

Seguridad preclínica de la vacuna Quimi-Hib® adyuvada con fosfato de aluminio durante el desarrollo del producto

✉ Dania Bacardí¹, Karelía Cosme¹, Lizet Aldana¹, Nelson Merino², José Suárez¹, Omar Mosqueda¹, Dioslaida Urquiza¹, Juan Romero¹, Roberto Madrigal¹, Rubén Amaya¹, Lourdes Hernández¹

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, CP 11 600, La Habana, Cuba

² Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos, Cidem
Calle 17 e/ 62 y 64, Playa, La Habana, Cuba
E-mail: dania.bacardi@cigb.edu.cu

RESUMEN

Haemophilus influenzae tipo b (Hib) es una bacteria gramnegativa causante de enfermedades como meningitis, neumonía, epiglotitis, celulitis, septicemia, artritis, entre otras, en los seres humanos. La meningitis causada por Hib es muy grave, con una tasa de muertes de más del 50 % en varias partes del mundo. Por tales razones, la obtención de una vacuna contra esta afección es una prioridad. El objetivo de este estudio fue evaluar la seguridad preclínica de la vacuna Quimi-Hib® (antígeno sintético de Hib conjugado con toxoide tetánico), en una formulación adyuvada con fosfato de aluminio, durante la etapa de desarrollo del producto. Los ensayos toxicológicos incluyeron estudios de toxicidad aguda (15 días), de tolerancia local (30 días) y de toxicidad a dosis repetidas (15 días), que incluyeron la dosis terapéutica de la vacuna. Se exploraron tres niveles de dosis de la vacuna y un placebo (excipientes más adyuvante), que se administraron por vía intramuscular a ratas Sprague Dawley de ambos sexos. Según nuestros resultados en el espectro de dosis explorado en las ratas, se concluyó que la vacuna conjugada Quimi-Hib® adyuvada en fosfato de aluminio no es tóxica, ni provoca efectos sistémicos adversos en esa especie. No se detectaron alteraciones macroscópicas en los órganos estudiados, y al evaluar el sitio de administración, solo se observaron induraciones causadas por granulomas macrófagos, resultantes del mecanismo de acción del adyuvante incluido en la formulación.

Palabras clave: vacunas, vacuna sintética, *Haemophilus influenzae* tipo b, seguridad, toxicidad

Biotechnologia Aplicada 2013;30:111-117

ABSTRACT

Preclinical safety of the Quimi-Hib® vaccine adjuvanted with aluminum phosphate during product development. *Haemophilus influenzae* type b (Hib) is a Gram-negative bacterium causing diseases such as meningitis, pneumonia, epiglottitis, cellulitis, septicemia and arthritis, among others. Hib-caused meningitis / Hib meningitis is a very serious disease with a death rate of more than 50 % throughout the world; therefore obtaining a vaccine against this bacterium is a goal of the highest priority. The present report presents the results of preclinical safety testing of the Quimi-Hib® vaccine (synthetic Hib antigen conjugated to tetanus toxoid) adjuvanted with aluminum phosphate. The battery of toxicological tests included acute toxicity (15 days), local tolerance (15 days) and repeated-dose toxicity (30 days), all of them evaluating the therapeutic dose of the vaccine as part of the studied experimental treatments. Three vaccine dose levels and a placebo (excipients plus adjuvant) were examined, administering the vaccine intramuscularly to Sprague Dawley rats of both sexes. After examining the data obtained from the administration of this wide range of doses to Sprague Dawley rats, it was concluded that the synthetic conjugate vaccine Quimi-Hib® adjuvanted in aluminum phosphate is not toxic and does not cause systemic adverse effects. No macroscopic alterations were observed in the studied organs, and the evaluation of the inoculation site only detected indurations caused by macrophage granulomas, resulting from the mechanism of action of the adjuvant included in the formulation.

Keywords: vaccines, synthetic vaccine, *Haemophilus influenzae* type b, safety, toxicity

Introducción

Haemophilus influenzae (Hib) es un cocobacilo pleomórfico, aerobio y gramnegativo, descubierto en 1892 por Richard Pfeiffer durante una pandemia de gripe. La bacteria coloniza la mucosa superior del tracto respiratorio de niños de 3 meses de edad. Aunque la mayoría de las cepas aisladas son no encapsuladas, también existen cepas con una cápsula de polisacárido. Hib es uno de los organismos causantes de meningitis, neumonía, epiglotitis, celulitis, septicemia, artritis, osteomielitis, pericarditis, colangitis, endocarditis y sinusitis [1]. La meningitis causada por Hib es una enfermedad muy grave, con una mortalidad de más del 50 % en varias partes del mundo,

y las secuelas en los sobrevivientes también suelen ser graves, pues la mitad de los enfermos presentan daños neurológicos [2].

Los niños pequeños son particularmente vulnerables a esta enfermedad porque el anticuerpo adquirido *in útero* se pierde a los 3 meses de edad. La inmunidad es adquirida de 5 a 6 años de edad si no hay una inmunización previa [3, 4].

Existen al menos cuatro vacunas conjugadas contra *H. influenzae* tipo b licenciadas en varios países, que son eficaces y seguras; pero ninguna de origen sintético ni de producción cubana. Están constituidas por el PRP conjugado a una proteína de origen bacte-

1. Robbins JB, Schneerson R. *Haemophilus influenzae* type b: the search for a vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 1987;6(8):791-4.

2. Ahmed N, Gottschalk S. How to design effective vaccines: lessons from an old success story. *Expert Rev Vaccines*. 2009; 8(5):543-6.

3. Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2012; 12(1):36-44.

riano. Una de ellas es la vacuna Quimi-Hib®, desarrollada a partir de la colaboración iniciada en 1989 entre el Laboratorio de Antígenos Sintéticos de la Facultad de Química de la Universidad de La Habana, el Instituto Finlay y el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB, La Habana, Cuba). Esta vacuna se compone por un fragmento del polisacárido capsular polirribosilribitolfosfato (PRP) de *H. influenzae* tipo b (10 µg), obtenido por síntesis química y conjugado covalentemente a 20 o 30 µg de anatoxina tetánica. Como referencia de protección en niños inmunizados se usa 1 µg/mL de título anti-PRP; pero 0.15 µg/mL supone una correlación inversa con la incidencia de la enfermedad en los no vacunados [5]. Un título de 1 µg/mL, tres semanas después de la inmunización, predice la protección por al menos 1 año [6, 7]. La vacuna está diseñada para la inmunización de niños en un esquema de 3 dosis: a los 2, 4 y 6 meses de edad, con dosis de 10 µg.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la seguridad de la vacuna Quimi-Hib® como candidato en una formulación adyuvada en fosfato de aluminio. Los ensayos toxicológicos comprendieron estudios de toxicidad aguda (15 días de duración), toxicidad a dosis repetidas (15 días), y de tolerancia local (30 días). Se exploraron tres niveles de dosis de la vacuna y un placebo de esta. La dosis terapéutica (DT) se incluyó en el estudio de tolerancia local. Se utilizaron ratas Sprague Dawley y la vía de administración fue intramuscular, recomendada para los estudios clínicos.

Materiales y métodos

Sistema de ensayos

En estudios previos a la evaluación de la seguridad del candidato vacunal, se determinó la actividad biológica del PRP en diferentes especies roedoras y lagomorfos; entre ellas, ratas Sprague Dawley, en grupos de 5 animales hembras por tratamiento (datos no mostrados). En cada dosis de 0.5 mL se evaluaron 10 µg de PRP. Como inmunógeno también se usaron otras preparaciones de vacunas monovalentes de Hib adsorbido a fosfato de aluminio, en las que se variaron las cantidades desde 2 hasta 20 µg de Hib. Esta evaluación de inmunogenicidad avaló el empleo de las ratas como especie de elección para los estudios de toxicología, ya que la respuesta de anticuerpos de tipo IgG obtenida fue superior a la de otros animales inmunizados con la vacuna comercial Hiberix® (GlaxoSmithKline).

En la evaluación de seguridad de la vacuna Quimi-Hib® adyuvada en fosfato de aluminio se empleó la línea de ratas Sprague Dawley, con los siguientes esquemas:

- Estudio de toxicidad aguda: 40 ratas (20 de cada sexo); peso promedio: 90 g.
- Estudio de tolerancia local: 76 ratas (38 de cada sexo); peso promedio: 90 g.
- Estudio de toxicidad a dosis repetidas: 110 ratas (55 de cada sexo); peso promedio: 98 g.

Los animales, procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (Cenpalab, Cuba), se examinaron clínicamente, se pesaron, se alojaron en

cajas de makrolón con lecho de bagazo de caña y se mantuvieron en observación durante 7 días, en condiciones ambientales controladas (a una temperatura entre 19 y 21 °C, humedad relativa promedio de 68 % y ciclos de luz-oscuridad de 12 h). El alimento (ALY co., Cenpalab, Cuba) se suministró diariamente a razón de 25 g por animal y se cuantificó el consumo diario. El agua se suministró *ad libitum*. Los ensayos se realizaron en el Bloque B de Toxicología, en la unidad del Bioterio (CIGB, La Habana, Cuba).

Formulación

Se empleó la formulación de la vacuna conjugada Quimi-Hib® adyuvada con fosfato de aluminio (CIGB, La Habana, Cuba). Cada bulbo de vacuna contenía 10 µg de PRP conjugado; de 20.8 a 31.25 µg de anatoxina tetánica; 0.05 mg/mL de timerosal, csp. y 0.25 mL de solución fosfato. La ampollita con la formulación adyuvante contenía 7.072 mg/mL de adyuvante fosfato de aluminio; 0.05 mg/mL de timerosal y 0.25 mL de solución fosfato, csp. El informe de análisis emitido por la Dirección de Calidad del CIGB confirmó la esterilidad, la apirogenicidad, el pH y la seguridad general de este producto. Los resultados de los ensayos fueron satisfactorios.

