

EVALUACIÓN DE UN ADYUVANTE DE ORIGEN VEGETAL PARA EL PROCESO DE FORMULACIÓN DE LA VACUNA GAVAC®

Assessment of an adjuvant of vegetable origin for the formulation process of Gavac® vaccine

Rafael Pimentel-Pérez¹, Jesús Zamora-Sánchez¹, Yovisleydis López-Sáez¹,
Rutdali María Segura-Silva¹, Vladimir Olivera-Romero¹ y Amaury Pérez-Sánchez^{2*}

¹Departamento de Producción, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de Camagüey, Circunvalación Norte y Avenida Finlay, Apartado Postal 387, Camagüey, Cuba. ^{2*}Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias Aplicadas, Universidad de Camagüey, Carretera Circunvalación Norte, Km. 5½, e/ Camino Viejo de Nuevitas y Ave. Ignacio Agramonte, CP 74 650, Camagüey, Cuba. Telf. +53 32 286385, Email: amaury@nauta.cu

RESUMEN

En el presente trabajo se evalúan las principales propiedades físico-químicas de un adyuvante de origen vegetal (AOV), el *Montanide 888 VG*®, en sustitución de su homólogo de origen animal (AOA), el *Montanide 888*®, con el objetivo de ser empleado como compuesto adyuvante durante la etapa de formulación de la vacuna Gavac®, la cual se utiliza para combatir la garrapata *Boophilus microplus*. Se determinaron los principales parámetros de calidad de los lotes de vacuna obtenidos utilizando el AOV, tales como estabilidad térmica, estabilidad mecánica, tamaño de gota, viscosidad, plasticidad, inocuidad, potencia y características organolépticas, mediante la aplicación de procedimientos operacionales establecidos específicamente por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) para la vacuna Gavac®. De forma general, los lotes de vacuna producidos utilizando el AOV mantuvieron una actividad biológica similar a aquellos que emplearon el *Montanide 888*®, mientras que todos los parámetros de calidad estuvieron dentro del rango establecido por el número de parte NP 5054, para todos los lotes de formulados obtenidos empleando el AOV. Se puede concluir que, el compuesto *Montanide 888 VG*® puede ser utilizado como adyuvante durante la formulación de la vacuna Gavac®, sin afectar la seguridad, potencia y eficacia del producto final. Para obtener los correspondientes resultados estadísticos se empleó el software estadístico *Statgraphics Plus*® versión 5.1.

Palabras clave: Adyuvantes; evaluación; seguridad; eficacia; Gavac®

ABSTRACT

In the present work, the main physico-chemical properties of an adjuvant of vegetal origin (AVO), the *Montanide 888 VG*®, were evaluated, in substitution of its homologous of animal origin (AAO), the *Montanide 888*®, with the aim of being used as an adjuvant compound during the formulation stage of the Gavac® vaccine, which is used to combat the *Boophilus microplus* tick. The main quality parameters for the vaccine batches obtained using the AVO were determined, such as thermal stability, mechanical stability, drop size, viscosity, plasticity, innocuousness, potency and organoleptic characteristics, by applying operational procedures specifically established by the Center of Genetic Engineering and Biotechnology (CGEB) for Gavac vaccine®. In general, the batches of vaccine produced using the AVO maintained a biological activity similar to those that used the *Montanide 888*®, while all the quality parameters were within the range established by the standard NP 5054, for all batches of formulations obtained using the AVO. It can be concluded that the adjuvant *Montanide 888 VG*® can be used during the formulation of the Gavac® vaccine, without affecting the safety, potency and efficacy of the final product. To obtain the corresponding statistical results, *Statgraphics Plus*® statistical software (version 5.1) was used.

Key words: Adjuvants; evaluation; safety; efficacy; Gavac®

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la vacunación es una de las intervenciones médicas preventivas más efectivas y seguras. Desde su descubrimiento, son el mejor medio para prevenir enfermedades y se consideran el mayor logro de la salud pública de todos los tiempos.

Los adyuvantes son moléculas, compuestos o complejos macromoleculares, que en combinación con los antígenos favorecen la estimulación del sistema inmunitario y aumentan la efectividad de las vacunas. La palabra adyuvante proviene del latín *adjuvare*, que significa “ayudar, asistir” [14].

En la actualidad, los adyuvantes juegan un papel importante en cuanto a la eficacia de las vacunas a medida que los antígenos se purifican con mayor profundidad. En el campo de la veterinaria, los adyuvantes deben incrementar la respuesta inmune específica (RIE) en contra de patógenos y mejorar así la protección del hospedador. Estos deben ser estables y seguros ya que los efectos secundarios pueden influir en el crecimiento, la tasa de reproducción y el confort del animal. Deben ser fáciles de usar, lo cual significa que el proceso de producción de la emulsión deberá ser conveniente y efectivo desde el punto de vista económico. El empleo de un adyuvante adecuado reduce la dosis o la concentración del antígeno a inyectar, decreciendo así el costo global de la vacuna [1, 16].

De forma general, las formulaciones del tipo agua-en-aceite (W/O) son recomendadas para los bovinos (*Bos primigenius*), pequeños rumiantes, aves de corral y peces cuando se necesita inmunidad a largo plazo [1].

Los trabajos de revisión más recientes sobre adyuvantes, se enfocan más en aquellos inmunoestimuladores (saponinas-QS21, oligonucleótidos CpG, lipopolisacáridos, monofosforil lípido A, citoquinas), en los de naturaleza lipídica (liposomas, virosomas, cochleates), en los llamados particulados (partículas de polaxámero, semejantes a los virus), y las tradicionales sales de aluminio [14].

