

Formulaciones para lograr la estabilidad de un preparado vacunal contra el sarampión

Miladys García Torres, Aurora Gutiérrez García,* Odalys Guerra Quintana, María Teresa Carballo López, Tomás Moreira Hernández,* Olga Echemendía Arana, Raiza Monteagudo, Víctor Zamora* y Caridad Urra Villavicencio.*

Instituto Finlay, Avenida 27 No. 19805, La Lisa, Apartado Postal 16017, Ciudad de La Habana. *Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 2 de noviembre de 1999. Aceptado: 16 de junio del 2000.

Palabras clave: virus, sarampión, liofilización, estabilidad, vacunal, estabilizadores, citotoxicidad.

Key words: measles, virus, vaccine, stabilizer, stability, lyophilized (freeze-dried), lyophilization (freeze-drying), cytotoxic effect.

RESUMEN. La forma liofilizada resulta la vía más estable para conservar por largos períodos preparados vacunales contra el sarampión. Sin embargo, para vencer el estrés que el proceso representa sobre las partículas virales, se requiere la utilización de aditivos adecuados. Los trabajos publicados al respecto, reportan el empleo de estabilizadores como el glutamato de sodio, la gelatina hidrolizada, el sorbitol y algunos azúcares conjuntamente con macromoléculas que facilitan la liofilización. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de ocho formulaciones sobre la estabilidad del preparado durante la liofilización, así como el efecto citotóxico de los aditivos sobre las células Vero. La formulación compuesta por gelatina 0,5 % + dextrana 0,3 % + lactosa 4 % + glutamato de sodio 0,05 % + sorbitol 1,5 % reúne las características de presentar buen aspecto y protección adecuada. La presencia de dextrana y gelatina, acompañadas de protectores como la lactosa, el sorbitol y el glutamato de sodio, confirieron buena protección al virus ante el estrés del proceso de liofilización. Se observó efecto citotóxico sobre las células Vero en las formulaciones de gelatina 2,5 % + sorbitol 5 %, gelatina 2,5 % + dextrana 2 % + sorbitol 5 %, dextrana 4 %, lactosa 4 % + peptona 5 %. En el resto de las formulaciones a pesar de estar presente alguno de los compuestos anteriores, no se detectó efecto tóxico, probablemente debido a que se encontraban en menor proporción.

ABSTRACT. The freeze drying technique is usually employed to prepare vaccines in such a way that maximum infectivity and immunological potency are obtained, but the process may lead to loss of activity unless additives are present. Such additives include proteinaceous material such as gelatin and a variety of carbohydrates although the selection and concentrations of these are to some extent arbitrary. The purpose of the work reported here was to study the effect of eight formulations (Formulation 1: gelatin 2.5 % + sorbitol 5 %, Formulation 2: gelatin 2.5 % + dextran 2 % + sorbitol 5 %, Formulation 3: dextran 2 % + glycine 2 %, Formulation 4: dextran 4 %, Formulation 5: saccharose 2.5 % + sorbitol 5 %, Formulation 6: lactose 4 % + peptone 5 %, Formulation 7: gelatin 2 % + sucrose 5 % + sodium glutamate 0.1 % + sorbitol 2 %, Formulation 8: gelatin 0.5 % + dextran 0.3 % + lactose 4 % + sodium glutamate 0.05 % + sorbitol 1.5 %) on measles virus stability during freeze drying process and its cytotoxic effect on Vero cells was studied. The results indicated that a formulation containing dextran, lactose, sodium glutamate, gelatin and sorbitol comprising a medium 199 for cell culture, used under conditions of this study, is an effective stabilizer in the preparations of freeze dried measles virus suspensions. The cytotoxic effect on Vero cells was observed when dextran, peptone and Sorbitol were present at specific ratios of concentration. When the additive ratios were modified the toxic effect disappeared. The product aspect and high glass transition did not always correspond with the potency preservation. The similar water adsorption was observed in all cases.

