

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR PARA LA DETERMINACIÓN DE POLIRRIBOSIL-RIBITOL-FOSFATO (PRP) LIBRE Y CONJUGADO A TOXOIDE TETÁNICO (PRP-TTD) EN VACUNAS ANTI *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* TIPO B

Development of a size exclusion chromatography method for a determination of free polyribosyl-ribitol-phosphate (PRP) and conjugated to tetanus toxoid (PRP-TTD) in *Haemophilus influenzae* type B vaccines

Emilia Ojeda Zachara*, Gisela Severino*, Ana Carolina Abba*, Patricia Aprea.

Departamento del Laboratorio Nacional para el Estudio y Control de Biológicos, Dirección de Evaluación y Control de Biológicos y Radiofármacos, Instituto Nacional de Medicamentos. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, Buenos Aires. Argentina.

Correspondencia: Emilia Ojeda Zachara (emilia.ojeda@anmat.gob.ar)

*Estos autores contribuyeron equitativamente al desarrollo de este trabajo.

Recibido: 26 de julio de 2021. Aprobado: 1 de diciembre de 2021.

RESUMEN

Haemophilus influenzae tipo b es un patógeno oportunista responsable de infecciones invasivas y graves como bacteriemia y meningitis bacteriana aguda en poblaciones susceptibles, principalmente en niños menores de 5 años de edad. Su antígeno capsular, el polirribosil-ribitol-fosfato, es un polisacárido específico del serotipo b y ha sido utilizado para la producción de vacunas, inicialmente en forma aislada, con escaso éxito debido a la pobre estimulación inmune en la población objetivo, dando una protección poco sostenida en el tiempo. Surgieron así las vacunas conjugadas, usadas actualmente, donde el polisacárido capsular se une a una proteína *carrier* para generar una respuesta inmune timo-dependiente, con memoria inmunológica, y apta para el uso en niños a partir de los 2 meses de edad. El polirribosil-ribitol-fosfato se caracteriza por ser una secuencia polimérica del azúcar fosfatado de largo variable, formando una mezcla con diferente abundancia de pesos moleculares. El largo de las cadenas polisacáridicas es un parámetro de calidad del proceso productivo de estas vacunas, y se controla mediante técnicas de cromatografía de exclusión molecular.

El presente trabajo consistió en desarrollar una técnica analítica para la determinación de polirribosil-ribitol-fosfato en su forma libre, y conjugado a toxoide tetánico, presentes en vacunas anti *Haemophilus influenzae* tipo b, utilizando cromatografía de exclusión molecular acoplada a detectores por índice de refracción y por luz ultravioleta a longitudes de onda de 215 y 280 nm. El desarrollo se planteó sobre antecedentes bibliográficos que describen una metodología similar como control de la instancia de conjugación en el proceso productivo del ingrediente farmacéutico activo de vacunas anti *Haemophilus influenzae* tipo b. En el procedimiento se utilizaron estándares internacionales de los analitos libres y estándares de pesos moleculares, y se evaluó la capacidad del sistema para discriminar los componentes de la vacuna y detectar diferencias que podrían indicar un compromiso en la calidad de la misma.

Palabras clave: Vacunas contra *Haemophilus*, espectrofotometría ultravioleta, refractometría, cromatografía en gel.

ABSTRACT

Haemophilus influenzae type b is an opportunistic pathogen responsible for invasive and severe infections such as bacteremia and acute bacterial meningitis in susceptible populations, mainly children under 5 years of age. Its capsular antigen, polyribosyl-ribitol-phosphate, is a specific polysaccharide of serotype b and has been used to produce vaccines, initially in isolation, with little success due to poor immune stimulation in the target population, and providing little sustained protection over time. Thus, arose the conjugated vaccines currently used, where the capsular polysaccharide binds to a carrier protein to generate a thymus-dependent immune response with immunological memory and suitable for use in children from 2 months of age. Polyribosyl-ribitol-phosphate is characterized by being a polymeric sequence of the phosphorylated sugar of variable length, forming a mixture with

different abundances of various molecular weights. The length of the polysaccharide chains is a quality parameter of the production process of these vaccines, and is controlled by size-exclusion chromatography techniques.

The presented work consisted in developing an analytical technique for the determination of polyribosyl-ribitol-phosphate in its free form and conjugated to tetanus toxoid present in vaccines against *Haemophilus influenzae* type b, using size-exclusion chromatography coupled to refractive index and UV detectors at wavelengths of 215 and 280 nm. The development was based on bibliographic backgrounds that use a similar methodology as a control of the conjugation step in the production process of the active pharmaceutical ingredient of anti-*Haemophilus influenzae* type b vaccines. In the procedure, international standards for free analytes and molecular weight standards were used, and the ability of the system to discriminate the vaccine components and to detect differences that could indicate a compromise in the quality of this vaccine was evaluated.

Keywords: *Haemophilus* vaccines, spectrophotometry, ultraviolet, refractometry, chromatography, gel.

INTRODUCCIÓN

Haemophilus influenzae es un bacilo Gram negativo inmóvil no esporulado y se considera un patógeno oportunista, cuyo huésped exclusivo es el hombre y el principal reservorio es el tracto respiratorio superior en lactantes y niños pequeños que actúan de portadores. Este microorganismo se puede clasificar según la presencia o ausencia de una cápsula polisacáridica que recubre su membrana externa. La presencia de esta cápsula se considera el mayor factor de virulencia de estas bacterias ya que les permite evadir la fagocitosis y respuesta inmune en el organismo donde desarrollan una infección. En base a su composición y estructura polisacáridica se distinguen seis serotipos que se designan con letras minúsculas, desde la “a” hasta la “f”.

En la era pre-vacunación, más del 95% de las infecciones invasivas serias por *H. influenzae* eran causadas por el serotipo capsular b (Hib), dándose la mayoría de estas infecciones en niños menores de cinco años, y con mayor frecuencia en los menores de un año. Hib es el agente causal que más frecuentemente provoca infecciones graves como la bacteriemia y meningitis bacteriana aguda, y en nuestro país, es la primera causa de meningitis bacteriana documentada en los menores de 5 años, con una mortalidad aproximada del 5% y un 25-35% de secuelas neurológicas^[1,2].