Actualmente el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de Camagüey, Cuba produce una vacuna contra la garrapata *Boophilus microplus*, conocida comercialmente como Gavac® [2, 9, 17], la cual contiene 100 microgramos (µg) de la proteína Bm86 por cada dosis de 2 mililitros (mL) de vacuna formulada. La vacuna es una emulsión del tipo agua-en-aceite (W/O), y contiene un 36% de aceite mineral y un 4% del (AOA), *Montanide 888*®.

Debido a que existe el riesgo potencial de transmisión de la *Encefalitis Espongiforme Bovina* (EEB), las autoridades regulatorias internacionales desalientan el uso de sustancias de origen animal durante la fabricación de medicamentos y vacunas. Por este motivo, en el año 2007, la firma comercializadora *Seppic* decidió retirar del mercado el *Montanide 888*® y reemplazarlo

por un AOV, denominado *Montanide 888 VG*®. A causa de este cambio, fue necesario llevar a cabo la evaluación del nuevo compuesto: adyuvante (*Montanide 888 VG*®), a una escala equivalente a la escala de producción (20 litros -L-) durante el proceso de formulación de la vacuna Gavac®, con el fin de caracterizar y estudiar sus propiedades más importantes como compuesto adyuvante, y comprobar que el nuevo formulado obtenido cumple con las especificaciones de calidad vigentes, manteniendo sus atributos de seguridad, efectividad y eficacia.

Son varios los autores que han evaluado diversos tipos de adyuvantes para la formulación efectiva de vacunas. De esta manera, Rodríguez y col. [18] llevaron a cabo varios experimentos para evaluar el efecto adyuvante de fracciones de levadura recombinante *Pichia pastoris* en modelos de ratas (*Mus musculus*) y ganado vacuno. Estos autores encontraron que, la combinación de membrana de levadura de *P. pastoris* junto con saponina fue la formulación más efectiva a la hora de estimular la respuesta inmune humoral (RIH) en ratas, provocando una respuesta superior a aquella obtenida mediante el adyuvante tradicional (*Montanide 888*). Raman y col. [15] evaluaron la influencia de los adyuvantes saponina y *Montanide ISA 50* en la RIH de terneros ante el antígeno purificado de la garrapata *B. microplus*. Li y col. [12] compararon la eficacia de dos vacunas para cerdos (*Sus scrofa*) contra la fiebre aftosa, las cuales fueron emulsificadas con dos tipos de adyuvantes: 1) *Montanide ISA 201* y 2) *Montanide ISA 206*, respectivamente. Por último, Khorasani y col. [11] compararon la eficacia de dos vacunas contra la fiebre aftosa en terneros, las cuales fueron formuladas con dos tipos de adyuvantes: 1) *Montanide ISA 61 VG* más saponina y 2) gel de hidróxido de aluminio más saponina, respectivamente.

El objetivo de este trabajo consistió en efectuar la evaluación de un compuesto AOV, el *Montanide 888 VG*®, en sustitución de su homólogo animal, el *Montanide 888*®, durante la etapa de formulación de la vacuna Gavac®, con el fin de caracterizar las propiedades físico-químicas más importantes de las vacunas obtenidas, así como también la de realizar estudios, tanto de efectividad como de eficacia de aquellos formulados obtenidos utilizando este AOV.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la TABLA I se exponen las principales especificaciones de calidad, tanto del adyuvante de origen animal como vegetal.

Proceso de fabricación de la vacuna Gavac® empleando ambos adyuvantes

Para llevar a cabo la evaluación experimental del nuevo compuesto se empleó un reactor de 50 L de volumen total (Chemap®), así como también un emulsionador de acero inoxidable (IKA®, SD41) y 3 tanques de 100 L de capacidad total (Chemap®), todos ellos equipados con agitación, además de todos los equipos auxiliares normalmente utilizados en una operación de este tipo (bombas peristálticas, mangueras, válvulas, etc.).

TABLA I
**ESPECIFICACIONES DE CALIDAD PARA EL ADYUVANTE DE ORIGEN ANIMAL
 (MONTANIDE 888®) Y PARA EL DE ORIGEN VEGETAL (MONTANIDE 888 VG®)**

Parámetro	Montanide 888®	Montanide 888 VG®
Descripción	Surfactante no iónico, anhidromanitol-eteroctadecanoato de alta pureza perteneciente a la familia de los oleato-manide. Es un líquido ámbar con ligero olor a grasa.	Surfactante no iónico, anhidromanitol-eteroctadecanoato de alta pureza perteneciente a la familia de los oleato-manide. Es un líquido ámbar con ligero olor a grasa y bajo contenido de agentes preservantes (timerosal). Compuesto principal: Oleato de manide
Gravedad específica a 20 °C	Alrededor de 0,97	Alrededor de 0,97
Viscosidad a 25 °C	Alrededor de 350 mPa.s	Alrededor de 350 mPa.s
Valor ácido	1 máx	1,1 máx
(mg KOH/g)		
Valor de saponificación	140 – 150	140 – 150
(mg KOH/g)		
Valor de hidroxilo (mg KOH/g)	90 – 105	90 – 105
Contenido de agua (%)	0,7 %	0,7 %
Valor de lodo	58 – 69	58 – 69
(g l/100 g)		
Valor de peróxido (mmoles/kg)	0.0 – 2,0	0.0 – 2,0

Proceso de fabricación de la vacuna Gavac® empleando ambos adyuvantes.

