vacunal en humanos y se publicaron en la revista *Medic Review*.

Una vez demostrada la seguridad en adultos, se iniciaron los ensayos clínicos en poblaciones pediátricas. Se realizó un ensayo clínico Fase I monocéntrico, paralelo, controlado y aleatorizado, en niños de 4-5 años (1 dosis) de edad y posteriormente en lactantes de 7-8 meses (3 dosis). Los resultados de la etapa de evaluación clínica en niños preescolares demostraron que una dosis del candidato VCN7 en niños sanos es segura, al no reportarse eventos adversos graves relacionados con su inmunización. No se reportaron eventos adversos esperados locales ni sistémicos severos. El dolor fue el evento adverso esperado de mayor incidencia. El perfil de seguridad mostrado por el candidato vacunal VCN7 fue similar a la vacuna control Synflorix. La exploración preliminar de la inmunogenicidad de este candidato vacunal en niños preescolares evidenció que se induce una respuesta inmunológica específica para cada serotipo vacunal, demostrándose que todos los sujetos vacunados con VCN7 incrementaron significativamente las concentraciones de IgG para los siete serotipos, y se encontraron evidencias preliminares de una posible crossprotección de los serotipos 6B y 19F contra los serotipos 6A y 19A que no están contenidos en la vacuna. Estos resultados fueron las primeras evidencias de seguridad e inmunogenicidad en población pediátrica, permitieron

avanzar a la clínica en lactantes, y fueron publicados en la revista *Vaccine*. El tercer ensayo clínico Fase I fue realizado en lactantes de 7 meses de edad, con tres inmunizaciones (7, 8, 11 meses). No se registraron eventos adversos graves relacionados con el candidato vacunal, predominaron los eventos adversos locales como la induración, el dolor y el eritema. El perfil de seguridad de la vacuna fue similar a la vacuna control Synflorix. Se demostró por primera vez en lactantes, que el candidato vacunal es inmunogénico contra los 7 serotipos vacunales y se encontraron nuevamente evidencias preliminares de una posible crossprotección contra los serotipos 6A y 19A. Estos tres ensayos clínicos fase I, si bien son solo el inicio de la fase de investigación clínica de este candidato vacunal, permitieron demostrar el concepto inicial de desarrollo del producto, que es convertir a los PsC de la bacteria en inmunógenos capaces de inducir una respuesta inmune específica y protectora contra la bacteria, permitiendo así avanzar a fases superiores de ensayos clínicos hasta lograr el registro y la introducción en el esquema nacional de inmunización.

Conclusiones En el presente trabajo se resume la investigación-desarrollo de un complejo candidato vacunal conjugado heptavalente contra los neumococos. Se establecieron los procedimientos de conjugación, se desarrollaron las tecnologías BPF para la obtención de los siete IFAs, el adyuvante y la formulación vacunal, se establecieron las técnicas analíticas para el control de calidad de cada etapa y se demostró en animales de experimentación la inmunogenicidad y seguridad del producto. En ensayos clínicos Fase I se evidenció la seguridad e inmunogenicidad preliminar en adultos jóvenes, niños y lactantes, resultados que demuestran el concepto de la investigación-desarrollo del producto confirmando que la tecnología de producción establecida garantiza un producto de calidad y que cumple el concepto de inducir respuesta inmunológica contra los PsC, y constituyen la base para avanzar a fases superiores de ensayos clínicos.

Referencias

- [1] Isaacman, D.J. et al. 2010. *Int J Infect Dis* 14:e197-209
- [2] Avci, F.Y. et al. 2010. *Annu Rev Immunol* 28:107-130
- [3] Black S et al. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19(3):187-95.
- [4] Redelings MD et al. 2005. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2005; 159(2):195-6.
- [5] World Health Organization. Pneumococcal vaccines; WHO position paper—2012. *Wkly Epidemiol Rec* 2012;87:129–44
- [6] Johnson HL et al. *PLoS Med* 2010;7(10): pii:e1000348
- [7] GSP Summary Report (Stage 1;Version 1) for SAGE meeting November 6-8, 2007
- [8] WHO Technical Report Series No. 977, 2013. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of pneumococcal conjugate vaccines.
- [9] WHO/Health Canada Consultation on Serological Criteria for Evaluation and Licensing of New Pneumococcal Vaccines. Meeting Report. 7-8 July 2008