El uso de vacunas anti-*Haemophilus influenzae* tipo b (vacunas anti-Hib) disminuye la tasa de colonización nasofaríngea y las posibilidades de transmisión interhumana, logrando prevenir estas infecciones. Inicialmente estas vacunas se desarrollaron con el polisacárido capsular polirribosil-ribitol-fosfato (PRP) aislado, pero al ser un antígeno timo-independiente, su inmunogenicidad no era adecuada para la aplicación en niños menores de 2 años, y la protección humoral generada no perduraba en el tiempo^[3,4]. Actualmente se utilizan vacunas conjugadas, donde el polisacárido capsular de Hib se une químicamente a una proteína *carrier* que actúa acentuando la respuesta inmunológica del vacunado y permitiendo obtener respuestas inmunes con memoria celular a partir de los dos meses de edad^[3-5].

En Argentina, desde 1998, las vacunas anti-Hib están incluidas en el Calendario Nacional de Inmunizaciones para niños a partir de los 2 meses de edad, y desde su introducción en el calendario, las tasas de incidencia de meningitis por Hib mostraron un

marcado descenso alcanzando tasas nacionales de alrededor de 0,1 casos por 100.000 habitantes^[1,2]. A nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la cobertura con tres dosis de la vacuna contra Hib al año 2019 alcanzó un 72%, y a nivel local para el mismo año, el Ministerio de Salud de la Nación de nuestro país reportó que la 3^{ra} dosis de la vacuna quintuple (DTP-HB-Hib) en niños y niñas de seis meses de edad alcanzó una cobertura del 83%^[6,7].

En Argentina principalmente se utilizan aquellas anti-Hib que están conjugadas a toxoide tetánico (TTd), dentro de las cuales se distinguen dos formas de presentación disponibles^[8].

a. El componente de Hib (PRP-TTd) se encuentra en una suspensión estable junto a otros componentes antigénicos propios de otras vacunas que se aplican en simultáneo, por ejemplo, en las pentavalentes donde se combinan las vacunas anti-tetánica, anti-diftérica, anti-pertúsica, anti-hepatitis B y anti Hib (DTP-HB-Hib).

b. El componente de Hib (PRP-TTd) se presenta como polvo liofilizado en un vial separado del diluyente de la vacuna y/o de otras vacunas que se combinan luego para la administración.

Si bien operativamente la forma ya combinada de varias vacunas en una suspensión estable es la más práctica a la hora de inocular a la población objetivo, y es la forma que más se fomenta para la producción de aquellas que son administradas en simultáneo, el desarrollo metodológico del presente trabajo se orientó únicamente a la detección del componente Hib. Esto requirió un primer acercamiento al analito de interés lo más aisladamente posible, por lo que se trabajó con la presentación monocomponente de Hib en forma de polvo liofilizado.

El PRP que conforma estas vacunas se caracteriza por ser una secuencia polimérica del azúcar fosfatado de largo variable, y por lo tanto no posee un peso molecular único, sino que es una mezcla con diferente abundancia de varios pesos moleculares. En los procesos de producción de estas vacunas, el largo de cadenas polisacáridicas es un parámetro de calidad del proceso productivo, y es controlado mediante el uso de técnicas de cromatografía de exclusión molecular^[5,9-14]. Estas técnicas cromatográficas también se utilizan como un complemento en el control de proceso de conjugación.

Existe el antecedente metodológico de producción y control en proceso de vacunas anti-Hib con PRP-TTd como ingrediente

farmacéutico activo, desarrollada por el Instituto de Vacunas de los Países Bajos (NVI por sus siglas en inglés, actualmente Intravacc) en 1998 para la transferencia de tecnología a los fabricantes de vacunas emergentes, con el objetivo de contribuir así a un suministro sostenible de vacunas Hib asequibles a países de ingresos bajos y medios, y a los Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM) de las Naciones Unidas para reducir la mortalidad infantil. Esta metodología se utilizó como base para el desarrollo en este trabajo^[15-17].

El objetivo principal fue desarrollar una técnica por cromatografía de exclusión molecular que permita detectar la presencia del analito inmunológicamente activo y de interés, PRP-TTd, así como también indicios de inestabilidad de la formulación y/o parámetros de calidad de la producción, como son la presencia tanto del PRP como del toxoide tetánico libre, o compuestos de peso molecular menor al esperado para el producto. Estos analitos libres y el cambio en la distribución del peso molecular del conjugado PRP-TTd pueden ser resultado de hidrólisis que indicarían problemas de estabilidad de la formulación; o producto de conjugaciones incompletas o déficit en la purificación de la materia prima conjugada previo a la formulación de la vacuna. Por lo tanto, el desarrollo de esta metodología permitiría obtener información relevante sobre la calidad de estas vacunas, que ampliamente se utilizan en la población infantil y de manera obligatoria en Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipamiento y condiciones cromatográficas

Se utilizó un cromatógrafo líquido (ThermoScientific Dionex™ UltiMate™ 3000), con detector de arreglo de diodos y acoplado al detector de índice de refracción (Refracto Max 521).

El muestreador automático se configuró a una temperatura de 2-8°C y el horno de columnas a 35°C. Se utilizó un sistema de columnas Shodex® OH pak en tándem: Guarda-columna SB-G (50 x 6,0 mm, Cód: F6709430), y columnas SB-805 (300 x 8,0 mm, Cód: F6429104) y SB-804 (300 x 8,0 mm, Cód: F6429103). El detector UV-visible se monitorizó a longitudes de onda fija de 215 y 280 nm, el detector de índice de refracción a una temperatura de 35°C y tiempo de estabilización de una hora. La fase móvil utilizada fue *buffer* PBS 0,01M pH 7,2 ± 0,1 y el modo de elución fue isocrático a un flujo de 0,8 ml/min. Los tiempos de corrida por inyección fueron de 40 minutos y los volúmenes de inyección se encontraban en el rango de 25 a 100 µl.