Diseño experimental

Los estudios se diseñaron siguiendo las regulaciones descritas por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) [8-10]. Los animales se escogieron de manera aleatoria, siguiendo una lista generada por el software Aleator (CIGB, La Habana, Cuba; versión 1.1, 1997). Las dosis se administraron por vía intramuscular. Se evaluaron tres niveles de dosis, con el objetivo de establecer un amplio margen de seguridad. Se consideró la presencia de un antígeno de origen sintético y la DT se probó hasta 45 veces. Esta se corresponde con el volumen máximo permisible según la vía de administración y la especie empleada, lo que constituye el patrón para establecer el límite superior de dosis y toxicidad en el diseño experimental propuesto. En los estudios de tolerancia local y de toxicidad a dosis repetidas se incluyó un grupo satélite, al que se inoculó la dosis alta aplicada en cada uno de estos diseños, con el objetivo de evaluar la reversión de los efectos adversos reportados (Tabla 1).

Las dosis se calcularon según el peso corporal de los animales. Al inicio del estudio, el peso corporal tenía un valor medio entre 80 y 100 g. Se tomó 6 kg como peso promedio de un lactante humano de 8 semanas. La DT recomendada para los estudios clínicos previstos fue 10 µg. La sustancia de ensayo se aplicó en el cuádriceps femoral de las extremidades posteriores [11].

Clínica, sacrificio y toma de muestras

Diariamente se observaron los animales, con el fin de reconocer alguna variación en el comportamiento o algún signo de toxicidad, cambios en la piel y en el pelo, en los ojos y en las membranas mucosas, en los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, y en la actividad somatomotora. Para la evaluación de la tolerancia local, se consideraron los indicadores histológicos: presencia de polimorfos nucleares, edema local, hiperemia aguda, hemorragia

4. Fitzwater SP, Watt JP, Levine OS, Santosham M. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines: considerations for vaccination schedules and implications for developing countries. Hum Vaccines. 2010;6(10):810-8.

5. Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. Clin Microbiol Rev. 2000;13(2):302-17.

6. Plotkin SA. Correlates of protection induced by vaccination. Clin Vaccine Immunol. 2010;17(7):1055-65.

7. Verez-Bencomo V, Fernandez-Santana V, Hardy E, Toledo ME, Rodriguez MC, Heynngnezz L, et al. A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against *Haemophilus influenzae* type b. Science. 2004;305(5683):522-5.

8. European Medicines Agency. CPMP/SWP/465/95. Note for guidance on pre-clinical pharmacological and toxicological testing of vaccines (CPMP adopted Dec 97). London: EMA; 1997 (cited 2012 Apr 16). Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004004.pdf

9. European Medicines Agency. CPMP/SWP/1042/99. Note for guidance on repeated dose toxicity (CPMP adopted July 2000). London: EMA cited 2012 Apr 16). Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003102.pdf

10. European Medicines Agency. CPMP/ICH/286/95. Note for guidance on Non-clinical safety studies for the conduct of Human clinical trials for pharmaceuticals. ICH M3 (R2). 2008. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002941.pdf

11. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J Appl Toxicol. 2001;21(1):15-23.

Tabla 1. Diseño experimental del estudio de seguridad preclínica de la vacuna Quimi-Hib® adyuvada con fosfato de aluminio en su etapa de desarrollo

Tipo de estudio (n)	Grupos	Inmunógeno	Ratas/ sexo	Dosis	Volumen / peso corporal	Frecuencia	Sacrificio (animales / grupo y día)
Toxicidad aguda (40)	I	Placebo*	5	1	2 mL/kg	Día 1	Día 15
	II	15 DT					
	III	30 DT					
	IV	45 DT					
Tolerancia local (76)	I	Control sin tratar	7	4	1.5 mL/kg	Cada 72 h	24 h (2) días 7 (6) y 14 (6)
	II	Placebo					
	III	DT					
	IV	10 DT					
	V	20 DT					
	VI †	20 DT	3				Día 28 (6)
Toxicidad a dosis repetidas (110)	I	NaCl 150 mM	5	14	1 mL/kg	Diaria	Día 15 (10) Día 15 (20)
	II	Placebo					
	III	10 DT					
	IV	20 DT					
	V	30 DT					
	VI †	30 DT					Día 30 (20)

* Excipientes más fosfato de aluminio como adyuvante.

† Grupo satélite para el estudio de la reversión de los efectos adversos.

DT: Dosis terapéutica de 0.13 µg en ratas Sprague Dawley de 90 g, equivalente a la dosis terapéutica de 10 µg en seres humanos.
n: animales en cada ensayo.

y necrosis de las fibras musculares. Los animales se pesaron con una frecuencia semanal. El sacrificio se efectuó mediante dislocación cervical, luego de un tratamiento anestésico en cámara de gases (CO₂). Durante la necropsia se observaron todos los órganos por microscopía. Se tomaron muestras de hígado, bazo, ganglios mesentéricos, timo y del sitio de administración, para posteriores estudios histopatológicos. Además, para el estudio de dosis repetidas y se determinaron los parámetros hematológicos complementarios: eosinófilos, hematocrito, hemoglobina, hemoglobina corpuscular media, volumen corpuscular medio, concentración de hemoglobina corpuscular media, leucocitos, plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos. También se pesaron los órganos diana: hígado, bazo y timo.

Procesamiento de los datos

Las variables para el tratamiento estadístico fueron el peso corporal, el consumo de alimento promedio semanal, los resultados hematológicos, el peso de los órganos y los hallazgos histopatológicos. Se estimaron las medidas de tendencia central y de dispersión (media, desviación estándar, valores máximos y mínimos). Para los análisis del peso corporal y del consumo de alimento se verificaron los supuestos de normalidad (prueba de Shapiro-Wilks con corrección de Bonferroni para la interpretación del error alfa en análisis pareados) y la homogeneidad de varianza (prueba de Levene) en cada tiempo de evaluación y para cada sexo. Se aplicaron análisis de varianza paramétrico (Anova) o la alternativa no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis), en dependencia del cumplimiento de los supuestos de distribución. Se efectuaron comparaciones pareadas en los intervalos consecutivos, mediante la prueba t pareada o la prueba de Wilcoxon.

Se analizaron los datos resultantes del estudio histopatológico, mediante tablas de clasificación cruzadas, con la prueba de independencia asociada (prueba exacta de Fisher).

Resultados

Evaluación de la toxicidad aguda

Peso corporal y consumo de alimento

En los pesos corporales de los animales se apreciaron diferencias significativas: los días 7 y 14 hubo un incremento esperado con respecto al día inicial en todos los grupos y entre sí, independientemente del sexo (Figura 1). Sin embargo, no se estimaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento para un mismo tiempo ($p > 0.05$, Anova). El incremento promedio del peso corporal

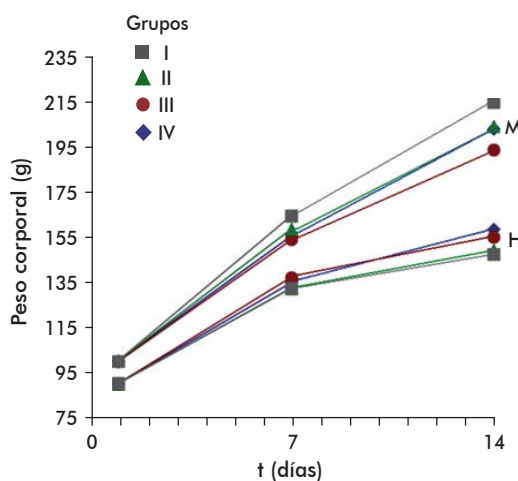


Figura 1. Comportamiento del peso corporal (media en gramos) de ratas Sprague Dawley inmunizadas con la vacuna Quimi-Hib® adyuvada con fosfato de aluminio durante el estudio de toxicidad aguda. En el tiempo 0 (día del inicio del estudio) se aleatorizaron los animales y definieron las dosis para la administración el día 1 a los grupos I (placebo, excipientes más fosfato de aluminio), y II al IV (15, 30 y 45 veces la dosis terapéutica, respectivamente). M: machos, H: hembras.

fue significativo durante la fase experimental del estudio ($p < 0.05$, Anova).

El consumo de alimentos fue similar en todos los estudios y de manera homogénea entre los grupos, cada día de evaluación: entre 15 y 18 g diarios (Figura 2).

El mayor consumo se evidenció durante los fines de semana (los días 5-6 y 12-13); comportamiento normal si se considera que en esos días los animales se someten a un estrés mínimo por manipulación. Los parámetros ambientales se mantuvieron estables y en los rangos establecidos para la especie utilizada (roedores) [12-14]. En el análisis entre los grupos de tratamiento no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$, test de Kruskal-Wallis).

Estudio clínico y macroscópico

Durante los estudios clínicos diarios, no se apreciaron signos tóxicos ni alteraciones en los animales, tampoco hubo muertes, y mostraron un comportamiento normal. En la evaluación macroscópica no se observaron signos de alteraciones en los órganos y tejidos inspeccionados.

Estudio histopatológico

En las muestras de tejido muscular se apreciaron signos histológicos de reacción inflamatoria, hemorragias o focos cicatrizantes; pero no hubo signos de alteración morfológica (Tabla 2).

La necrosis observada no era una lesión sobre el tejido muscular, sino una parte central del granuloma. No hubo diferencias apreciables entre el grupo placebo y los animales tratados con la vacuna. El grupo IV mostró menos afectación en el sitio de la inoculación (en 6 de 10 animales no hubo nada que señalar), lo cual fue significativo si se tiene en cuenta que a los animales de este grupo se les administraron 230 μ L de la vacuna adyuvada. En todos los grupos se observó hematopoyesis extramedular en el hígado y el bazo, hallazgo que es independiente de la vacuna y de las dosis aplicadas. A pesar de esto, en el análisis estadístico de la histopatología no hubo diferencias significativas entre los grupos. Los órganos evaluados (hígado, bazo y ganglios linfáticos) no mostraron alteraciones vinculadas con una posible toxicidad.