INTRODUCCION

Debido a la inestabilidad térmica de los preparados vacunales, es necesario el empleo de agentes estabilizantes. Dentro de las sustancias de uso más frecuente para este fin se encuentran: la gelatina hidrolizada, carbohidratos como la lactosa y sacarosa, alcoholes polihidroxilados como el sorbitol, aminoácidos, albúmina sérica humana y bovina, caseína hidrolizada, glutamato de sodio, entre otros.¹⁻³

La técnica de deshidratación más frecuentemente empleada para los virus es la liofilización. Sin embargo la efectividad de esta depende en gran medida del medio estabilizante empleado.⁴⁻⁷

Los cultivos celulares son ampliamente utilizados en la Virología como soporte para que ocurra la multiplicación viral, produciendo poco a poco cambios morfológicos en la monocapa celular que evidencian la replicación del virus. Por esta razón, es necesario contar con células de aspecto definido que brinden resultados confiables.⁸

Las vacunas virales están constituidas por virus y otras sustancias que les brindan estabilidad. Estas sustancias estabilizadoras como son la gelatina, la peptona, la sacarosa, la lactosa, la dextrana y los aminoácidos, protegen al virus de los cambios bruscos que tienen lugar durante la congelación y el secado, pero estas sustancias pueden ejercer efecto tóxico sobre los cultivos celulares utilizados en la determinación de la

potencia de la vacuna, lo que podría conducir a obtener resultados falsos positivos.⁹

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar algunos estabilizadores, estudiar sus características termofísicas, así como su toxicidad sobre las células VERO, para la preparación de una vacuna antisarampionosa viva atenuada y liofilizada en Cuba.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de la suspensión viral

Se fabricaron dos lotes de un preparado vacunal antisarampionoso, empleando células Vero como sustrato celular y la cepa vacunal Leningrado 16 de procedencia rusa. Las células se sembraron en frascos Roux (175 cm³) a razón de ochenta millones de células por frasco en medio 199 Base Hanks con 5 % de suero fetal de ternera (SFT) y sulfato de neomicina (SN) como antibiótico. Después de formarse la monocapa celular, se inoculó 1,5 mL de la suspensión viral con una multiplicidad de infección de 1:100 y se incubaron a (36 ± 1) °C. Al segundo día, los frascos se lavaron con regulador PBS para eliminar el suero. Una vez aparecido el efecto citopático se realizaron las cosechas y su mezcla fue clarificada por centrifugación refrigerada a 1 500 r/min durante 15 min y posteriormente conservada a -20 °C hasta su uso.

Formulaciones empleadas

1. Gelatina 2,5 % + sorbitol 5 %.
2. Gelatina 2,5 % + dextrana 2 % + sorbitol 5 %.
3. Dextrana 2 % + glicina 2 %.
4. Dextrana 4 %.
5. Sacarosa 2,5 % + sorbitol 5 %.
6. Lactosa 4 % + peptona 5 %.
7. Gelatina 2 % + sacarosa 5 % + glutamato de sodio 0,1 % + sorbitol 2 %.
8. Gelatina 0,5 % + dextrana 0,3 % + lactosa 4 % + glutamato de sodio 0,05 % + sorbitol 1,5 %.

Cada estabilizador fue preparado en agua destilada, ajustando el pH de 7 a 7,2. Fueron esterilizados por filtración todos los estabilizadores excepto la peptona, la cual fue tratada en autoclave a 121 °C y 101 325 Pa (1 atm) por 15 min. Una vez preparados éstos, fueron mezclados en las proporciones correspondientes de estabilizador y suspensión viral para obtener las diferentes formulaciones, las que fueron almacenadas a -20 °C hasta su liofilización.

Efecto citotóxico de los estabilizadores sobre las células VERO

Las células Vero se sembraron en placas de 96 pozos a las que se le adicionaron las mezclas de estabilizadores con medio 199 y SN. Se incubaron a (36 ± 1) °C durante 24 h. Se determinó el efecto citotóxico por observación al microscopio invertido.

Infectividad viral

La infectividad del virus fue determinada mediante la técnica de titulación en microplaca utilizando células Vero como sustrato de células, medio 199, STF y SN, e inoculando las células con la suspensión viral (0,1 mL/pozo), de acuerdo con lo descrito en los requerimientos de la OMS.¹⁰ Los cálculos se realizaron empleando el método de Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos al 50 % (DICT₅₀) según Reed y Muench.¹¹

Caracterización termofísica de las diferentes formulaciones

La caracterización termofísica de las formulaciones se realizó en un calorímetro diferencial de barrido DSC-2 Perkin-Elmer. Para la determinación de la temperatura de transición para las disoluciones se empleó una velocidad de 5 K/min, mientras que para los liofilizados la velocidad fue de 10 K/min.