Las formulaciones de la vacuna Gavac® empleando ambos componentes bajo estudio, fueron realizadas a una escala de 20 L, el cual constituye un volumen de trabajo equivalente al de la escala de producción. El proceso de formulación consistió, fundamentalmente, de todas las etapas típicas comúnmente efectuadas para llevar a cabo un proceso de este tipo, es decir: esterilización/higienización previa de todo el equipamiento ha emplear en el proceso; producción de las fases acuosa (FA) y oleosa (FO) en tanques apartes; adición de la FO formada hacia el reactor; esterilización y enfriamiento de la FO dentro del propio reactor; adición del formaldehído a la FA formada, y medición del pH de la mezcla resultante; adición del Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) a la FA; filtración y alimentación continua de la mezcla IFA-FA a la FO contenida dentro del reactor; formación de la emulsión del tipo W/O por medio del empleo del equipo emulsionador, y por último la realización de las pruebas de calidad correspondientes al tipo de emulsión previamente obtenido [4].

Se elaboraron 3 lotes de formulación, de 20 L cada uno, empleando el *Montanide 888®* como adyuvante, mientras que para evaluar la utilización del *Montanide 888 VG®* también se produjeron 3 lotes utilizando ese mismo volumen de trabajo, para un total de 6 lotes considerando ambos adyuvantes.

Para realizar todos los lotes de evaluación se empleó el lote de

IFA número 14.0701-3R. En la TABLA II se muestra el consumo de cada una de las materias primas empleadas para producir un lote de la vacuna Gavac®, para ambos compuestos adyuvantes.

También se fabricó un lote de *Placebo* empleando el AOV, pero con la diferencia de que se adicionó una solución tampón en lugar del IFA, con el objetivo de emplearlo durante el ensayo de potencia para efectuar la dilución de la vacuna.

Para el control de proceso se realizaron los ensayos de estabilidad mecánica referidos en el Procedimiento Patrón de Operación (PPO) 2.31.233.06 [3], mientras que el tipo de emulsión se determinó utilizando el PPO 2.14.800.06 [4].

A los 6 lotes totales efectuados se le realizaron pruebas Físico-Químicas y Biológicas, referidas en el NP 5054 [8], exceptuando el ensayo de Esterilidad y Volumen. El ambiente interno de la cabina de flujo laminar (ICEM®, FX100 Faster) fue monitoreado antes y durante el proceso de formulación y llenado, aplicando el *Método de Placa Expuesta* según PPO 2.31.701.97 [5] En la TABLA III se muestra el esquema de muestreo seguido durante la producción de los lotes.

Estudios de estabilidad de la vacuna

Durante la producción de un lote de vacuna, los ensayos de

TABLA II
**CONSUMO DE MATERIAS PRIMAS PARA PRODUCIR 1 LOTE DE VACUNA GAVAC®,
 TOMANDO EN CUENTA AMBOS COMPUESTOS ADYUVANTES**

Parámetro	Montanide 888®	Montanide 888 VG®
Volumen del Granel (L):	20	20
Tamaño del lote (dosis):	8500 ± 10000	8500 ± 10000
Datos del I.F.A		
Lote de I.F.A	14.0701-3R	14.0701-3R
Concentración de proteínas [Lowry] miligramos (mg)/ mililitros (mL)	4,25	4,25
Volumen de solución de I.F.A (L)	0,238	0,238
Cantidad de proteínas totales [gramos (g)]	1,01	1,01
Pureza (%)	98,75	98,75
Cantidad de I.F.A ajustada (g)	1,00	1,00
Datos generales del Formulado:		
Volumen a Formular (L)	20,00	20,00
Tiempo de duración [minutos (min)]	3	3
Preparación de la Solución Oleosa		
Volumen de solución oleosa (L)	8,00	8,00
Aceite Mineral (L)	7,20	7,20
Montanide 888 (L)	0,80	0,80
Preparación del Tampón Proteico		
Masa total del Tampón proteico [kilogramos (kg)]	12,000	12,000
Masa de hidrógeno-fosfato de di-sodio [$m_{\text{Na}_2\text{HPO}_4}$] (g)	79,05	79,05
Masa de di-hidrógeno-fosfato de sodio dihidratado [$m_{\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}$] (g)	4,86	4,86
Masa de cloruro de sodio [m_{NaCl}] (g)	69,70	69,70
Masa de agua [$m_{\text{H}_2\text{O}}$] (kg)	11,76	11,76
Volumen de formaldehído [HCHO] (mL)	11,60	11,60

Estabilidad Térmica y Mecánica deben ser realizados solamente en el momento en que éste se produce, ya que la vacuna es una emulsión del tipo W/O. Este tipo de emulsión resulta inestable desde el punto de vista termodinámico, por lo que las pruebas aceleradas incrementan notablemente la entropía del sistema, provocando un incremento del proceso de desnaturalización (destrucción) de la emulsión. A causa de lo anterior, no tiene sentido llevar a cabo estas pruebas de estabilidad en fecha posterior a la de la producción de la formulación, ya que se estaría sumando al tiempo real transcurrido el efecto de la temperatura o el efecto gravitacional, según corresponda, durante el ensayo de estabilidad.