Evaluación de la tolerancia local

Peso corporal

En el peso corporal no hubo diferencias significativas entre los grupos, sino una ganancia acorde con la progresión temporal (Figura 3). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamientos para un mismo tiempo ($p > 0.05$, Anova). El incremento promedio del peso corporal fue significativo durante la evaluación.

Estudio clínico y macroscópico

El efecto sistémico más notorio fue la piloerección marcada en todos los grupos de animales, incluyendo el grupo placebo, en la segunda semana del estudio luego de dos aplicaciones. El único signo clínico durante el estudio fue la induración en el sitio de administración de la vacuna en los grupos II (placebo de excipientes más adyuvante), IV (dosis media), V (dosis alta) y VI (grupo satélite). Durante los primeros 4 días del estudio no se observó reacción local. A

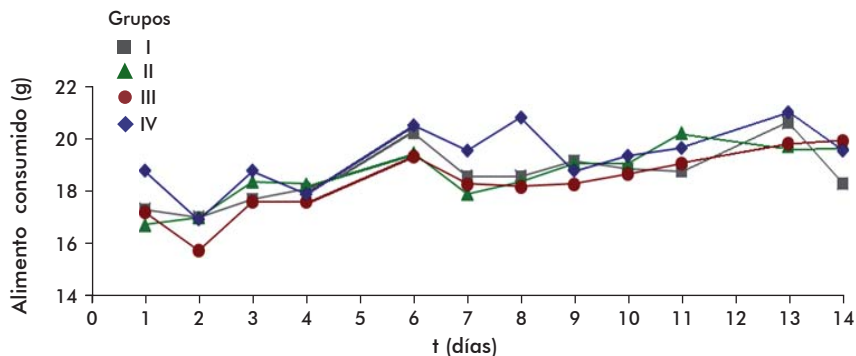


Figura 2. Comportamiento del consumo de alimento (media en gramos) en ratas Sprague Dawley inmunizadas con la vacuna Quimi-Hib® adyuvada en fosfato de aluminio durante el estudio de tolerancia local. En el tiempo 0 (día del inicio del estudio) se aleatorizaron los animales y definieron las dosis para la administración el día 1 a los grupos I (placebo, excipientes más fosfato de aluminio), y II al IV (15, 30 y 45 veces la dosis terapéutica de 0.13 μ g/animal, respectivamente). M: machos, H: hembras.

partir del día 5 aparecieron induraciones ligeras en los animales de los grupos II, V y VI, con la excepción de un animal del grupo VI. Estas permanecieron durante el estudio con diferentes grados de intensidad. Las

12. Cosme K. Programa para el Uso de Animales de Experimentación del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Edición 01;1998.

Tabla 2. Frecuencia de aparición de alteraciones microscópicas por grupos en ratas Sprague Dawley inmunizadas con la vacuna Quimi-Hib® adyuvada con fosfato de aluminio* en estudio de toxicidad aguda*

Grupos	Sitio de administración			
	GF	GM	N	NAS
I	7	1	6	2
II	6	0	4	3
III	4	4	7	2
IV	3	1	4	6

* Se aplicó una dosis en el ensayo. Grupos I (placebo, excipientes más fosfato de aluminio), y II al IV (15, 30 y 45 veces la dosis terapéutica de 0.13 μ g por animal, respectivamente). Ninguno de los animales mostró señales de hematopoyesis extramedular ni en el bazo ni en el hígado. Todos los grupos comprendieron 10 animales. GF: granuloma focal; GM: granuloma múltiple; N: necrosis; NAS: nada a señalar.

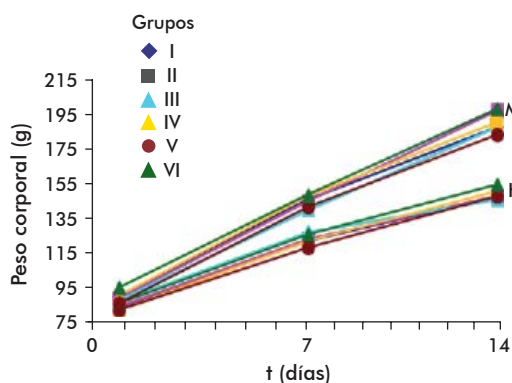


Figura 3. Comportamiento del peso corporal (media en gramos) en ratas Sprague Dawley inmunizadas con la vacuna Quimi-Hib® adyuvada con fosfato de aluminio durante el estudio de tolerancia local. En el tiempo 0 (día del inicio del estudio) se aleatorizaron los animales y definieron las dosis para la administración a partir el día 1 de las cuatro dosis cada 72 horas, para los grupos I (control no tratado), II (placebo, excipientes más fosfato de aluminio), y III al V (1, 10 y 20 veces la dosis terapéutica, respectivamente). M: machos, H: hembras. Grupo VI: grupo satélite para evaluar la reversión de efectos adversos. M: machos, H: hembras.

induraciones ligeras y moderadas se evidenciaron en los grupos que recibieron 10 y 20 veces la DT y en el grupo que recibió el placebo. Este último se inoculó con el mayor volumen. El grupo VI (satélite) se observó hasta el día 28 del estudio, con el objetivo de detectar la reversión de los efectos reportados. Si bien no se observó una reversión total, los reportes clínicos diarios evidenciaron la disminución paulatina del grado de severidad de la induración.

Durante la observación macroscópica en los cuatro sacrificios (a las 24 h; a los 7 y 14 días, y a los 28 días para el grupo satélite) se evidenció que no hubo daño en los sistemas de órganos. En el sitio de administración se apreciaron nódulos blancos, cuya magnitud e intensidad estuvo en correspondencia con la dosis y el volumen suministrados.

Estudio histopatológico

Transcurridas 24 h de la primera inyección, se observó movilización, concentración de macrófagos y la aparición de depósitos líquidos del inóculo en el sitio de la administración, como respuesta al suministro de una sustancia antigénica y a la presencia del adyuvante fosfato de aluminio en la formulación de la vacuna. Esta observación se repitió en los sacrificios a los 7, 14 y 28 días. Se apreció una intensidad variable, relacionada con las administraciones sucesivas y los niveles de dosis de la vacuna.

En el sacrificio a los 7 días de administración, después de dos inoculaciones de la formulación, la reacción local derivó en la aparición de granulomas macrofágicos difusos con depósitos eventuales de líquido, discreta respuesta de cicatrización en el seno de la reacción e infiltración linfocitaria sobre todo en la periferia, con diferentes grados de intensidad. Es preciso destacar que la reacción granulomatosa en el grupo III (DT) fue discreta. En el sacrificio, a los 14 días de administración (Tabla 3), después de cuatro inoculaciones de la formulación, la reacción en el sitio de administración continuó siendo la aparición de los granulomas descritos: reacción que se comportó de forma variable en los grupos estudiados. Su mayor frecuencia e intensidad se manifestó en los grupos tratados con la mayor dosis (V) y con los mayores volúmenes de adyuvante (II y V).

El grupo I (control no tratado) solo mostró hemato-poyesis extramedular en hígado (HEH) en 2 animales a los 7 días y 4 a los 14 días, y en bazo en 5 animales a los 7 y 14 días. No hubo otros hallazgos histopatológicos en este grupo durante el ensayo.

Ninguno de los animales del estudio mostró hemato-poyesis extramedular en hígado pasadas 24 h de la administración, ni alteraciones en ganglio ni en timo durante todo el estudio. Solo hubo respuesta inflamatoria discreta y hemato-poyesis extramedular en bazo en los grupos que recibieron formulaciones que contenían adyuvante (incluido el grupo adyuvante) y hemato-poyesis en hígado en el grupo III (DT).

Solo hubo evidencias de tejido de granulación en dos animales del grupo III (DT) a los 14 días.

En el grupo satélite solo se analizó la aparición de hallazgos histopatológicos a los 28 días, con intensidad de la reacción discreta en 4 animales y moderada en los otros dos, uno solo de ellos con hemato-poyesis extramedular. No se observaron otras alteraciones en este grupo.

La frecuencia de aparición de alteraciones en los demás parámetros se muestra en la tabla 3.

Evaluación de la toxicidad a dosis repetidas

Peso corporal y consumo de alimento

Los pesos corporales en ambos sexos fueron homogéneos en todos los grupos. Hubo una diferencia significativa en el incremento del peso corporal con respecto a la media del peso inicial de cada grupo. No se detectaron tales diferencias entre los grupos de tratamientos para un mismo tiempo ($p > 0.05$, Anova). El incremento promedio del peso corporal fue significativo entre el inicio y final del estudio para cada grupo, no así entre grupos, durante la fase experimental del estudio ($p < 0.05$, Anova) (Figura 4).

El consumo de alimentos en ambos sexos se comportó de manera homogénea entre los grupos para cada día de evaluación (entre 15 y 24 g diarios) (Figura 5). En los valores promedios se evidenció una disminución significativa del consumo de alimentos por los animales hembras pertenecientes al grupo I, el día 7 del ensayo, que se corroboró en el análisis entre grupos de tratamiento ($p > 0.05$, test de Kruskal-Wallis).

Tabla 3. Frecuencia de aparición de manifestaciones histopatológicas en el sitio de inoculación y en los órganos diana de respuesta inmunológica de ratas Sprague Dawley, tras la inmunización con la vacuna Quimi-Hib® adyuvada con fosfato de aluminio en el estudio de tolerancia local*

Grupos	24 h			7 días					14 días					
	RI†			RI					RI					
	D	HEH	HEB	D	M	S	HEH	HEB	D	M	S	TG	HEH	HEB
I	0	0	0	0	0	0	2	5	0	0	0	0	4	5
II	2	0	1	0	1	5	2	6	0	0	6	0	1	6
III	1	2	2	3	0	0	0	6	3	1	0	0	2	5
IV	1	0	2	2	4	0	2	5	1	3	2	0	3	5
V	2	0	2	1	5	0	1	6	0	6	0	0	0	6
VI‡	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4	2	0	0	0	1

* Datos correspondientes a dos animales por grupo a las 24 h y seis animales por grupo a los 7 y 14 días. Pasadas 24 h de la administración, solo hubo respuesta inflamatoria discreta. Se analizaron las posibles alteraciones en los ganglios y el timo, sin que se observaran en ninguno de los tiempos evaluados. Solo se observó tejido de granulación (TG) en el sitio de inoculación a los 14 días.