Liofilización

La liofilización se realizó en un equipo Telstar Cryodos, empleando 0,5 mL de muestra en frascos 2R.

Las muestras se congelaron a -70 °C durante 2 h. El secado primario se efectuó a -40 °C durante 24 h y el secado secundario se efectuó durante 24 h hasta que las platinas alcanzaron la temperatura ambiente. La presión de trabajo fue de 1 Pa.

Determinación de la humedad residual

Se efectuó mediante el método de Karl Fischer en un equipo Baird and Tatlock (Inglaterra).

Caracterización del material de acuerdo con la apariencia y tiempo de rehidratación

Se analizó la compactación, movilidad y color de cada producto liofilizado.

Para determinar el tiempo de rehidratación los bulbos se reconstituyeron en 0,5 mL de agua destilada y se midió el tiempo en que dormaba la "pastilla" en disolverse completamente.

Isotermas de adsorción

Se expusieron las muestras liofilizadas a humedades relativas de 11, 32, 43, 58, 75, 81, 97 % hasta que llegaron al equilibrio. Posteriormente, se determinó el valor de humedad alcanzado por cada muestra en esta condición.

RESULTADOS Y DISCUSION

Todo parece indicar que la presencia de algunas sustancias como el sorbitol (5 %), la gelatina (2,5 %), la dextrana (2 y 4 %) y la peptona (5 %) en determinadas proporciones provocan daño a las células (Tabla 1).

Se observó que en las formulaciones 7 y 8 al disminuir la concentración de gelatina de un 2 a un 0,5 %, la de sorbitol de un 2 a un 1,5 % y la de dextrana hasta un 0,3 %, permite la desaparición del efecto tóxico. Este aspecto debe tenerse en cuenta en la formulación de un preparado vacunal para este tipo de virus debido a la posibilidad de obtener resultados erróneos.

Como se observa las formulaciones 3, 4 y 6 presentaban tg' que permitían la realización del proceso de liofilización convencional (Tabla 2). Los productos liofilizados correspondientes presentaron buen aspecto. Sin embargo, no siempre se correspondió con una elevada potencia, de hecho las formulaciones 3 y 4 presentaron buen aspecto y caídas notables en la potencia, mientras que la formulación 7 presentó mal aspecto y una aceptable potencia. Lo anterior indica que no es suficiente la presencia de una macromolécula y un aminoácido como la glicina para la protección del virus durante el proceso de desecación. También se confirmó que la presencia de una proteína y un alcohol polihidroxiado (formulación 1) tampoco es suficiente para la estabilización, aunque en este caso, el bajo valor de la tg' pudiera haber contribuido a la pérdida de potencia durante la liofilización.

El mejor resultado se obtuvo con la formulación 8 que cumplía en cuanto a los resultados de infectividad viral alcanzados, así como con lo referido al aspecto del producto. Todo parece indicar que la presencia combinada de sorbitol y lactosa, en este caso, es necesaria para la protección. El sorbitol por una parte, protege la infectividad del virus durante la liofilización y la lactosa por otra, disminuye la cohesión física de la preparación. A lo anterior, se le debe adicionar la cooperación que brindan las macromoléculas como

sustancias de carga en el proceso de liofilización y la presencia de aminoácidos, los cuales reaccionan preferencialmente con los grupos carboxilos del medio protegiendo a las proteínas virales de su posible desnaturalización por estos grupos.

Por otra parte, sólo las formulaciones 2, 5, 6, 7 y 8 cumplen con lo recomendado por la OMS que refiere que el título infectivo no debe ser menor de 1 000 DICT₅₀.

Resultados similares a los obtenidos para la formulación 8, se observaron en una formulación compuesta por lactosa 5 % + sacarosa 5 % + D-sorbitol 1,8 % + glutamato de sodio 0,1 % + gelatina 2 %.³

Se debe señalar que si bien la formulación 8 presenta un elevado valor de tg, lo cual garantiza la rigidez de la matriz liofilizada en el caso de

que el producto se exponga temporalmente a una elevada temperatura durante la transportación y distribución, esto no constituye una seguridad absoluta, debido a que la misma presenta en su composición una sustancia proteica que podría experimentar cambio al exponerse a determinadas condiciones.