No obstante, se decidió efectuar un estudio de estabilidad de las formulaciones obtenidas, empleando tanto el AOA como el AOV, bajo dos temperaturas de trabajo: 56 y 37 °C. Lo anterior se realizó con el fin de efectuarles un estudio de reto o desafío

a ambas formulaciones, para así comparar los resultados obtenidos con aquellos descritos en la literatura [13, 20], en la cual se establece que una formulación oleosa del tipo W/O que se mantiene estable por 5 días (d) a 56 °C, y por 15 d a 37 °C equivale a una estabilidad de 2 años (a) a 4 °C.

De esta manera se colocaron frascos de ambas formulaciones producidas con los dos componentes adyuvantes bajo temperaturas de 56 y 37 °C por 5 y 15 d, respectivamente. La estabilidad mecánica de los frascos fue determinada diariamente según PPO 2.31.233.06 [3].

Los valores obtenidos fueron procesados utilizando el paquete estadístico *Statgraphics Plus® 5.1* [19], realizando transformaciones en los datos expresados en porcentaje % por medio de la aplicación del arcoseno de la raíz cuadrada del número, para realizar posteriormente una prueba t de Student.

TABLA III
MUESTREO REALIZADO EN LA PRODUCCIÓN DE LOS LOTES OBTENIDOS
PARA LOS DOS COMPUESTOS ADYUVANTES BAJO ESTUDIO

Ensayo	Tipo	No. Bulbos
Características Organolépticas	Prueba	1
Estabilidad Térmica	Prueba	4
	Reprueba	2
Estabilidad Mecánica	Prueba	2
	Reprueba	1
Tamaño de Gotas	Prueba	1
	Reprueba	1
Comportamiento Reológico	Prueba	3
	Reprueba	1
Potencia	Prueba	3
	Reprueba	2
Seguridad General	Prueba	3
	Reprueba	3
TOTAL		27

TABLA IV
COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS CONTROLES A PROCESO REALIZADOS PARA
CADA UNO DE LOS LOTES DE FORMULADO OBTENIDOS, EMPLEANDO TANTO EL AOA COMO EL AOV

Muestras / Adyuvante	Montanide 888®			Montanide 888 VG®			
	Lote MA1	Lote MA2	Lote MA3	Lote MV1	Lote MV2	Lote MV3	Lote Placebo
Tipo de emulsión	W/O	W/O	W/O	W/O	W/O	W/O	W/O
Estabilidad mecánica (Hu/H ₀) ^a	0,97	0,98	0,96	0,98	0,98	0,97	0,97

^aHu – altura de la columna emulsificada; H₀ – altura de la columna de emulsión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comparación de las características físico-químicas entre el AOA y el AOV

Las especificaciones físico-químicas tomadas en cuenta durante el estudio son iguales entre sí para ambos componentes, según se puede observar en la TABLA I.

Comparación de los resultados obtenidos para los ensayos tipo de emulsión y estabilidad mecánica en el control del proceso de las formulaciones obtenidas, utilizando tanto el AOA como el AOV

Los controles de calidad realizados a los lotes formulados utilizando los dos adyuvantes bajo estudio, estuvieron dentro de los parámetros establecidos, según se puede observar en la TABLA IV.

En la TABLA V se muestra el comportamiento de las características de calidad de todos los lotes de formulado obtenidos empleando ambos adyuvantes.

Según se puede apreciar en la TABLA V, todos los parámetros de calidad registrados para cada uno de los lotes de formulación obtenidos empleando el AOV, se comportaron de manera similar a aquellos resultados obtenidos utilizando el AOA. De esta manera se observa el cumplimiento de las especificaciones de calidad descritas para la vacuna Gavac®, según NP 5054 [8]. La TABLA VI resume los resultados estadísticos obtenidos (tomando en cuenta un 95% de intervalos de confianza) para cada uno de los parámetros de calidad considerados de acuerdo con NP 5054, con relación a ambos adyuvantes estudiados, mientras que en la FIG. 1 se muestran los gráficos de *Caja* y *Bigotes* obtenidos como resultado de la aplicación del paquete estadístico *Statgraphics Plus® 5.1* [19], también para cada uno de los parámetros de calidad considerados.

TABLA V
COMPORTAMIENTO DE LOS PRINCIPALES PARÁMETROS DE CALIDAD PARA TODOS LOS LOTES DE FORMULADO OBTENIDOS DE VACUNA GAVAC®, EMPLEANDO TANTO EL AOA COMO EL AOV

	<i>Montanide 888®</i>			<i>Montanide 888 VG®</i>			<i>Placebo</i>	<i>Criterios de aceptación</i>
	<i>Lote MA1</i>	<i>Lote MA2</i>	<i>Lote MA3</i>	<i>Lote MV1</i>	<i>Lote MV2</i>	<i>Lote MV3</i>		
Estabilidad Térmica (Hu/Ho)	0,97	0,95	0,96	0,97	0,98	0,97	0,96	≥ 0,90
Estabilidad Mecánica (Hu/Ho)	0,86	0,86	0,88	0,97	0,97	0,96	0,97	≥ 0,80
Tamaño de gota (% < 5µm^º)	100	100	100	100	100	100	100	≥ 80
Viscosidad (mPa.s[§])	471,28	554,04	476,91	1020,32	814,71	822,16	670,65	≤ 1500
Plasticidad	0,789	0,757	0,795	0,728	0,757	0,756	0,772	< 1
Inocuidad	Pasa la prueba	Pasa la prueba	Pasa la prueba	Pasa la prueba	Pasa la prueba	Pasa la prueba	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Potencia (DE50_β, µgφ)	0,791	0,754	0,963	0,978	0,509	0,638	-	≤ 1
Características organolépticas	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple

^ºmicrómetros; [§]miliPascal.segundo; ^βDE – Dosis de inmunógeno a la que se seroconvierten el 50 % de los animales; ^φmicrogramos.