El *software* utilizado para el tratamiento de los datos fue el *Chromleon* versión 7.1^[18].

Reactivos y estándares

Todos los solventes utilizados para preparar la fase móvil, soluciones de trabajo y soluciones estándares, fueron de calidad HPLC, y todas las preparaciones realizadas fueron filtradas por una membrana de poro de 0,22 µm antes de ser utilizadas en el equipo cromatográfico. Los reactivos y estándares utilizados fueron:

- Etilenglicol (C₂H₆O₂), grado min 99%, (Mallinkrodt, N° producto: 5001).
- Óxido de Deuterio (D₂O), grado min 99.9% atom D, MagniSolv (Merck, 1.13366.0100).
- Blue Dextran (PM: 2000 kDa), (Sigma, N° producto: D5751)
- Estándares Pullulan para Pesos Moleculares, Shodex® STANDARD P-82 (Mw 5000 - 642.000).
- WHO 2nd International Standard for Haemophilus influenzae polysaccharide Polyribosyl Ribitol Phosphate (PRP) NIBSC. Lote: 12/306.
- 2nd International Standard-Tetanus Toxoid for Flocculation Test NIBSC. Lote: 04/150.

Muestra seleccionada

Lotes de vacunas que contienen PRP-TTd como Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA), presente en la formulación como polvo liofilizado, contenido en un vial separado del resto de los componentes del producto o cuya presentación sea monocomponente, y que se comercializan en la Argentina.

Soluciones utilizadas

Fase móvil - Solución *buffer* PBS 0,01 M, pH 7,2. Para preparar 1 litro de solución, se pesaron exactamente alrededor de 8,8 g de NaCl, 1,09 g de Na₂HPO₄ anhidro y 0,32 g de NaH₂PO₄·H₂O. Se disolvió en agua calidad milliQ (0,055 µS), se ajustó pH a 7,2 ± 0,1 y se filtró por membrana de nylon con poro de 0,22 µm. Se conservó a 2-8°C, por hasta 2 semanas. Luego de ese período de conservación, se comprobó la integridad de la solución, mediante observación del aspecto y medición de pH, y se utilizó luego de un reemplazo por membrana de 0,22 µm.

Solución de guardado de columnas - Solución de azida sódica 0,05% p/v

Solución de lavado y guardado de equipo - Acetonitrilo-Agua (90:10)

Solución estándar de PRP concentrado (2,45 µg/µl). Se reconstituyó el polvo liofilizado del estándar NIBSC PRP- (concentración 4,9 mg/ampolla) según las indicaciones del inserto, en 2 ml de solución *buffer* PBS 0,01 M, pH 7,2. A partir de esta solución se realizaron las subsecuentes diluciones necesarias, en solución *buffer* PBS 0,01 M, pH 7,2. El remanente de todas las soluciones se conservó a -20°C por hasta un año.

Solución estándar de Td concentrado (0,69 Lf/µl). Se reconstituyó el polvo liofilizado del estándar NIBSC Td (concentración 690 Lf/ampolla) según las indicaciones del inserto, en 1 ml de solución *buffer* PBS 0,01 M, pH 7,2. A partir de esta solución se realizaron las subsecuentes diluciones necesarias, en solución *buffer* PBS 0,01 M, pH 7,2. El remanente de todas las soluciones se conservó a 4°C por hasta un año.

Solución estándar de etilenglicol 0,5% v/v. Para preparar 1,5 ml, se tomaron 1492,5 µl de solución *buffer* PBS 0,01 M, pH 7,2 y se agregaron 7,5 µl de etilenglicol. Se preparó directamente en el vial a utilizar para la corrida cromatográfica.

Solución estándar de *blue dextrán* (1 mg/ml) y óxido de deuterio (2,5% v/v). Para preparar 2 ml, se pesaron exactamente alrededor de 2 mg de *blue dextrán*, y se adicionaron sin mezclar, 1950 μ l de solución *buffer* PBS 0,01 M, pH 7,2. Se dejó incubando *overnight* y al día siguiente se agregaron 50 μ l de óxido de deuterio. Se agitó suavemente en oscilador orbital durante 30 minutos.

Solución madre estándar Pullulan P-5, P-100 o P-800 (2 mg/ml). Para preparar 10 ml, se pesaron exactamente alrededor de 20 mg del estándar Pullulan correspondiente (P-5, P-100 o P-800), y se adicionaron sin mezclar, 10 ml de solución *buffer* PBS 0,01 M, pH 7,2. Se dejó incubando *overnight* a 4°C y al día siguiente se mezcló en oscilador orbital durante 30 minutos. A partir de la solución madre obtenida se realizaron las soluciones estándar de trabajo descriptas a continuación. El remanente se conservó y es estable por hasta cinco años a -20°C.

Solución estándar Pullulan P-5, P-100 o P-800 (0,5 mg/ml). Para preparar 4 ml, se tomó 1 ml de la solución madre estándar (2 mg/ml) y se agregaron 3 ml de solución *buffer* PBS 0,01 M, pH 7,2. Se filtró por membrana de nylon de 0,2 μ m. El remanente se conservó a -20°C por hasta cinco años.

Solución mix Pullulan P-5, P-100 y P-800 (0,5 mg/ml). Para preparar 4 ml, se tomó 1 ml de cada solución madre estándar (2 mg/ml) de los diferentes Pullulan, y se agregó 1 ml de solución *buffer* PBS 0,01 M, pH 7,2. Se filtró por membrana de nylon de 0,2 μ m. El remanente se conservó a -20°C por hasta cinco años.

Solución matriz de excipientes. Se preparó utilizando todos los excipientes presentes en los productos analizados en concentraciones equivalentes a un vial de muestra evaluada reconstituida con 1 ml de solución *buffer* PBS 0,01 M, pH 7,2. Se filtró por membrana de nylon con poro de 0,22 μ m y se conservó el remanente a 2-8°C por hasta un año, refiltrando antes de usar.