Se estudió de igual forma la adsorción del producto al exponerlo a humedades relativas de equilibrio prefijadas (Fig. 1).

Se apreció que las diferentes formulaciones tienen un comportamiento similar en cuanto a la adsorción de agua, pudiendo estar fundamentalmente condicionado por la presencia del medio 199, que es el componente mayoritario de la formulación. Esta información permi-

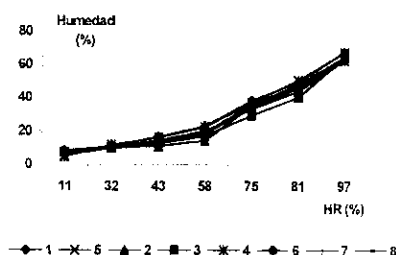


Fig. 1. Influencia de la humedad relativa en la adsorción de agua de las muestras liofilizadas.

tió calcular los valores de monocapa de agua adsorbida.

En todas las formulaciones los contenidos de humedad de la monocapa se encontraron entre un 5 y 10 %, lo que indica que a los valores de humedad residual obtenidos después de la liofilización, son poco probables las reacciones de deterioro del producto por efecto de la humedad, al no existir agua disponible para movilizar las sustancias reactivas. Se debe señalar que debido a la presencia de azúcares en las formulaciones pueden ocurrir cambios en los valores de la tg del producto liofilizado al variar ligeramente el contenido de humedad residual.¹²

CONCLUSIONES

La presencia de algunos aditivos en las formulaciones como peptona, dextrana y sorbitol, puede provocar citotoxicidad sobre las células Vero a determinadas proporciones.

Se comprobó que no es suficiente la presencia de macromoléculas como la dextrana, que elevan la tg y facilitan la liofilización, sino que también es necesaria la contribución de otras sustancias como azúcares,

Tabla 1. Efecto citotóxico sobre las células Vero de las formulaciones empleadas en la estabilización de la cepa vacunal contra el sarampión.

Estabilizador	24		48		72		120	
	h							
	AL	DL	AL	DL	AL	DL	AL	DL
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	-	+	-	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-

AL y DL Antes y después de liofilizar.

Tabla 2. Temperaturas de transición vítrea de la disolución congelada y el liofilizado (tg', tg) y títulos expresados como Log₁₀DICT_{50/ml} del preparado vacunal contra el sarampión.

Formulación	Humedad residual (%)			Log ₁₀ DICT ₅₀			Disolución (s)
				AL	DL		
1	2,0	-50	28	4,6	2,7	Malo	5
2	1,8	-44	37	4,5	3,0	Regular	5
3	1,5	-25	50	4,5	2,8	Bueno	4
4	2,2	-26	58	4,4	1,7	Bueno	5
5	2,6	-49	40	4,5	3,0	Malo	10
6	2,6	-42	36	4,5	3,0	Regular	4
7	2,5	-43	54	4,5	3,6	Malo	5
8	2,5	-40	49	4,6	3,7	Bueno	5

AL y DL Antes y después de liofilizar.

aminoácidos, alcoholes polihidroxilados y otras macromoléculas de naturaleza proteica para obtener niveles de infectividad adecuados.