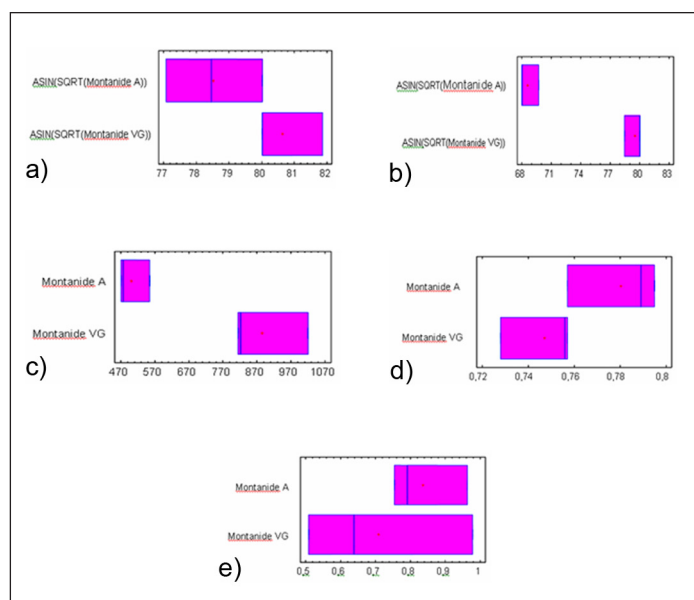


FIGURA 1. GRÁFICOS DE CAJA Y BIGOTES OBTENIDOS PARA CADA UNO DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD CONSIDERADOS, APLICANDO EL PAQUETE ESTADÍSTICO STATGRAPHICS PLUS® 5.1.

- a) ESTABILIDAD TÉRMICA
- b) ESTABILIDAD MECÁNICA
- c) VISCOSIDAD
- d) PLASTICIDAD
- e) POTENCIA

Estabilidad térmica

De acuerdo con los resultados mostrados en la TABLA VI y en la FIG. 1, se puede observar que no existen diferencias significativas con respecto a la variable *Estabilidad Térmica* para dos formulaciones obtenidas ($P \leq 0,05$).

Estabilidad mecánica

Los resultados de estabilidad mecánica (EM) obtenidos para cada uno de los lotes de formulados producidos, empleando el AOA, se comportaron de manera inusual, ya que, de acuerdo con el historial de datos disponibles para esta variable a lo largo de todos los lotes de producción obtenidos, el valor medio de esta característica se encuentra alrededor de 0,965; sin embargo, según se puede apreciar en la TABLA V, su valor no superó 0,89 para todos los lotes estudiados. De esta manera se considera que pudo haber existido un error en el momento de realizar la técnica analítica, pues en este caso el comportamiento obtenido durante los estudios de estabilidad reflejó que la EM se encontró por encima de 0,92 para todos los puntos considerados, y que además los resultados obtenidos durante el control de proceso (TABLA IV) reflejaron valores superiores a los determinados por el *Departamento de Control de la Calidad* (TABLA V).

Por el contrario, el comportamiento de las formulaciones obtenidas empleando el AOV tuvo buen desempeño, correspondiéndose con los valores medios históricos obtenidos para aquellas formulaciones que emplean AOA. Los resultados obtenidos fueron superiores a los descritos en la especificación de calidad lo cual indica que el producto se comportó de forma estable en este sentido.

TABLA VI
RESUMEN DE LOS RESULTADOS ESTADÍSTICOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES DE CALIDAD

Parámetro / Adyuvante	Frecuencia	Media	Mediana	Desviación Típica	Mínimo	Máximo	Asimetría típica	Estadístico t	Valor P
Estabilidad Térmica									
Montanide 888®	3	78,5226	78,463	1,47428	77,049	80,0258	0,128376	-2,01714	0,1139
Montanide 888 VG®	3	80,6405	80,0258	1,0647	80,0258	81,8699	1,22474		
Estabilidad Mecánica									
Montanide 888®	3	68,5955	68,0272	0,984301	68,0272	69,7321	1,22474	-14,1513	0,0001
Montanide 888 VG®	3	79,5049	80,0258	0,902247	78,463	80,0258	-1,22474		
Viscosidad									
Montanide 888®	3	500,743	476,91	46,242	471,28	554,04	1,20435	-5,31534	0,0060
Montanide 888 VG®	3	885,73	822,16	116,618	814,71	1020,32	1,21912		
Plasticidad de la emulsión									
Montanide 888®	3	0,78133	0,789	0,0204287	0,757	0,795	-1,10696	2,20059	0,0926
Montanide 888 VG®	3	0,747	0,756	0,0164621	0,728	0,757	-1,21966		
Potencia									
Montanide 888®	3	0,836	0,791	0,11153	0,754	0,963	1,07485	0,829055	0,4537
Montanide 888 VG®	3	0,70833	0,638	0,242282	0,509	0,978	0,845873		

El análisis estadístico relacionado con el comportamiento de la EM para ambas formulaciones (TABLA VI y FIG. 1) dio como resultado diferencias significativas, probablemente influenciado por dificultades en la ejecución del método de ensayo efectuado sobre las muestras de *Montanide 888*.