† RI: Reacción inflamatoria. Clasificada en discreta (D), moderada (M) o severa (S). A las 24 h solo se evaluó en 2 animales de los grupos I al V (I: control sin tratar; II: placebo de vacuna más fosfato de aluminio como adyuvante; III: dosis terapéutica de 0.13 µg por rata; IV y V: 10 y 20 veces la dosis terapéutica, respectivamente).

‡ VI: Grupo satélite inmunizado con 20 veces la dosis terapéutica para evaluar la reversión de los efectos adversos. Datos de la evaluación a los 28 días.

HEB: hemato-poyesis extramedular en el bazo; HEH: hemato-poyesis extramedular en el hígado; nd: no determinado.

13. Van Zutphen LFM, Balls M. Animal Alternatives, Welfare and Ethics. Developments in Animal and Veterinary Sciences. Amsterdam: Elsevier Science Ltd.; 1997.

14. Olfert ED, Cross BM, Mc William A. Guide to the care and use of experimental animals. 2nd ed. Ontario: Canadian Council on Animal Care; 1998.

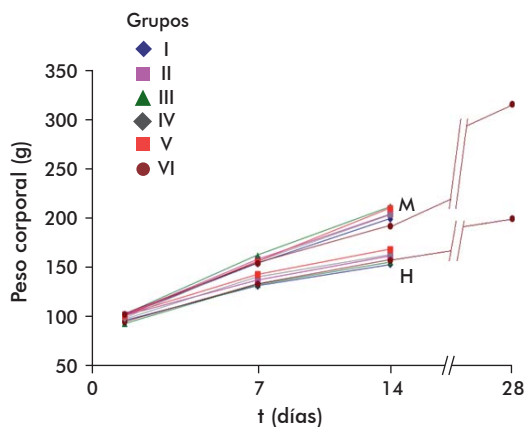


Figura 4. Comportamiento del peso corporal (media en gramos) en ratas Sprague Dawley inmunizadas con la vacuna Quimi-Hib® adyuvada con fosfato de aluminio durante el estudio de toxicidad a dosis repetidas. En el tiempo 0 (día del inicio del estudio) se aleatorizaron los animales y definieron las dosis para la administración diaria durante 14 días, para los grupos I (NaCl 150 mM), II (placebo, excipientes más fosfato de aluminio), y II al V (10, 20 y 30 veces la dosis terapéutica, respectivamente). Grupo VI: grupo satélite para evaluar reversión de efectos adversos. M: machos, H: hembras.

Estudio clínico y macroscópico

En los primeros 4 días posteriores al comienzo del estudio, no se evidenciaron signos de reacción local en el sitio de la inyección, ni otras alteraciones. La induración en este sitio se mantuvo en cada grupo en los días siguientes al estudio. Esta se percibió en todos los animales, y se clasificó como induración severa en los animales de los grupos placebo, dosis alta y satélite. También se observó en los animales del grupo III (10 veces la DT). La induración severa y los nódulos se evidenciaron en los grupos que recibieron dosis de 20 y 30 veces la DT y en el grupo placebo, a los cuales correspondió el mayor volumen de administración. En el grupo tratado con 10 veces la DT, la induración fue ligera. Al analizar los resultados hematológicos de los grupos del estudio, eran similares a los obtenidos en un grupo de animales del mismo lote que no se administró (grupo control no tratado). Las observaciones macroscópicas corroboran los estudios clínicos: el hallazgo fundamental fueron las formaciones blanquecinas de aspecto nodular. Los resultados tras el peso de los órganos carecieron de significación biológica por estar en el rango normal identificado para la especie.

Estudio histopatológico

En las muestras de tejido muscular se exploraron signos histológicos de reacción inflamatoria, hemorragias y focos cicatrizantes. Solo en presencia de dosis incrementadas de la vacuna se observó en todos los animales inmunizados la presencia de granulomas difusos en el área de inoculación, localizados mayormente en el endomisio de las fibras musculares con centros de depósitos líquidos y lisis celular del tejido granulomatoso, que alternaban con tejido de cicatrización y escasos polimorfonucleares eosinófilos. Los animales que recibieron el placebo no desarrollaron granulomas y solo tres animales del grupo placebo desarrollaron tejido cicatrizal. Ninguno de los animales

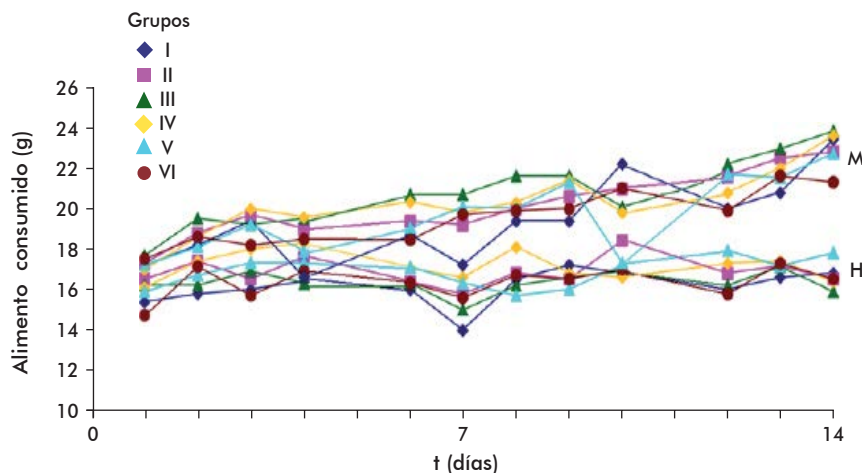


Figura 5. Comportamiento del consumo de alimento (media en g) en ratas Sprague Dawley inmunizadas con la vacuna Quimi-Hib® adyuvada en fosfato de aluminio durante el estudio de toxicidad a dosis repetidas. En el tiempo 0 (día del inicio del estudio) se aleatorizaron los animales y definieron las dosis para la administración diaria durante 14 días, para los grupos I (NaCl 150 mM), II (placebo, excipientes más fosfato de aluminio), y III al V (10, 20 y 30 veces la dosis terapéutica, respectivamente). Grupo VI: grupo satélite para evaluar reversión de efectos adversos. M: machos, H: hembras.

del estudio mostró daño hepático, y todos desarrollaron estimulación antigénica a nivel de bazo y ganglios mesentéricos. No hubo diferencias en la magnitud y estructura de la reacción local entre el grupo placebo y los grupos con tres niveles de sobredosis de la DT.

Discusión

El incremento sostenido del peso corporal y el consumo estable de alimento por los animales de los estudios preclínicos de seguridad de la vacuna conjugada Quimi-Hib® adyuvada en fosfato de aluminio son índices indirectos de su ausencia de toxicidad de esta formulación. Independientemente de la dosis, los animales aumentaron de peso de forma significativa durante la fase experimental de los estudios ($p < 0.05$) hasta el momento del sacrificio. No aparecieron variables en cada tiempo de evaluación que indicaran la influencia de las dosis de hasta 45 veces la DT en ambos parámetros, que registraron valores similares a los reportados para animales sanos de la especie [15]. Los análisis clínicos confirmaron la no toxicidad de las formulaciones y tratamientos ensayados, pues no se evidenciaron alteraciones etiológicas ni morfológicas que pudieran ser atribuibles a las sustancias en estudio. El análisis microscópico en cada estudio histopatológico confirmó el resultado de los análisis clínicos. Se observó una reacción inflamatoria en el sitio de aplicación de la vacuna, que varios autores han relacionado con la presencia del fosfato de aluminio como adyuvante. Este ha mostrado ser un eficaz potenciador de respuestas inflamatorias efectoras [16-18], caracterizadas fundamentalmente por la presencia de macrófagos, neutrófilos y células plasmáticas. Los focos cicatrizales y hemorrágicos son una respuesta al traumatismo de las inyecciones; incluso en ocasiones pueden ocurrir laceraciones y daños al músculo y la piel. La mayoría de los animales no presentaron alteraciones, lo cual favorece el uso de esta formulación vacunal. El estudio histopatológico demostró que el adyuvante fosfato de aluminio es el principal estimulante de la respuesta observada, pues

15. Harkness JE, Wagner JE. The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents. 4th ed. Philadelphia, PA: Lea and Febiger; 1995.

16. Lindblad EB. Aluminium adjuvants-in retrospect and prospect. *Vaccine*. 2004; 22(27-28):3658-68.

17. Gupta RK. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;32(3):155-72.

18. Harandi AM, Medaglini D, Shattock RJ. Vaccine adjuvants: a priority for vaccine research. *Vaccine*. 2010;28(12):2363-6.

los resultados coinciden con los descritos por otros autores tras el uso de vacunas adyuvadas con sales de aluminio [16-19]. La magnitud de la respuesta fue la esperada ante la inoculación repetida de este adyuvante 14 días. El efecto adverso en el sitio de administración no es un signo tóxico, a pesar de que se administró una concentración de adyuvante superior a la prevista en el protocolo del estudio. Estos resultados evidencian que la vacuna en estudio, Quimi-Hib® adyuvada en fosfato de aluminio, fue similar a otras vacunas licenciadas internacionalmente para uso en seres humanos [19-21].