Solución muestra. Se reconstituyeron 5 viales monocomponente de polvo liofilizado, con 1 ml de solución *buffer* PBS 0,01M, pH 7,2 cada uno, y se hizo un pool. Luego se enjuagó un tubo de ultracentrifugación Amicon® Ultra-15 10K con 5 ml del mismo *buffer*, centrifugando a 4000 rcf durante 15 minutos. Posteriormente en el mismo tubo se centrifugó el pool de muestras a 4000 rcf durante 15 minutos. A partir del volumen final obtenido, se estimó la concentración de PRP-TTd/ μ l.

RESULTADOS

Adecuabilidad del sistema

En la **Tabla 1** se muestran los resultados obtenidos por el Instituto Nacional de Medicamentos (INAME) de ANMAT y la comparación realizada frente al sistema cromatográfico utilizado por el NVI, donde se detalla la diferencia porcentual en los volúmenes de elución obtenidos para los diferentes analitos contemplados.

Debido a la inaccesibilidad al reactivo dextrán industrial (PM: 5000 - 40000 kDa) por falta de producción comercial, se utilizó Blue Dextrán (PM: 2000 kDa) para determinar el volumen vacío del sistema de columnas, pero al ser diferentes entidades y poseer diferentes pesos moleculares, sus volúmenes de elución no fueron comparables.

Aproximación a especificidad

En las **Figuras 1a, 1b y 1c** se observan los gráficos correspondientes a perfiles cromatográficos superpuestos obtenidos mediante la detección por índice de refracción y detecciones UV a 215 y 280 nm, para Solución Muestra y Solución Matriz de Excipientes, ambas a un mismo volumen de inyección y concentración.

La detección a los 28 minutos de picos cromatográficos similares en ambas soluciones indica que corresponden a la matriz de excipientes presente en ambas. El pico cromatográfico detectado al UV a los 16 minutos, solamente se observa en la Solución Muestra, por lo que se asume que corresponde al ingrediente farmacéutico activo PRP-TTd (la parte proteica absorbe al UV).

En la **Figura 2** se observa un gráfico correspondiente a perfiles cromatográficos superpuestos obtenidos mediante la detección por índice de refracción, para Solución Muestra, Solución Estándar de Polirribosil-ribitol-fosfato (PRP) concentrado (2,45 μ g/ μ l) y Solución Estándar de Toxoide tetánico (TTd) concentrado (0,69 Lf/ μ l).

Habiendo establecido que los excipientes de la muestra y de los estándares se corresponden a los picos de magnitudes mayores que se observan a los 28 minutos, la detección en el rango de tiempo de elución de 14 a 26 minutos de 3 picos cromatográficos distinguibles entre sí y no superponibles entre las 3 inyecciones, se atribuyen a los analitos PRP-TTd, PRP y TTd.

Estimación de pesos moleculares

En la **Figura 3** se ejemplifica uno de los cromatogramas obtenidos con los estándares Pullulan utilizados en este trabajo, donde se observa el perfil cromatográfico de la mezcla.

Los primeros picos observados a tiempos de elución aproximados de 17, 21 y 25 minutos, corresponden a los estándares Pullulan P-800, P-100 y P-5, respectivamente, componentes de la mezcla analizada.

A partir de los cromatogramas obtenidos, se adquirieron los tiempos de elución de cada componente para su posterior análisis y construcción de las curvas de calibración.

En las **Figuras 4a y 4b** se grafican las curvas de calibración para la estimación de pesos moleculares, obtenidas a partir de los estándares Pullulan utilizados en este trabajo. En la **Tabla 2** se detallan los resultados de estimación de pesos moleculares de los analitos PRP libre, PRP conjugado a TTd y TTd libre, y su comparación frente a los pesos moleculares estimados de los mismos analitos por NVI.

Los datos teóricos de pesos moleculares fueron obtenidos del trabajo realizado por NVI en 2007^[15]. La estimación de pesos moleculares para los analitos PRP y TTd libres se realizó mediante la curva de calibración polinomial de 3er grado (**Figura 4a**), y para PRP-TTd mediante la curva de calibración lineal (**Figura 4b**).

TABLA 1: COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS: CONTROL DE PRODUCTO TERMINADO (INAME) FRENTE A CONTROL EN PROCESO (NVI).

Analito	NVI	Sistema desarrollado en INAME	% de diferencia
	Volumen elución (ml)	Volumen elución (ml)	
PRP libre	13,81	13,78	0,2
TTd libre	17,24	17,42	1,0
PRP-TTd	12,99	13,14	1,1
Dextrán industrial	10,8	-	-
Dextrán Blue	-	13,90	-
Óxido de Deuterio	24,5	24,91	1,7
Pullulan P-800	13,4	13,84	3,3
Pullulan P-100	16,9	16,90	0,02
Pullulan P-5	19,9	20,04	0,7
Etilenglicol	22,8	23,18	1,7
Tiempo de análisis	30 min	40 min	-

TABLA 2: ESTIMACIÓN DE PESOS MOLECULARES.

Analito	Mp teórico(a) (kDa)	Volumen elución (min)	Mp estimado (kDa)	Mp estimado promedio (kDa)	SD (kDa)	CV %	% de diferencia frente al Mp teórico
PRP (estándar)	625	15,19	437,30	440,2	9,7	2,2	29,6
		15,14	451,01				
		15,21	432,39				
TTd (estándar)	50 (b)	17,42	64,09	63,6	0,5	0,8	27,2
		17,44	63,07				
		17,43	63,58				
PRP-TTd (muestra)	1327	13,10	1454,85	1423,3	19,6	1,4	7,3
		13,15	1402,25				
		13,13	1419,57				
		13,13	1425,68				
		13,14	1414,35				