Tamaño de gota

La distribución del tamaño de gota en la fase dispersa de una emulsión inyectable está fuertemente relacionada con la estabilidad de la misma, por lo que obtener una emulsión en la cual la mayoría de los glóbulos sean inferiores o iguales a 2 milimicras (μm), es considerado en la práctica industrial como una *emulsión fina* [10, 20]. De acuerdo con los valores mostrados en la TABLA VII, se puede decir que el comportamiento de esta variable para ambas formulaciones estudiadas fue similar, obteniéndose en todos los lotes producidos, empleando tanto el *Montanide 888®* como el *Montanide 888 VG®*, resultados donde más del 97% de las gotas contenidas en la fase dispersa presentan una tamaño inferior a los 2 μm , lo cual cumple con el criterio de aceptación especificado, el cual indica que el 80% o más de las gotas obtenidas deben tener un tamaño de gota $\leq 5 \mu\text{m}$ (TABLA V).

Viscosidad

La viscosidad de una emulsión es un elemento de suma importancia, el cual permite evaluar la calidad de la vacuna obtenida desde el punto de vista físico. En el rango de viscosidad especificado, éste es directamente proporcional a la estabilidad del formulado, aunque con el incremento de la viscosidad se hace más difícil su aplicación. El análisis estadístico realizado sobre los resultados de viscosidad obtenidos (TABLA VI y FIG.

1c), muestra que existen diferencias significativas entre las dos formulaciones obtenidas, aunque los valores reportados para los lotes de formulado se comportaron de manera satisfactoria, estando siempre por debajo de los 1500 mPa.s, valor que cumple con el criterio de aceptación vigente para la vacuna Gavac®, según NP 5054. El comportamiento reológico de un sistema disperso depende de la viscosidad y concentración del medio de dispersión; de la forma y tamaño de las partículas; de la naturaleza de las interacciones existentes entre las partículas, así como también de la interacción de estas con el medio de dispersión.

Para abordar la discusión de los resultados obtenidos se procedió a tomar en cuenta por separado cada uno de los factores que intervienen en el comportamiento reológico.

Viscosidad del medio de dispersión

De acuerdo con los Certificados de Calidad emitidos para cada uno de los adyuvantes utilizados, la diferencia existente entre los valores obtenidos de viscosidad a 25°C para ambos es mínima, siendo de 290 centipoises (cP) para el *Montanide 888®* y 286 cP para el *Montanide 888 VG®*, por lo que el incremento en la viscosidad de la formulación obtenida utilizando el AOV no se debe al cambio del emulgente. Además, según se puede observar en la TABLA IV, la formulación obtenida con el lote de Placebo alcanzó un valor de viscosidad de 670,65 mPa.s, la cual es muy cercana a los valores obtenidos empleando el AOA.

Tamaño de las partículas

Como se puede apreciar en la TABLA VII la distribución del

TABLA VII
DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE GOTA EN LAS FORMULACIONES PRODUCIDAS

Tamaño de gota		MA1	MA2	MA3	MV1	MV2	MV3
A	Menores o iguales a 1µm	52,9%	98,7%	100%	51,0%	100%	100%
B	Mayores de 1 hasta menores o iguales a 2 µm	45,9%	1,3%	0,0%	48,0%	0,0%	0,0%
C	Mayores de 2 hasta menores o iguales a 3 µm	1,2%	0,0%	0,0%	1,0%	0,0%	0,0%
D	Mayores de 3 hasta menores o iguales a 4 µm	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
E	Mayores de 4 hasta menores o iguales a 5 µm	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
F	Mayores de 5	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

$H = (A+B+C+D+E / A+B+C+D+E+F) \times 100 = \% \text{ de gotas } \leq 5\mu\text{m}$ Dónde: MA – Montanide Animal MV – Montanide Vegetal

tamaño de gota obtenida en la formulación obtenida con el AOV, estuvieron mayormente distribuidas en las menores e iguales a 1µm, lo que indica que es una emulsión fina. Lo anterior revela la posible existencia de partículas muy pequeñas insertadas dentro de la formulación, las cuales estén provocando un aumento de la viscosidad, a causa del incremento de la homogeneidad de la emulsión [7, 10].

- *Interacciones existentes entre las partículas, y entre éstas con el medio de dispersión*

La existencia de un número elevado de partículas pequeñas en las formulaciones obtenidas con el *Montanide 888 VG*[®], tiene como efecto el aumento de la viscosidad de la dispersión, a causa de la inmovilización de la fase continua o debido a la interacción entre las fases. La viscosidad de una emulsión aumenta a medida que la distancia entre las gotas y partículas disminuye, lo cual se traduce en un incremento de la concentración de la misma [10, 20].

Plasticidad

En los resultados que se muestran en la TABLA VI y FIG. 1d referente a la variable *Plasticidad*, se puede apreciar que las dos formulaciones obtenidas se comportan como un fluido del tipo *pseudoplástico*, según criterio establecido en PPO 2.31.274.14 [7], lo cual indica que su punto de ruptura tiene un valor tan bajo que no es apreciable, y que su viscosidad diferencial disminuye continuamente con la fuerza de cizalla. La media de los valores obtenidos fue similar, siendo de 0,781 para el AOA y 0,747 para el AOV, lo cual indica que no existen diferencias significativas desde para ambas formulaciones obtenidas con respecto a esta variable de calidad.