No hubo diferencias en la magnitud y estructura de la reacción local tras las aplicaciones reiteradas, entre el grupo placebo y los grupos con tres niveles de DT, lo que demuestra que la reacción hística fue mayormente provocada por el adyuvante y sobre todo por la concentración del adyuvante. Algunos autores han demostrado la presencia de aluminio en el centro de los granulomas macrofágicos observados en el sitio de administración [19], mientras que otros como Bordet [20] han descrito la infiltración de neutrófilos, microabscesos y la presencia de células gigantes como índice de efecto adverso de adyuvantes de sales de aluminio. Estos hallazgos no se apreciaron en nuestro estudio, a pesar de que la concentración de adyuvante fue mayor que la empleada en otras vacunas comerciales. Ello demuestra que la vacuna estudiada también cumple las expectativas de seguridad necesarias para su inclusión en los estudios clínicos posteriores. De modo que en esta investigación no se describe ningún hallazgo que se pueda considerar potencialmente tóxico.

La reversión solo parcial de estos signos en los animales que los desarrollaron coincide con los informa-

do por otros autores (por ejemplo, Gupta [17] y Goto *et al.* [22]), quienes observaron que la induración aparecida en el sitio de administración de vacunas adyuvadas con sales de aluminio tardaba entre 9 meses y un año en revertir totalmente, en diferentes especies (conejos y ratas).

Conclusiones

Considerando los estudios anteriores con la vacuna Quimi-Hib® y los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que la vacuna Quimi-Hib® adyuvada en fosfato de aluminio presenta una adecuada inocuidad y seguridad para su aplicación en seres humanos. Cumple los requisitos establecidos nacional e internacionalmente para el uso y comercialización de este tipo de producto. Su administración repetida provoca una reacción local caracterizada por granulomas macrofágicos de diversa intensidad. A nivel sistémico, este producto no es tóxico ya que que en el espectro de dosis explorado en ratas Sprague Dawley, no se evidenciaron alteraciones morfológicas en ninguno de los órganos estudiados. El comportamiento del peso corporal, el consumo de alimentos por la especie empleada, los resultados de los estudios hematológicos complementarios y el peso de los órganos, no evidenciaron diferencias con respecto a los valores normales descritos para animales sanos. Los resultados clínicos y macroscópicos fueron lesiones locales en el sitio de administración (induraciones causadas por granulomas macrofágicos), descritas para productos en los que se emplean sales de aluminio como adyuvante, que no constituyen signos tóxicos.

19. Chong H, Brady K, Metz D, Calonje E. Persistent nodules at injection sites (aluminum granuloma) - clinicopathological study of 14 cases with a diverse range of histological reaction patterns. *Histopathology*. 2006;48(2):182-8.

20. Bordet AL, Michenet P, Cohen C, Arbion F, Ekindi N, Bonneau C, *et al.* Granulome post-vaccinal lié à l'hydroxyde d'aluminium. *Ann Pathol*. 2001;21(2):149-52.

21. Makwana N, Riordan FA. Bacterial meningitis: the impact of vaccination. *CNS Drugs*. 2007;21(5):355-66.

22. Goto N, Kato H, Maeyama J, Shibano M, Saito T, Yamaguchi J, *et al.* Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine*. 1997;15(12-13):1364-71.

Recibido en mayo de 2012.

Aprobado en enero de 2013.

Preclinical safety testing of the Quimi-Hib® vaccine adjuvanted with aluminum phosphate during product development

✉ Dania Bacardí¹, Karelía Cosme¹, Lizet Aldana¹, Nelson Merino², José Suárez¹, Omar Mosqueda¹, Dioslaida Urquiza¹, Juan Romero¹, Roberto Madrigal¹, Rubén Amaya¹, Lourdes Hernández¹

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, CP 11 600, La Habana, Cuba

² Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos, Cidem
Calle 17 e/ 62 y 64, Playa, La Habana, Cuba
E-mail: dania.bacardi@cigb.edu.cu

ABSTRACT

Haemophilus influenzae type b (Hib) is a Gram-negative bacterium causing diseases such as meningitis, pneumonia, epiglottitis, cellulitis, septicemia and arthritis, among others. Hib-caused meningitis / Hib meningitis is a very serious disease with a death rate of more than 50 % throughout the world; therefore obtaining a vaccine against this bacterium is a goal of the highest priority. The present report presents the results of preclinical safety testing of the Quimi-Hib® vaccine (synthetic Hib antigen conjugated to tetanus toxoid) adjuvanted with aluminum phosphate. The battery of toxicological tests included acute toxicity (15 days), local tolerance (15 days) and repeated-dose toxicity (30 days), all of them evaluating the therapeutic dose of the vaccine as part of the studied experimental treatments. Three vaccine dose levels and a placebo (excipients plus adjuvant) were examined, administering the vaccine intramuscularly to Sprague Dawley rats of both sexes. After examining the data obtained from the administration of this wide range of doses to Sprague Dawley rats, it was concluded that the synthetic conjugate vaccine Quimi-Hib® adjuvanted in aluminum phosphate is not toxic and does not cause systemic adverse effects. No macroscopic alterations were observed in the studied organs, and the evaluation of the inoculation site only detected indurations caused by macrophage granulomas, resulting from the mechanism of action of the adjuvant included in the formulation.

Keywords: vaccines, synthetic vaccine, *Haemophilus influenzae* type b, safety, toxicity

Biotecnología Aplicada 2013;30:118-124

RESUMEN

Seguridad preclínica de la vacuna Quimi-Hib® adyuvada con fosfato de aluminio durante el desarrollo del producto. *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) es una bacteria gramnegativa causante de enfermedades como meningitis, neumonía, epiglotitis, celulitis, septicemia, artritis, entre otras, en los seres humanos. La meningitis causada por Hib es muy grave, con una tasa de muertes de más del 50 % en varias partes del mundo. Por tales razones, la obtención de una vacuna contra esta afección es una prioridad. El objetivo de este estudio fue evaluar la seguridad preclínica de la vacuna Quimi-Hib® (antígeno sintético de Hib conjugado con toxoide tetánico), en una formulación adyuvada con fosfato de aluminio, durante la etapa de desarrollo del producto. Los ensayos toxicológicos incluyeron estudios de toxicidad aguda (15 días), de tolerancia local (30 días) y de toxicidad a dosis repetidas (15 días), que incluyeron la dosis terapéutica de la vacuna. Se exploraron tres niveles de dosis de la vacuna y un placebo (excipientes más adyuvante), que se administraron por vía intramuscular a ratas Sprague Dawley de ambos sexos. Según nuestros resultados en el espectro de dosis explorado en las ratas, se concluyó que la vacuna conjugada Quimi-Hib® adyuvada en fosfato de aluminio no es tóxica, ni provoca efectos sistémicos adversos en esa especie. No se detectaron alteraciones macroscópicas en los órganos estudiados, y al evaluar el sitio de administración, solo se observaron induraciones causadas por granulomas macrófagos, resultantes del mecanismo de acción del adyuvante incluido en la formulación.

Palabras clave: vacunas, vacuna sintética, *Haemophilus influenzae* tipo b, seguridad, toxicidad

Introduction

Haemophilus influenzae (Hib) is a pleomorphic, aerobic Gram-negative coccobacillus discovered in 1892 by Richard Pfeiffer during a flu pandemic, which colonizes the mucosae of the upper respiratory tract of three-month-old children. Most Hib isolates are non-capsulated, although some strains produce a polysaccharide capsule. This bacterium is a causative agent for meningitis, pneumonia, epiglottitis, cellulitis, septicemia, arthritis, osteomyelitis, pericarditis, cholangitis, endocarditis and sinusitis [1]. Hib meningitis is a very dangerous disease that exhibits a mortality

rate of over 50 % in several parts of the world and leaves severe neurological sequelae on 50 % of the survivors [2].

Infants and toddlers are particularly vulnerable to Hib infections, as *in utero*-acquired antibody wanes after 3 months of age. In the absence of vaccination, natural immunity against the bacterium appears only by the fifth to sixth year of life [3, 4].

There are at least four commercially available safe and effective conjugate vaccines against *H. influenzae* type b approved for clinical use in several countries,

1. Robbins JB, Schneerson R. *Haemophilus influenzae* type b: the search for a vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 1987;6(8):791-4.

2. Ahmed N, Gottschalk S. How to design effective vaccines: lessons from an old success story. *Expert Rev Vaccines.* 2009; 8(5):543-6.

3. Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2012; 12(1):36-44.

prepared by chemically conjugating polyribosylribitol phosphate (PRP, corresponding to the capsular polysaccharide of *H. influenzae* type b) to a protein of bacterial origin. None of them, however, contains entirely synthetic antigens or are manufactured in Cuba. A collaborative effort undertaken in 1989 by the Synthetic Antigens Laboratory of the Faculty of Chemistry of the University of Havana together with the Finlay Institute and the Center for Genetic Engineering and Biotechnology (both from Havana, Cuba) resulted in the development of Quimi-Hib®, a conjugate vaccine containing 10 µg of a chemically synthesized fragment of PRP covalently linked to 20 or 30 µg of tetanus toxoid. As reference for protection in immunized children, anti-PRP titers of 1 µg/mL are used, but 0.15 µg/mL supposes an inverse correlation with disease incidence in non-vaccinated individuals [5]. An anti-Hib antibody titer of 1 µg/mL at three weeks post-immunization is predicted to provide protection for at least one year [6, 7]. The vaccine is designed to be delivered in children using doses of 10 mg injected at 2, 4 and 6 months of age.

The objective of the present investigation was to perform the preclinical safety testing of Quimi-Hib® as a vaccine candidate adjuvanted in aluminum phosphate. The assays included acute toxicity tests (15 days long), tests for repeated-dose toxicity (15 days) and local tolerance (30 days), employing three different dosages and a placebo. The therapeutic dose (TD) was examined in the local tolerance study. All tests employed Sprague-Dawley rats and used the intramuscular immunization route in order to reproduce the administration procedure planned for future clinical trials.

Materials and methods

Test system

Different studies predating the safety testing of this vaccine candidate determined the biological activity of PRP in different rodent and Lagomorph species. One of them used Sprague-Dawley rats, split into groups of 5 female individuals per treatment (data not shown). Each 0.5 mL dose contained 10 µg of PRP, and other immunogens under evaluation included other monovalent Hib vaccine preparations adsorbed onto aluminum phosphate, in which the amount of Hib was varied from 2 to 20 µg. This immunogenicity study validated rats once again as the premier species for toxicology testing, since the IgG antibody response obtained in these animals was higher than in other species immunized with the commercially available Hiberix® vaccine (GlaxoSmithKline).