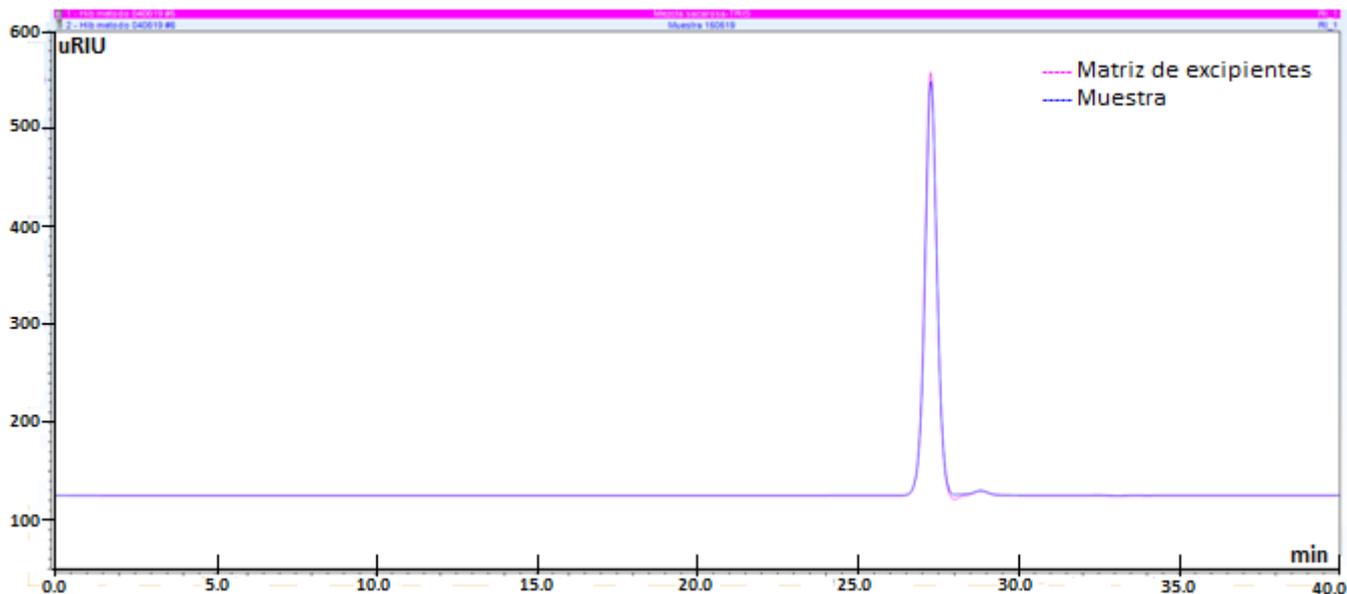


FIGURA 1A: Detección por índice de refracción de soluciones muestra y matriz de excipientes.

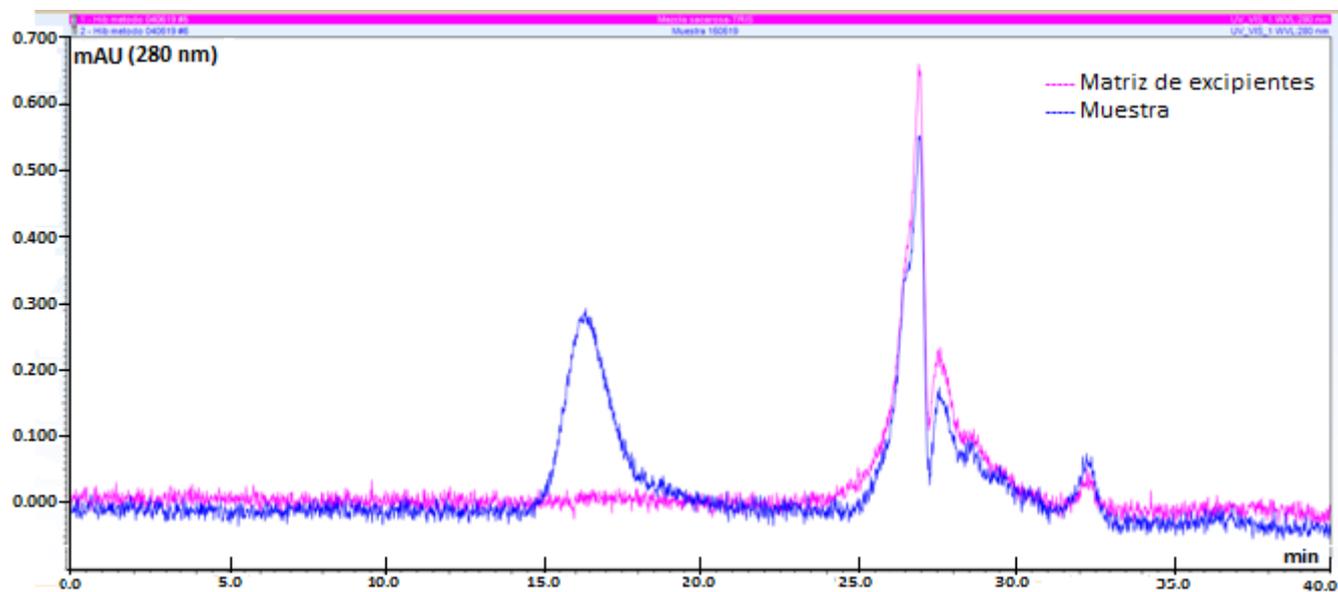


FIGURA 1B: Detección a 280 nm (uv) de soluciones muestra y matriz de excipientes.