Potencia

Los resultados estadísticos obtenidos de esta variable (ver TABLA VI y FIG. 1e) para cada uno de los formulados obtenidos mostraron que no existen diferencias significativas de este parámetro para las dos formulaciones estudiadas. Lo anterior indica que la formulación obtenida con el *Montanide 888 VG*[®] tendrá una eficacia similar a la que presenta la formulación obtenida empleando *Montanide 888*[®], ya que a nivel del organismo

modelo (*Mus musculus*), hubo un satisfactorio desarrollo de anticuerpos para ambas formulaciones aplicadas, de acuerdo con el procedimiento descrito en PPO 4.09.092.06 [6].

Características organolépticas

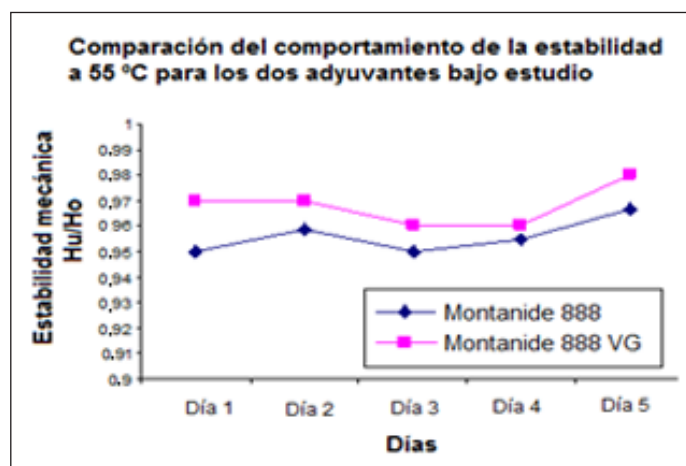
Las dos formulaciones tuvieron un comportamiento similar respecto a esta variable, cumpliéndose en ambos casos el NP 5054.

Seguridad general

Los dos formulados tuvieron un comportamiento satisfactorio durante los ensayos de *Seguridad General* efectuados. Este comportamiento es de vital importancia ya que el mismo está directamente relacionado con la seguridad de la vacuna formulada.

Resultados de estabilidad mecánica acelerada a 55°C

En la FIG. 2 se muestran los resultados para las formulaciones obtenidas, aplicando tanto el AOA como el AOV, las cuales fueron sometidas a un estudio de estabilidad acelerada a 55 °C



de temperatura por 5 d.

FIGURA 2. COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LA ESTABILIDAD MECÁNICA ACCELERADA A 55 °C PARA LOS DOS ADYUVANTES BAJO ESTUDIO.

De acuerdo con los resultados mostrados en el FIG. 2, se puede apreciar que las dos formulaciones presentaron un comportamiento similar en el tiempo al analizar el parámetro EM, obteniendo mejores resultados la formulación que utilizó el AOV como adyuvante. En ninguna de las dos formulaciones obtenidas se observa una disminución de la relación Hu/Ho en el tiempo. De esta manera, durante los 5 d de ensayo las dos formulaciones mantuvieron valores de EM de acuerdo con los criterios de aceptación establecidos para la vacuna Gavac®, según NP 5054.

Resultados de estabilidad mecánica (EM) acelerada a 37°C

En la FIG. 3 se muestra la comparación entre los resultados obtenidos para cada uno de los estudios de EM acelerada realizados a 37°C de temperatura, para ambas formulaciones consideradas

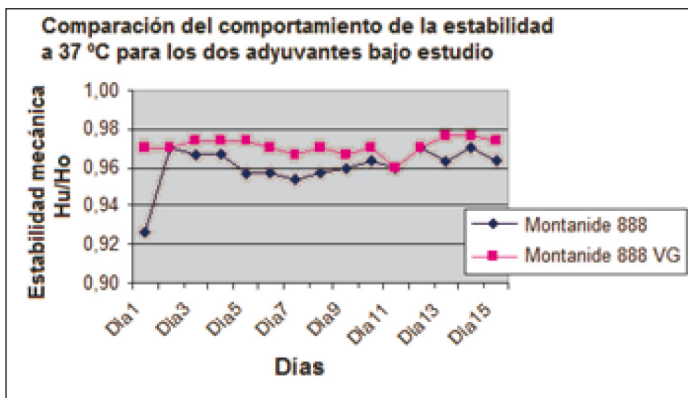


FIGURA 3. COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LA ESTABILIDAD MECÁNICA ACELERADA A 37 °C PARA AMBOS ADYUVANTES ESTUDIADOS

En el primer punto de la FIG. 3, correspondiente a los datos obtenidos para el *Montanide 888*®, se observó un comportamiento diferente de la EM con respecto al resto de los valores generados, debido, quizás, a dificultades introducidas durante el procedimiento de ensayo. Sin embargo, a partir del segundo día se obtuvieron valores de EM de acuerdo con el comportamiento normal registrado para este tipo de formulación. Todos los resultados obtenidos de los ensayos efectuados para las dos formulaciones se encuentran dentro de los valores especificados según norma NP 5054, derivándose de esta forma la futura estabilidad del producto en el tiempo. Según se puede observar en la FIG. 3, la mayoría de los valores obtenidos de Hu/Ho para la formulación producida con *Montanide 888 VG*® fueron superiores en comparación con aquellos alcanzados para el *Montanide 888*®. De esta manera, se infiere que la utilización del AOV no afectará la estabilidad de la vacuna en el tiempo.