The preclinical safety tests described in the present work for the Quimi-Hib® vaccine adjuvanted in aluminum phosphate were performed on Sprague-Dawley rats, using the following administration schemes:

- Acute toxicity study: 40 rats (20 from each sex); average weight: 90 g.
- Local tolerance study: 76 rats (38 from each sex); average weight: 90 g.
- Repeated-dose toxicity study: 110 rats (55 from each sex); average weight: 98 g.

The animals, supplied by the Center for the Production of Laboratory Animals (Cenpalab, Cuba), were clinically examined, weighed, housed in Makrolon

cages with a bedding of bagasse, and kept under observation for 7 days under controlled environmental conditions (temperature 19-21 °C, average relative humidity 68 % and photoperiod of 12 h). The animals were fed daily with 25 g/individual of rodent chow (ALY co., Cenpalab, Cuba), quantifying daily food intake; water was supplied *ad libitum*. All experiments took place at Toxicology Block B of the Animal Experimentation Unit of CIGB (Havana, Cuba).

Test compound

The studies employed a formulation of the conjugate vaccine Quimi-Hib® adjuvanted with aluminum phosphate (CIGB, Havana, Cuba). Each vaccine vial contained 10 µg of conjugated PRP, 20.8 to 31.25 µg of tetanus toxoid, 0.05 mg/mL of thiomersal, *q.s.* and 0.25 mL of phosphate buffer. The vial of the adjuvant formulation contained 7.072 mg/mL of aluminum phosphate, 0.05 mg/mL of thiomersal and 0.25 mL of phosphate buffer, *q.s.* Analysis reports issued by the Quality Control Unit of CIGB confirmed the sterility, apyrogenicity, pH and general safety of this product. The results of the assays were satisfactory.

Experimental design

The studies were designed according to the regulations issued by the International Conference on Harmonisation (ICH) and the European Medicines Agency (EMA) [8-10]. Individual animals were randomly assigned to each experimental treatment with the help of a list generated by the Aleator software application (CIGB, Havana, Cuba; version 1.1, 1997). All doses were administered intramuscularly. Three dosages were evaluated, with the objective of providing a wide safety margin. The presence of a synthetic antigen was considered, and doses up to 45-fold the TD were examined. The latter corresponds to the maximum allowable volume according to the chosen administration route and host species, which constitutes the reference to establish the upper limit for dose and toxicity in the proposed experimental design. A satellite group receiving the highest dose in each case was included in the studies of local tolerance and repeated-dose toxicity, with the objective of evaluating the reversibility of any reported adverse events (Table 1).

All doses were calculated according to the body weight of the inoculated animals. Body weight ranged from 80 to 100 g at the beginning of the study. Six kilograms were used as the average weight of an 8-week old human infant. The TD recommended for future clinical trials was 10 µg. The test compound was inoculated into the femoral quadriceps of a hind limb [11].

Clinical examination, euthanasia and sampling

The animals underwent daily clinical examinations with the objective of detecting any behavioral variation or sign of toxicity such as changes in skin and fur, in eyes and mucous membranes or somatomotor activity. The following histological parameters were considered when evaluating local tolerance: presence of polymorphonuclear lymphocytes, local edema, acute hyperemia, hemorrhage and necrosis of muscle fibers. The animals were weighed weekly. Euthanasia was

4. Fitzwater SP, Watt JP, Levine OS, Santosham M. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines: considerations for vaccination schedules and implications for developing countries. *Hum Vaccines*. 2010;6(10):810-8.

5. Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(2):302-17.

6. Plotkin SA. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(7):1055-65.

7. Verez-Bencomo V, Fernandez-Santana V, Hardy E, Toledo ME, Rodriguez MC, Heynngnezz L, et al. A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against *Haemophilus influenzae* type b. *Science*. 2004;305(5683):522-5.

8. European Medicines Agency. CPMP/SWP/465/95. Note for guidance on pre-clinical pharmacological and toxicological testing of vaccines (CPMP adopted Dec 97). London: EMA; 1997 (cited 2012 Apr 16). Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004004.pdf

9. European Medicines Agency. CPMP/SWP/1042/99. Note for guidance on repeated dose toxicity (CPMP adopted July 2000). London: EMA cited 2012 Apr 16). Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003102.pdf

10. European Medicines Agency. CPMP/ICH/286/95. Note for guidance on Non-clinical safety studies for the conduct of Human clinical trials for pharmaceuticals. ICH M3 (R2). 2008. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002941.pdf

11. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol*. 2001;21(1):15-23.

Table 1. Experimental design of preclinical safety testing during product development of Quimi-Hib® adjuvanted in aluminum phosphate

Study type (n)	Groups	Immunogen	Rats/sex	Dose	Volume / body weight	Frequency	Sacrifice (animals / group and day)
Acute toxicity (40)	I	Placebo*	5	1	2 mL/kg	Day 1	Day 15
	II	15 TD					
	III	30 TD					
	IV	45 TD					
Local tolerance (76)	I	Non-treated control	7	4	1.5 mL/kg	Every 72 h	24 h (2) days 7 (6) and 14 (6)
	II	Placebo					
	III	TD					
	IV	10 TD					
	V	20 TD					
	VI †	20 TD					
Repeated-dose toxicity (110)	I	NaCl 150 mM	5	14	1 mL/kg	Daily	Day 28 (6) Day 15 (10) Day 15 (20)
	II	Placebo					
	III	10 TD					
	IV	20 TD					
	V	30 TD					
	VI †	30 TD					

* Excipients plus aluminum phosphate adjuvant.

† Satellite group for studying the reversibility of adverse effects.

TD: Therapeutic dose (0.13 µg in Sprague-Dawley rats with 90 g body weight, equivalent to a therapeutic dose in humans of 10 µg). n: Number of animals.

performed by cervical dislocation, after anesthetizing the animals in a CO₂ chamber. All organs were examined under the microscope during necropsies, taking samples of liver, spleen, mesenteric lymph nodes, thymus and the inoculation site for later histopathological studies. During the repeated-dose toxicity study, the following hematological parameters were determined: eosinophil counts, hematocrit, hemoglobin concentration, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin concentration, and counts of leukocytes, platelets, neutrophils, lymphocytes, monocytes and eosinophils. Liver, spleen and thymus were also weighed.

Data processing

Statistical analyses were applied to body weight, average weekly food intake, hematological data, organ weight and histopathological findings, estimating measures of central tendency and dispersion (mean, standard deviation, maximum and minimum values). During the analyses of body weight and food intake, data normality and homogeneity of variance were examined for each evaluation time point and sex using the Shapiro-Wilk test with the Bonferroni correction for the interpretation of alpha error in paired tests and the Levene test, respectively, applying a parametric analysis of variance (ANOVA) or its non-parametric alternative (Kruskal-Wallis test) accordingly. Paired comparisons between consecutive time points were performed using a paired t-test or Wilcoxon's test.

The histopathological data were analyzed using contingency tables with the associated test for independence (Fisher's exact test).

Results

Evaluation of acute toxicity

Body weight and food intake

Body weight exhibited the expected behavior; that is, the values of this parameter between days 7 and

14 were significantly different and when compared to those of day 1 for each group, regardless of sex (Figure 1). On the other hand, no statistically significant differences were detected between treatment groups for the same time point ($p > 0.05$, Anova). Body weight increased at a rate significantly different from zero during the experimental stage of the study ($p < 0.05$, Anova).

Food intake was similar for all three studies, exhibiting a homogeneous behavior across groups for each evaluation time point: 15 to 18 g per day (Figure 2).

The highest food intake values were registered during weekends (days 5-6 and 12-13). This is an expected value, as during these days the stress arising

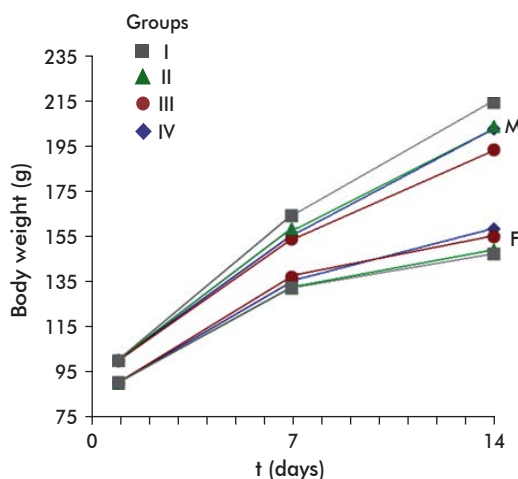


Figure 1. Behavior of body weight (average, in grams) of Sprague-Dawley rats immunized with the Quimi-Hib® vaccine adjuvanted in aluminum phosphate during the acute toxicity test. At day 0 of the study the animals were randomly assigned to the different experimental treatments: group I (placebo; excipients plus aluminum phosphate), and groups II to IV (15-, 30- and 45-fold the therapeutic dosage), which started to be delivered at day 1. M: males, F: females.

from the manipulation of the animals is minimal. All environmental parameters remained stable, within the limits established for the species (rodents) [12-14]. No statistically significant inter-group differences were detected in the corresponding analysis ($p > 0.05$, Kruskal-Wallis test).

Clinical examination and macroscopic observations

No signs of toxicity or alterations were detected during the daily clinical examinations. Likewise, there were no deaths or behavioral alterations. No changes were detected in the inspected organs and tissues during necropsies.

Histopathological study

There were signs of inflammatory reactions in muscle tissue samples (hemorrhages or cicatrization foci), but there were no morphological alterations (Table 2).