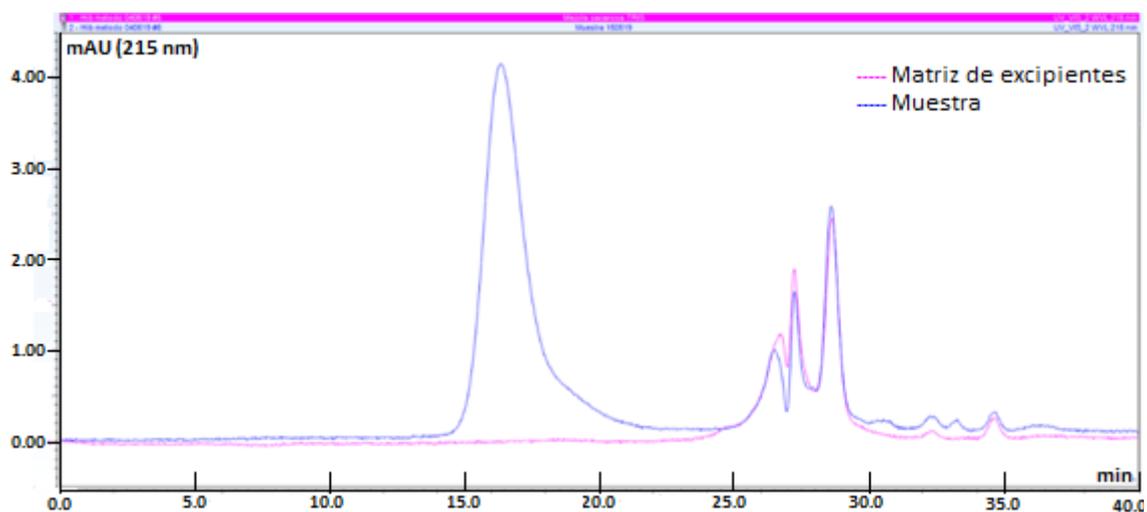


FIGURA 1C: Detección a 215 nm (uv) de soluciones muestra y matriz de excipientes.

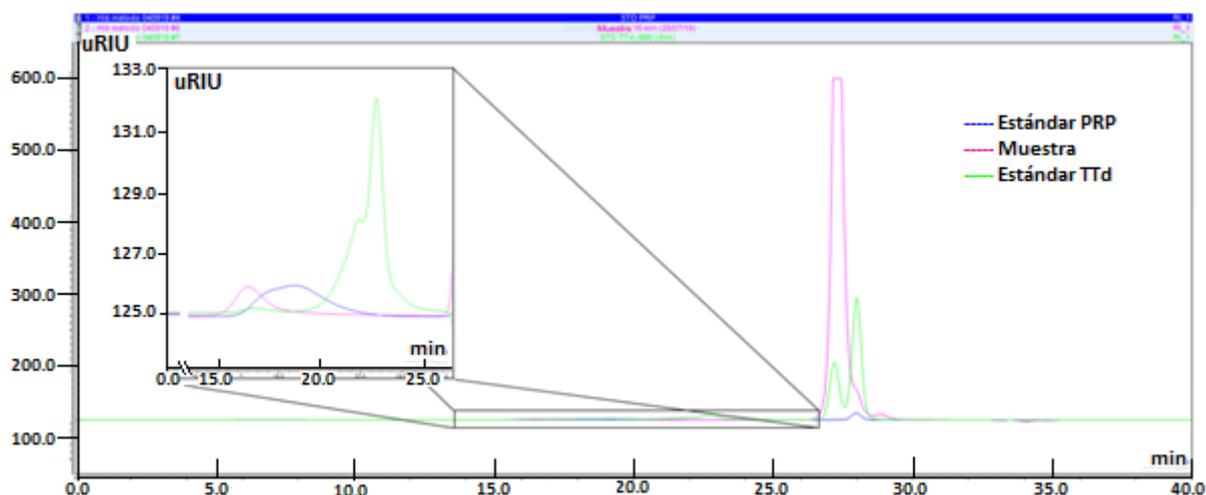


FIGURA 2: Detección por índice de refracción de soluciones muestra y estándares de prp concentrado y toxide tetánico concentrado. La ampliación del cromatograma en el tiempo de corrida de 14 a 26 min abarca los tres picos atribuibles a los principios activos de cada solución.

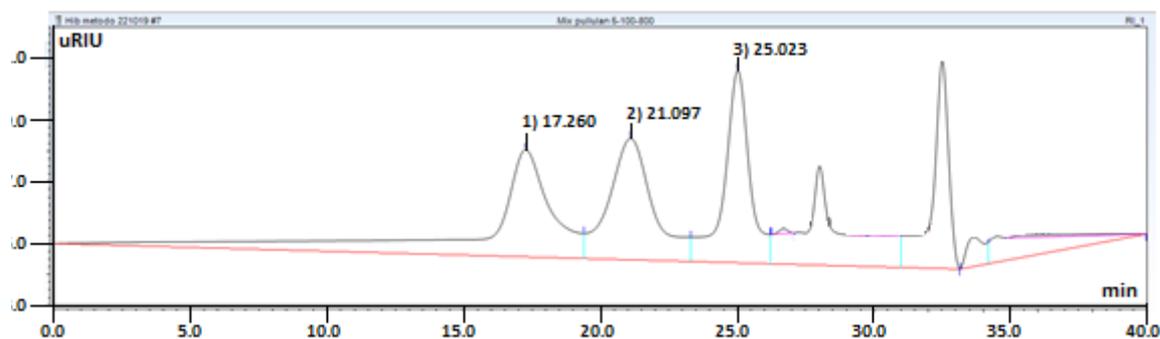


FIGURA 3: Detección por índice de refracción de la solución mix pullulan p-5, p-100 y p-800. Los picos correspondientes a cada componente de la mezcla se observan separados y con su respectivo tiempo de elución.

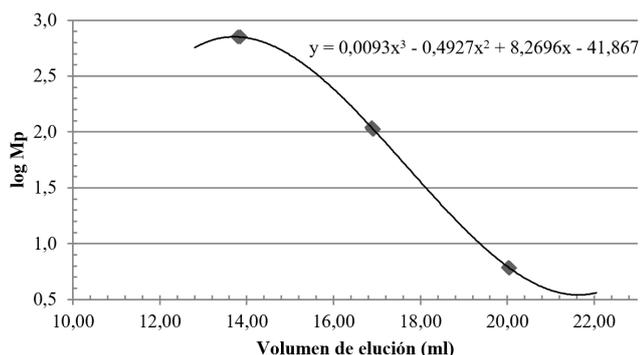


FIGURA 4A: Curva de calibración polinomial de 3er grado estándares pullulan (p-5, p-100 y p-800).

El gráfico fue obtenido mediante el análisis de los volúmenes de elución de los estándares pullulan y el logaritmo de sus pesos moleculares.