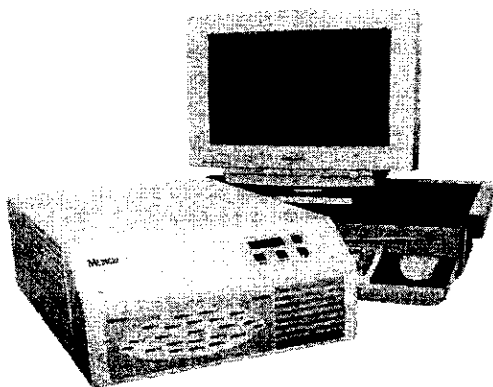
AGRADECIMIENTOS

A la M.C. Graciela Bolaños Queral y la Lic. Rafaela Quintero Maristany del Laboratorio de Cultivo de Tejidos por haber suministrado las células Vero empleadas en este estudio, así como a todo el personal técnico de la Planta IV del Instituto Finlay que colaboró en la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Edda de Rizzo, Elizabeth Christina Nunes Tenorio *et al.* Sorbitol-Gelatin and Glutamic Acid-Lactose Solutions for Stabilization of Reference Preparations of Measles Virus. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 105, 45, 1998.
2. William Joseph McAleer and Henry Zvi Markus. Vaccine Stabilizer Patent Specification 1 575 155, London Patent Office, 1980.
3. Masaharu Nakagawa, Keiko Sasaki, Satoshi Makino. A heat-resistant effect of a stabilizer newly develops for live virus vaccines. *Clinical Virology*, 17, 415, 1989.
4. P.S. Bennett, R.Z. Maigetter, Margit G. Olson, P.J. Provost, E.M. Scattergood and T.L. Shofield. The Effects of Freeze-Drying on the Potency and Stability of Live Varicella Virus Vaccine. *Develop. Biol. Standard* (Karger, Basel), 74, 215, 1991.
5. Gregory A. Tannock, John C. Hierholzer, Deborah A. Bryce, Ching-Feng Chee and Judith A. Paul. Freeze-Drying of Respiratory Syncytial Viruses for Transportation and Storage. *Journal of Clinical Microbiology*, Sep., 1769, 1997.
6. L.M.C. Allison, G.F.Mann, E.T.Perkins and A.J. Zuckerman. An accelerated stability test procedure for lyophilized measles vaccines. *Journal of Biological Standardization*, 9, 185, 1991.
7. Michael Barne. Stability of Freeze Dried and reconstituted Measles Vaccines. *Develop Biol. Standards*, 41, 259, 1978.
8. Erling Norrby and Michael N. Oxman. Measles Virus. In: B.N. Fields and D.M. Knipe. *Virology*, Second Edition, 1013-1044, 1996.
9. S.T. Bem, M. Alboiu, Georgeta Nistor, V. Marcovici. Cryosublimation of some virus-vaccines in the eutectic region in industrial freeze-drying. *Archivيا Veterinaria*, 91, 1977.
10. Requirements for measles, mumps and rubella vaccines and combined vaccine (live). Requirements Biological Substances No. 47. World Health Organization. WHO, Technical Report Series No. 840, 1994.
11. L.J. Reed and H. Muench. A Simple Method of Estimating 50 Per Cent. Endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27, 493, 1938.
12. Y. Ross and M. Karel. The glassy state in foods De J.M.V. Blanshard and P.J. Lillford, Nottingham Press Chpt. 10, 207-222, 1993.

Medicid 4



Potencia y flexibilidad.
Equipos para electroencefalografía digital.

EEG CUANTITATIVO Y MAPEO CEREBRAL
VIDEO EEG
CLASIFICACION AUTOMATICA DE ETAPAS DEL SUEÑO
MONITOREO INTRAOPERATORIO
Y DE CUIDADOS INTENSIVOS
POTENCIALES PROVOCADOS SENSORIALES Y COGNITIVOS

Electroencefalógrafo digital de 32 amplificadores, 24 de ellos monopoles con ganancias programables y 8 bipolares que tienen posibilidad de conexión monopolar para formar hasta 32 canales con referencia común. Permite realizar por *software* la mayoría de las combinaciones de montaje que se acostumbra a utilizar en los polígrafos de papel.

Los amplificadores bipolares están especialmente concebidos para la conexión de sensores o transductores para la medición de señales biofísicas (esfuerzo respiratorio abdominal/torácico, flujo aéreo nasal/bucal, etc.) cuando se efectúan registros poligráficos.

Posee un doble aislamiento que garantiza la protección del operador y el paciente contra *shock* eléctrico accidental y posibilita su empleo en cualquier tipo de instalación hospitalaria.

Con él pueden explotarse otras aplicaciones tales como:

- ✓ **TrackWalker:** Sistema básico de EEG digital. Puede incluir además, EEG cuantitativo y mapeo cerebral y Video EEG.
- ✓ **BrainSide:** Sistema para el monitoreo intraoperatorio del EEG.
- ✓ **DreamHunter:** Sistema para estudios de sueño.
- ✓ **MindTracer:** Sistema para el estudio de potenciales evocados relacionados a eventos.