The observed necrosis was not a lesion of the muscle tissue, but a central part of the granuloma. No statistically significant differences between placebo and vaccine-treated groups were detected. Group IV exhibited the least conspicuous alterations of the inoculation site (no symptoms in 6 out of 10 animals); an important finding, taking into account that these animals received 230 μL of the adjuvanted vaccine. There was extramedullary hematopoiesis in liver and spleen for all animals, a finding that was independent from immunogen type (vaccine vs. placebo) and dose. Likewise, there were no statistically significant differences between groups for the findings of the histopathological study. The examined organs (liver, spleen and mesenteric lymph nodes) did not exhibit alterations that might be construed as signs of toxicity.

Evaluation of local tolerance

Body weight

Body weight exhibited no statistically significant differences between experimental groups for the same time point ($p > 0.05$, Anova), and increased at normal rates (Figure 3). Average bodyweight increase was significantly different from zero during the evaluation period.

Clinical examinations and macroscopic observations

The most conspicuous systemic effect was the presence of marked piloerection in all animals, including those receiving the placebo, during week 2 of the study (after two immunizations). The only clinical sign detected during the study was induration at the inoculation site in groups II (placebo, i.e. excipients plus adjuvant), IV (medium dose), V (high dose) and VI (satellite group). No local reactions were detected during the first four days of the study, but mild indurations appeared, started from day 5, in the animals from groups II, V and VI except one individual from group VI, and remained present, with varying intensities, throughout the remainder of the study. Mild and moderate indurations were evidenced in the groups receiving 10 and 20-fold the TD and in the placebo group, which inoculation volume was the largest. Group VI (satellite) remained under observation

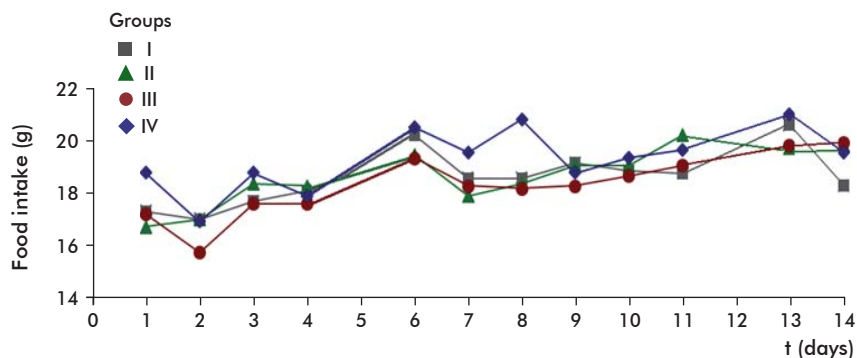


Figure 2. Behavior of food intake (average, in grams) of Sprague-Dawley rats immunized with the Quimi-Hib® vaccine adjuvanted in aluminum phosphate during local tolerance testing. At day 0 of the study the animals were randomly assigned to the different experimental treatments: group I (placebo, excipients plus aluminum phosphate), and groups II to IV (15-, 30- and 45-fold the therapeutic dosage), which started to be delivered at day 1. M: males, F: females.

up to day 28 of the study in order to evaluate the reversibility of these reactions. While they did not revert completely, the daily clinical reports evidenced a gradual decrease of their severity.

Table 2. Frequency of appearance of histopathological alterations per group, in Sprague-Dawley rats immunized with Quimi-Hib® adjuvanted in aluminum phosphate* during the acute toxicity test*

Groups	Inoculation site			
	FG	MG	N	NA
I	7	1	6	2
II	6	0	4	3
III	4	4	7	2
IV	3	1	4	6

* One dose was administered during the experiment. Group: I (placebo, excipients plus aluminum phosphate), and II to IV (15, 30 and 45-fold the therapeutic dose of 0.13 μg per animal, respectively). None of the animals exhibited signs of extramedullary hematopoiesis, either in liver or spleen. All groups were formed by 10 animals. FG: focal granuloma; MG: multiple granuloma; N: necrosis; NA: no alterations.

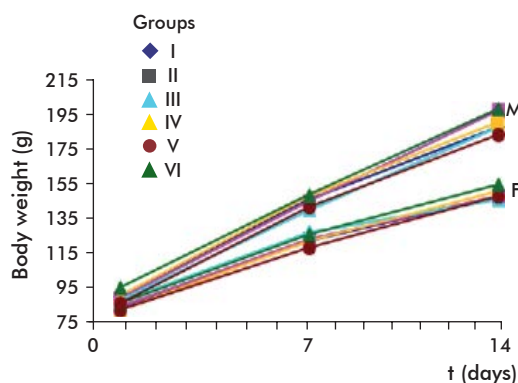


Figure 3. Behavior of body weight (average, in grams) of Sprague-Dawley rats immunized with the Quimi-Hib® vaccine adjuvanted in aluminum phosphate during local tolerance testing. At day 0 (initial day of the study) the animals were randomized and the dosages for administration of the four doses every 72 h (starting from day 1) were defined: group I (non-treated control), group II (placebo, i.e. excipients plus aluminum phosphate), and groups III to V (1, 10 and 20-fold the therapeutic dose, respectively). Group VI: satellite group, used to evaluate the reversibility of local adverse effects. M: males, F: females.

12. Cosme K. Programa para el Uso de Animales de Experimentación del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Edición 01;1998.

The macroscopic observations performed during necropsies (at 24 h, 7 and 14 days and 28 days for the satellite group) failed to find signs of damage in any organ system. There were white nodules at the inoculation site, which size was directly related to dose and administration volume.

Histopathological study

There was a noticeable increase in the number of macrophages at the inoculation site after 24 h of the first administration, which also exhibited liquid depots of the immunogen. These are typical and expected findings after the administration of an antigenic substance containing aluminum phosphate as an adjuvant, and were also observed during the necropsies performed at days 7, 14 and 28 although their intensity was variable, depending on dose number and size.

At day 7 (after 2 doses) the local reactions led to the appearance of diffuse macrophage granulomas with eventual liquid depots, a modest cicatrization response within the reaction and the infiltration of lymphocytes, especially in the periphery, with varying intensity. It should be noted that the granulomatose reaction of group III (TD) was also modest.

At day 14 (Table 3), after 4 doses, the inoculation site continued to exhibit the granulomas described above, which were most frequent and intense in the groups receiving the highest dose (V) and the largest volumes of adjuvant (II and V).

The only symptom of group I (non-treated control) was the presence of extramedullary hematopoiesis in the liver of two animals at day 7 and four animals at day 14, as well as extramedullary hematopoiesis in the spleen of five animals at days 7 and 14. No other histopathological signs were observed in this group during the study.

There were no cases of extramedullary hematopoiesis at the liver for any of the animals of the study at 24 h after the first inoculation. Likewise, there were no cases of alterations in lymph nodes or the thymus throughout the study. There was only a moderate inflammatory response and extramedullary hematopoiesis at the spleen of animals belonging to groups receiving adjuvant-containing formulations (including the adjuvant-only group) and extramedullary

hematopoiesis in the liver of individuals from group III (TD).

There were evidences of granulation tissue only in two animals from group III (TD) at day 14.

Histopathological data for the satellite group was only collected at day 28. In this case, there was a modest local reaction in four animals, and a moderate reaction in another two; there was only one animal exhibiting extramedullary hematopoiesis. No other alterations were detected in this group.

The frequency of appearance of alterations in the other parameters is shown in table 3.

Evaluation of repeated-dose toxicity

Body weight and food intake

There were no differences regarding body weight between experimental groups for either sex at the same time point ($p > 0.05$, Anova), although average body weight did exhibit a statistically significant increase with respect to its initial value ($p < 0.05$, Anova) that was similar for every group (Figure 4).

Food intake also exhibited a homogenous behavior across groups for each time point (15 to 24 g per day) (Figure 5). Upon close examination, there was a significant decrease of average food intake by day 7 of the study for the females of group I, which was corroborated by the corresponding statistical analysis ($p > 0.05$, Kruskal-Wallis test).

Clinical examination and macroscopic observations

No signs of local reaction at the inoculation site or any other alterations were detected during the first 4 days after starting the study, although indurations at this site appeared afterwards in animals from every group and remained throughout the experimental stage. Severe induration and nodules were present in animals from the placebo, high dose (20 and 30-fold the TD) and satellite groups, which received the largest inoculation volumes, but were also observed in mild form in animals from group III (10-fold the TD).

The hematological parameters of treated groups were similar to those of animals from the same batch which did not receive any test compounds (control

Table 3. Frequency of appearance of histopathological alterations at the inoculation site (inflammatory reaction) and the target organs of the immunological response of Sprague-Dawley rats after immunization with Quimi-Hib® adjuvanted in aluminum phosphate during local tolerance testing*

Groups	24 h			7 days					14 days					
	IR†			IR					IR					
	D	EHL	EHS	D	M	S	EHL	EHS	D	M	S	GT	EHL	EHS
I	0	0	0	0	0	0	2	5	0	0	0	0	4	5
II	2	0	1	0	1	5	2	6	0	0	6	0	1	6
III	1	2	2	3	0	0	0	6	3	1	0	0	2	5
IV	1	0	2	2	4	0	2	5	1	3	2	0	3	5
V	2	0	2	1	5	0	1	6	0	6	0	0	0	6
VI‡	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4	2	0	0	0	1

* Data corresponding to two animals per group at 24 h and six animals per group at days 7 and 14. At 24 h post-administration, the inflammatory reaction was only discreet. In addition, there were no alterations of lymph nodes and thymus at any of the evaluated time points. The sole finding was the presence of granulation tissue (GT) at day 14.

† IR: Inflammatory reaction. Classified as discreet (D), moderate (M) or severe (S). At 24 h it was evaluated only in 2 animals from groups I to V (I: non-treated control; II: vaccine placebo plus aluminum phosphate adjuvant; III: therapeutic dose of 0.13 µg per animal; IV and V: 10 and 20-fold the therapeutic dose, respectively).

‡ VI: Satellite group immunized with 20-fold the therapeutic dose, used to evaluate the reversibility of adverse effects. Data obtained at day 28.