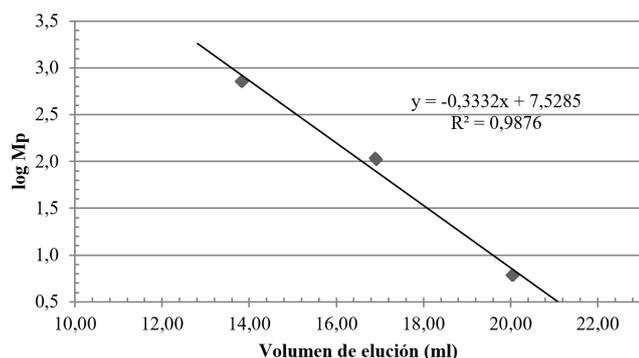


FIGURA 4B: Curva de calibración lineal de estándares pullulan (p-5, p-100 y p-800).

El gráfico fue obtenido mediante el análisis de los volúmenes de elución de los estándares pullulan y el logaritmo de sus pesos moleculares.

DISCUSIÓN

La adecuabilidad del sistema cromatográfico elegido fue el primer y más importante aspecto a evaluar. Se consideró que el principal desafío en el desarrollo de este trabajo provenía de la adaptación de una metodología ideada para el análisis de producto a granel en una etapa de control de proceso, a condiciones de análisis de producto terminado. Mediante pruebas iniciales con las condiciones preestablecidas en el antecedente metodológico de NVI, se establecieron las bases del procedimiento operativo utilizado en los ensayos y se logró ajustar las condiciones de trabajo. Al comparar los volúmenes de elución obtenidos para los distintos analitos en ambas metodologías, se consideró que no hubo diferencias significativas.

Otro aspecto relevante fue la consideración de que un producto terminado, además de poseer el agregado de excipientes para la formulación final, posee concentraciones del activo mucho menores respecto al producto a granel. Esto significó que la concentración del principio activo evaluada en la técnica

original era, a fines prácticos de este trabajo, inalcanzable porque hubiese implicado cantidades de excipientes demasiado elevadas que pondrían en riesgo el equipo cromatográfico y las columnas. Existiendo el antecedente bibliográfico donde se utilizó la ultra centrifugación con filtros de *cut-off* de 10 kDa para remover excipientes (ej. sacarosa) presentes en la vacuna anti-Hib como producto terminado, se estableció esa técnica como pretratamiento de las muestras analizadas para eliminar parte de los excipientes contenidos.

Respecto a la capacidad del sistema cromatográfico utilizado y la metodología en desarrollo para discriminar los componentes de la muestra, se preparó una Solución Matriz de Excipientes, una solución placebo de la muestra que incluyó únicamente la matriz de excipientes. Al analizar los cromatogramas obtenidos, se pudo observar que efectivamente existía separación de los analitos de interés y excipientes presentes, en base a sus pesos moleculares, tal como se observa en las Figuras 1a, 1b y 1c. Adicionalmente al comparar los cromatogramas correspondientes a la Solución muestra y a las soluciones de los estándares de PRP y TTD libres presentes en la Figura 2, se observó una clara discriminación entre los picos y los tiempos de elución de los componentes de interés (PRP, TTD y PRP-TTD) presentes en ellos. La guía ICH Q2(R1)^[19] define a la especificidad como “La capacidad de evaluar en forma inequívoca al analito en presencia de los componentes cuya presencia cabría esperar, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz”. Bajo esa interpretación, los resultados obtenidos y observados en las Figuras 1a, 1b, 1c y 2 dan un indicio de especificidad de la técnica.

Con el objetivo de estimar los pesos moleculares relativos de los analitos presentes en las muestras, se realizó una curva de calibración de pesos moleculares a partir de las corridas cromatográficas de los tres estándares Pullulan seleccionados (P-5, P-100 y P-800) inyectados en forma aislada y como mix de partes iguales. A partir de los datos obtenidos, se construyó una curva de tipo polinómica de 3er grado, tal como señalaba la bibliografía de la metodología a adaptar. A partir de la gráfica obtenida, se observó la necesidad de realizar un análisis para obtener los límites mínimo y máximo locales de la función que describía la curva, que contemplaran el rango de valores utilizables para la estimación de pesos moleculares mediante la interpolación/extrapolación de datos experimentales. Los límites máximo y mínimo locales calculados para la curva polinómica establecieron el rango comprendido entre 13,71 y 21,63 ml, por fuera del cual los valores estimados de pesos moleculares no poseerían lógica, debido a las pendientes positivas que expresan una relación proporcional entre volumen de elución y peso molecular. Es por esto que la ecuación polinomial de 3er grado se utilizó para estimar solamente los pesos moleculares de los estándares de PRP y TTD. Para la estimación del peso molecular del PRP-TTD contenido en la muestra, se confeccionó una curva de calibración lineal. Finalmente, los resultados obtenidos se compararon frente a los obtenidos por NVI, habiendo diferencias menores al 30%.

Otro aspecto considerado en la planificación de este trabajo fue la posible aplicación de esta metodología en la detección de problemas relacionados a la estabilidad de la formulación. Existen antecedentes del desarrollo y uso de metodologías de cromatografía de intercambio aniónico con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) donde se logra evaluar cuantitativamente la presencia de PRP y PRP-TTd en este tipo de vacunas, obteniendo información sobre la estabilidad del producto como porcentajes de despolimerización de la cadena polirribosídica conjugada, o datos sobre el proceso de conjugación durante la producción^[20,21]. Estas metodologías se utilizan en la actualidad, e involucran técnicas de ultracentrifugación para la obtención de dos fracciones, una que contiene el PRP y otra el PRP-TTd, la posterior hidrólisis del contenido de cada una, y la separación cromatográfica y cuantificación de los componentes sacarídicos. La metodología planteada en este trabajo no requiere hidrolizar la muestra, lo que ofrecería una ventaja en la detección de aquellos indicios de inestabilidad asociados a variaciones en los largos de cadena polisacáridica, detectando cambios en los pesos moleculares del principio activo, aportando información complementaria en estudios de estabilidad del producto y en la elaboración de estudios de cinéticas de degradación.