CONCLUSIONES

Las formulaciones obtenidas con el AOA (*Montanide 888*®) y el AOV (*Montanide 888 VG*®) tuvieron un comportamiento similar en cuanto al cumplimiento de las especificaciones de

calidad de la vacuna formulada. La vacuna obtenida utilizando AOV mantiene una actividad biológica similar a la que emplea AOA, indicando así que no se afectará su eficacia. El ensayo de seguridad general evidenció que la vacuna formulada con el AOV es segura. Lo mismo sucede con aquellas formulaciones obtenidas empleando el AOA. Las dos formulaciones en estudio son estables 5 d a 55°C y 15 d a 37°C, desde el punto de vista gravitacional, lo que evidencia que no se afectará el período de validez establecido para el producto actual. El AOV *Montanide 888 VG*® puede ser utilizado durante el proceso de formulación de la vacuna Gavac®, sin que ocurran variaciones en la seguridad y eficacia del producto final.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. AUCOUTURIER, J.; DUPUIS, L.; GANNE, V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. **Vaccine**. 19:2666-2672. 2001.
- [2]. CANALES, M.; ENRIQUEZ, A.; RAMOS, E.; CABRERA, D.; DANDIE, H.; SOTO, A.; FUENTE, J. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac® against cattle tick. **Vaccine**. 15:414- 422. 1997.
- [3]. CENTRO DE INGENIERIA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (CIGB). PPO 2.31.233.06. Determinación de la estabilidad mecánica de emulsiones oleosas, 7 pp. 2006.
- [4]. CENTRO DE INGENIERIA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (CIGB). PPO 2.14.800.06. Formulación de la vacuna Gavac®. 11 pp. 2006.
- [5]. CENTRO DE INGENIERIA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (CIGB). PPO 2.31.701.97. Control microbiológico ambiental del área de producción del CIGB de Camagüey. 6 pp. 1997.
- [6]. CENTRO DE INGENIERIA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (CIGB). PPO 4.09.092.06. Actividad biológica, prueba de potencia EP (Farmacopea Europea). 8 pp. 2006.
- [7]. CENTRO DE INGENIERIA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (CIGB). PPO 2.31.274.14. Comportamiento reológico. Determinación de viscosidad en emulsiones oleosas de fluidos no newtonianos de tipo pseudoplástico en el Reómetro DV-111 Ultra. 6 pp. 2014.
- [8]. CENTRO DE INGENIERIA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (CIGB). NP 5054. Especificación de Calidad de Producto Terminado NP 5054: Vacuna Recombinante contra la Garrapata Gavac®. 4 pp. 2002.
- [9]. FRAGOSO, H.; RAD, P.H.; ORTIZ, M.; RODRIGUEZ, M.; REDONDO, M.; HERRERA, L.; FUENTE, J. Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. **Vaccine**. 16:1990-1992. 1998.

- [10]. JATO, J. V. Emulsiones. En: Parte I: Aspectos Fundamentales de los Sistemas Farmacéuticos. **Tecnología Farmacéutica**. Editorial Síntesis, Santiago de Compostela. 624 pp. 2006.
- [11]. KHORASANI, A.; MADADGAR, O.; SOLEIMANJAH, H.; KEYVANFAR, H.; MAHRAVANI, H. Evaluation of the efficacy of a new oil-based adjuvant ISA 61 VG FMD vaccine as a potential vaccine for cattle. **Iranian J. Vet. Res.** 17:8-12. 2016.
- [12]. LI, D.; ZHOU, C.; SHE, D.; LI, P.; SUN, P.; BAI, X.; LIU, Z. The comparison of the efficacy of swine FMD vaccine emulsified with oil adjuvant of ISA 201 VG or ISA 206 VG. **J. Bio.Sci.Med.** 1:22-25. 2013.
- [13]. OKAFOR, N. Vaccines. In: **Modern industrial microbiology and biotechnology**. Science Publishers, New Hampshire. 551 pp. 2007.
- [14]. PANEQUE, A. Compuestos inorgánicos como adyuvantes de vacunas. **Biotechnol. Aplic.** 30:243-249. 2013.
- [15]. RAMAN, M.; RAMADASS, P.; RAJAVELU, G. Evaluation of Saponin and Montanide ISA 50 adjuvants for their immunopotency and effect on humoral immune response of calves to purified midgut antigen of *Boophilus microplus*. **Veterinarski Archiv.** 74(2):129-140. 2004.
- [16]. REED, S.G.; BERTHOLET, S.; COLER, R.N.; FRIEDE, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends in Immunol.** 30:23-32. 2008.
- [17]. RODRIGUEZ, M.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H.; RAMOS, N.F.; MACHADO, H.; LABARTA, V.; FUENTE, J. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. **Vaccine.** 13:1804-1808. 1995.
- [18]. RODRÍGUEZ, M.; MONTERO, C.; MACHADO, H.; JOGLAR, M. The evaluation of yeast derivatives as adjuvants for the immune response to the Bm86 antigen in cattle. **BMC Biotechnol.** 1:1-7. 2001.
- [19]. STATGRAPHICS®. Statgraphics Plus®, Version 5.1, 2005.
- [20]. TADROS, T. Emulsions. In: **Emulsion Formation and Stability**. 1st Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany. Pp 1-73. 2013.