EHL: extramedullary hematopoiesis in liver; EHS: extramedullary hematopoiesis in spleen; nd: not determined.

13. Van Zutphen LFM, Balls M. Animal Alternatives, Welfare and Ethics. Developments in Animal and Veterinary Sciences. Amsterdam: Elsevier Science Ltd.; 1997.

14. Olfert ED, Cross BM, Mc William A. Guide to the care and use of experimental animals. 2nd ed. Ontario: Canadian Council on Animal Care; 1998.

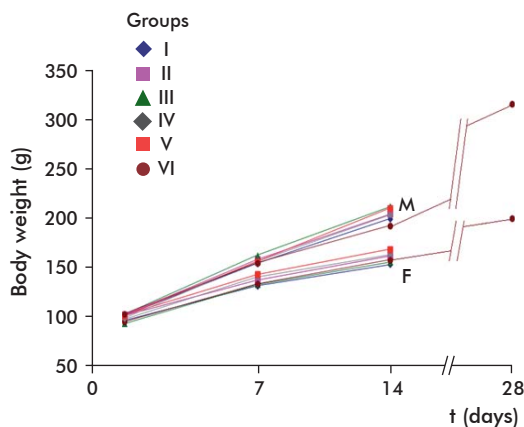


Figure 4. Behavior of body weight (averages, in grams) of Sprague-Dawley rats immunized with the Quimi-Hib® vaccine adjuvanted in aluminum phosphate during repeated-dose toxicity testing. At day 0 (initial day of the study) the animals were randomized and the dosages for daily administration during 14 days starting from day 1 were defined: group I (NaCl 150 mM), group II (placebo, excipients plus aluminum phosphate), and groups III to V (10-, 20- and 30-fold the therapeutic dose, respectively). Group VI: satellite group used to evaluate the reversibility of adverse effects. M: males, F: females.

non-treated group). The macroscopic observations performed during necropsy confirmed the results of the clinical examinations; their main finding was the presence of pale formations with a nodular appearance. The weight of all organs remained within the normal ranges for the species.

Histopathological study

Muscle tissue samples were examined looking for histological signs of inflammatory reactions, hemorrhages and cicatrizing foci. However, our sole finding was the presence, in the animals from the groups receiving the largest vaccine doses, of diffuse granulomas in the inoculation site, circumscribed mainly to the endomysium of muscle fibers with liquid depots and evidence of cell lysis for the granulomatous tissue, interspersed with cicatrization tissue and a few polymorphonuclear eosinophils. The individuals from the placebo group did not exhibit granulomas, although three individuals did develop cicatrization tissue. None of the studied animals had evidence of liver damage, and all had histopathological evidence of antigenic stimulation on spleen and mesenteric lymph nodes. There were no differences regarding the magnitude and structure of the local reaction between the placebo group and the groups receiving multiple TD.

Discussion

The sustained increase in body weight and stable food intake figures exhibited by all animals used for the preclinical safety testing of the aluminum phosphate-adjuvanted Quimi-Hib® conjugate vaccine evidence that this formulation is not toxic. Body weight increased consistently throughout the experimental stage up to the appointed date for euthanasia in all animals independently of the administered dose, resulting in statistically significant differences compared to the initial values ($p < 0.05$). The values of both body weight and food intake in every evaluation time point

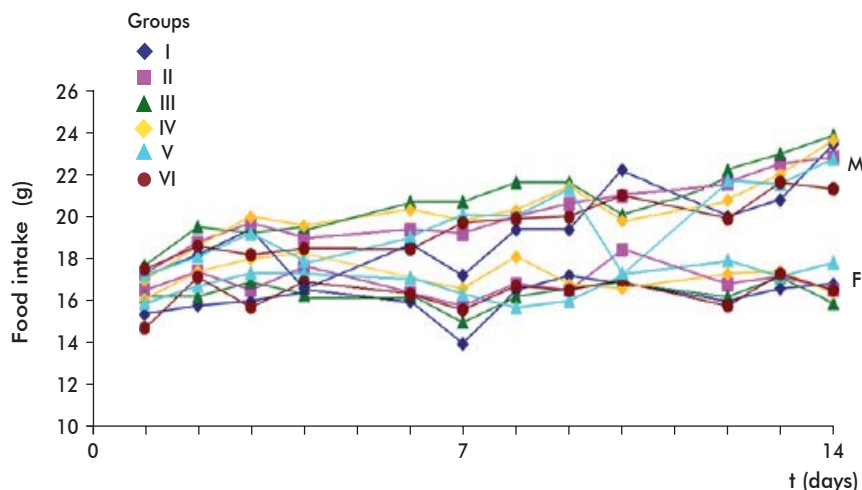


Figure 5. Behavior of food intake (averages, in grams) of Sprague-Dawley rats immunized with the Quimi-Hib® vaccine adjuvanted in aluminum phosphate during repeated-dose toxicity testing. At day 0 (initial day of the study) the animals were randomized and the dosages for daily administration during 14 days starting from day 1 were defined: group I (NaCl 150 mM), group II (placebo, excipients plus aluminum phosphate), and groups III to V (10-, 20- and 30-fold the therapeutic dose, respectively). Group VI: satellite group used to evaluate the reversibility of adverse effects. M: males, F: females.

were similar to those reported for healthy animals of this species [15] even in groups receiving dosages as high as 45-fold the TD. These findings were confirmed by the clinical examinations, as there were no morphological or etiological alterations attributable to the test compound, evidencing the non-toxicity of the assayed formulations and treatments. In turn, the histopathological studies of each of the three experiments corroborated the findings of the clinical examinations. There was an inflammatory reaction at the inoculation site, which has been linked by several authors to the presence of aluminum phosphate as an adjuvant. This compound has been previously shown to efficiently potentiate effector inflammatory responses [16-18], characterized mainly by the presence of macrophages, neutrophils and plasma cells. The cicatrizing and hemorrhaging foci are simply a response to the mechanical trauma of the injections; as a matter of fact, there are occasional reports in literature of lacerations and damage to muscles and skin. In any case, most of the animals did not have alterations, further supporting the use of this formulation as a vaccine candidate. The histopathological study also pointed at aluminum phosphate as the main cause of the observed response, as our results coincide with those reported by other authors employing vaccines adjuvanted with aluminum salts [16-19]. The magnitude of the response corresponded to that expected after the repeated inoculation of this adjuvant for 14 days. The observed adverse effect at the inoculation site is not a sign of toxicity, despite the administration of an adjuvant concentration larger than that specified by the study protocol. These results evidence that the safety of the test compound, Quimi-Hib® adjuvanted in aluminum phosphate, is similar to that of other vaccines approved for clinical use in many other countries [19-21].

There were no differences between placebo and three different TD dosages concerning the magnitude and structure of the local reaction after the repeated

15. Harkness JE, Wagner JE. The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents. 4th ed. Philadelphia, PA: Lea and Febiger; 1995.

16. Lindblad EB. Aluminium adjuvants-in retrospect and prospect. *Vaccine*. 2004; 22(27-28):3658-68.

17. Gupta RK. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;32(3):155-72.

18. Harandi AM, Medaglini D, Shattock RJ. Vaccine adjuvants: a priority for vaccine research. *Vaccine*. 2010;28(12):2363-6.

19. Chong H, Brady K, Metze D, Calonje E. Persistent nodules at injection sites (aluminum granuloma) - clinicopathological study of 14 cases with a diverse range of histological reaction patterns. *Histopathology*. 2006;48(2):182-8.

20. Bordet AL, Michenet P, Cohen C, Arbion F, Ekindi N, Bonneau C, et al. Granulome post-vaccinal lié à l'hydroxyde d'aluminium. *Ann Pathol*. 2001;21(2):149-52.

21. Makwana N, Riordan FA. Bacterial meningitis: the impact of vaccination. *CNS Drugs*. 2007;21(5):355-66.

administration of the vaccine. This demonstrates that the detected histological reactions are mainly caused by the adjuvant and, especially, its concentration. Some authors have demonstrated the presence of aluminum at the center of the macrophage granulomas observed at the inoculation site after the administration of similar compounds [19], and others, such as Bordet [20], have reported the infiltration of neutrophils, microabscesses and the appearance of giant cells as markers of the adverse effect of aluminum salts-based adjuvants. However, these findings were not replicated by our study despite the use of adjuvant concentrations higher than those of other commercially available vaccines, demonstrating that the test compound satisfies all safety requirements for its examination in future clinical trials. The present investigation, in summary, did not find any effect attributable to the administration of the test compound that could be interpreted as a sign of potential toxicity.

The fact that the observed local signs reversed only partially coincides with previous observations by other authors (*e.g.* Gupta [17] and Goto *et al.* [22]), who reported that the indurations appearing at the inoculation site after the administration of vaccines adjuvanted with aluminum salts takes from 9 to 12 months to disappear both in rabbits and rats.

Conclusions

Taking into account the data from earlier studies with the Quimi-Hib® vaccine and the results of the present work, it is concluded that the Quimi-Hib® vaccine adjuvanted in aluminum phosphates meets all innocuity and safety requirements for its administration to human beings, as well as all national and international regulations for the use and marketing of this product type. The repeated administration of this product produces a local reaction characterized by macrophage granulomas of varying intensities. In addition, this product is not toxic at a systemic level, as its administration at a wide range of doses to Sprague-Dawley rats did not result in morphological alterations in any of the studied organs, did not alter their bodyweight increase rates and food intake indexes, did not alter any of the studied hematological parameters, and did not change the weight of the internal organs above or beneath the normal limits for healthy animals. The only relevant finding of the clinical examinations and the gross observations performed during necropsies was the presence of a local reaction at the administration site (indurations caused by macrophage granulomas), which has been previously reported for products employing aluminum salts as adjuvant and do not represent a sign of toxicity.

22. Goto N, Kato H, Maeyama J, Shibano M, Saito T, Yamaguchi J, *et al.* Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine*. 1997;15(12-13):1364-71.

Received in May, 2012.

Accepted in January, 2013.