CONCLUSIÓN

Se logró el desarrollo de una metodología para la determinación de polirribosil-ribitol-fosfato libre (PRP) y polirribosil-ribitol-fosfato conjugado a toxoide tetánico (PRP-TTd) presentes en vacunas anti *Haemophilus influenzae* tipo b, utilizando cromatografía de exclusión molecular acoplada a detectores por índice de refracción y por UV a longitudes de 215 y 280 nm. Dentro del proyecto también se alcanzaron objetivos específicos, entre los cuales podemos destacar la identificación de los componentes presentes en las vacunas que fueron analizadas, pudiendo discriminar los excipientes y principios activos en sus diferentes condiciones (PRP libre, TTd libre y PRP-TTd conjugado) obteniéndose así un perfil de pureza de la muestra. Esta diferenciación observada entre las distintas formas del principio activo permite plantear las bases para el desarrollo futuro de metodologías que puedan indicar en forma cuali o cuantitativa el grado de compromiso de la calidad en este tipo de vacunas.

Debido a dificultades metodológicas relacionadas al sistema cromatográfico surgidas a principios de 2020, y a causa de las medidas nacionales dictadas sobre Aislamiento Social, Preventivo y Obligatorio en el marco de la pandemia de SARS-CoV2, el proyecto quedó suspendido temporalmente. La instancia a la cual se llegó es aquella donde queda pendiente emprender el camino de la validación de la metodología, y expandir su aplicación a más muestras, y eventualmente considerar su uso en vacunas multivalentes. Es una metodología lograda y rica en información para el análisis de este tipo de productos complejos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Romanin V., Chiavetta L., Salvay M.C., Chiolo M.J., Regueira M., Barrios A., Califano G., García S., Gentile A. Vacuna anti-*Haemophilus influenzae* de tipo b (Hib) en el Calendario Nacional de Argentina: portación nasofaríngea de Hib tras 8 años de su introducción. Arch Argent Pediatr 2007; 105(6):498-505.
- 2- Gentile A., Martínez A.C., Juárez M., Lución M.F., Burgo C., Della Latta M.P., Rapaport S., Romanin V., Turco M. (2017). Meningitis por *Haemophilus influenzae* b: ¿estamos ante una reemergencia? 24 años de experiencia en un hospital pediátrico. Arch Argent Pediatr 2017;115(3):227-233.
- 3- WHO (2007) The Immunological Basis for Immunization Series. Module 9: *Haemophilus influenzae* type b. World Health Organization. Immunization, Vaccines and Biologicals, 2007.
- 4- Plotkin S., Orenstein W., Offit P., Edwards K. M. Plotkin's Vaccines (2018). Séptima Edición.
- 5- Zarei A. E., Almeshdar H. A., Redwan E. M. (2016). Hib Vaccines: Past, Present, and Future Perspectives. Journal of Immunology Research. Volume 2016, Article ID 7203587, 18 pages.
- 6- Cobertura vacunal mundial en 2019 – Organización Mundial de la Salud (OMS), 15 de julio de 2020 [consultado 28 Sept 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage>.
- 7- Coberturas de Vacunación por Jurisdicción. Calendario Nacional de Vacunación 2009-2019. Ministerio de Salud de la Nación, 2020. [consultado 28 Sept 2020]. Disponible en: <http://bancos.salud.gob.ar/recurso/coberturas-de-vacunacion-por-jurisdiccion-2009-2019>.
- 8- Base de datos de acceso público del VADEMECUM Nacional de Medicamentos. ANMAT (2020). [consultado 28 Sept 2020]. Disponible en: <http://anmatvademecum.servicios.pami.org.ar>.
- 9- WHO (2000). Annex 1: Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. WHO Technical Report Series, N°897, 2000.
- 10- Rana R., Dalal J., Singh D., Kumar N., Hanif S., Joshi N., Chhikara M.K. (2015). Development and characterization of Hib conjugate vaccine prepared using different polysaccharide chain lengths. Vaccine 33 (23) (2015), 2646-54.
- 11- European Pharmacopoeia (2018). *Haemophilus type b conjugate vaccine* (07/2018:1219). European Pharmacopoeia 9.5.
- 12- Farmacopea Argentina (2013). Vacuna contra *Haemophilus* tipo B conjugada. Volumen III, Farmacopea Argentina 7ma edición.
- 13- Thiébaud J., Fanget I., Jaudinaud I., Fourrichon L., Sabouraud A., Talaga P., Uhlrich S. (2014). Development and validation of high-performance size exclusion chromatography methods to determine molecular size parameters of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharides and conjugates. Analytical Biochemistry 453 (2014) 22-28.

- 14- Parisi L., von Hunolstein C. (1999). Determination of the molecular size distribution of *Haemophilus influenzae* type b tetanus toxoid conjugate vaccines by size exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 847 (1999) 209–211.
- 15- Netherlands Vaccine Institute (2007). International course on quality control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines.
- 16- Beurret M., Hamidi A., Kreeftenberg H. (2012). Development and technology transfer of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines for developing countries. *Vaccine* 30 (2012) 4897– 4906.
- 17- Hamidi A. (2016). Towards a sustainable, quality and affordable *Haemophilus influenzae* type b vaccine for every child in the world. The right to live. Tesis doctoral. Disponible en: <https://doi.org/10.4233/uuid:734f1261-0065-4572-b414-cdaa0b923689>.
- 18- Thermo Scientific™ Dionex™ Chromeleon™ 7.1 Chromatography Data System (CDS) software (2012).
- 19- ICH (2005) Q2 (R1), “Validation of analytical procedures: text and methodology”, ICH Harmonised Tripartite Guideline. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Chicago, USA, 2005.
- 20- Tsai C.M., Gu X.X., Byrd R.A. (1994) Quantification of polysaccharide in *Haemophilus influenzae* type b conjugate and polysaccharide vaccine by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Vaccine* 12 (1994) 700-706.
- 21- van der Put, R. M., de Haan, A., van den IJssel, J. G., Hamidi, A., & Beurret, M. (2015). HPAEC-PAD quantification of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide in upstream and downstream samples. *Vaccine* (2015) 33(48), 6908–6913.