



ACADEMIA DE FARMACIA DE GALICIA

Discurso de ingreso

como Académica Correspondiente

**EL DESARROLLO INDUSTRIAL
DEL MEDICAMENTO INMUNOLÓGICO
VETERINARIO**

ILMA. SRA. D.^a. M.^a. EUGENIA PUERTES COLORADO



Santiago de Compostela, Abril de 2009

INGRESO COMO ACADÉMICA CORRESPONDIENTE EN LA ACADEMIA DE
FARMACIA DE GALICIA DE LA DRA. M^a EUGENIA PUENTES COLORADO

PANEGIRICO

POR EL ACADÉMICO DE NÚMERO DR. ÁNGEL CONCHEIRO NINE

(Medalla número15)

Excelentísimos e Ilustrísimos Señoras y Señores Académicos,
Excelentísimas e Ilustrísimas Autoridades,
Señoras y Señores,

Constituye para mi un motivo de enorme satisfacción tener la oportunidad de hacer el panegírico de la Dra. María Eugenia Puentes Colorado, en el acto de su toma de posesión como Académica Correspondiente de la Academia de Farmacia de Galicia.

Conozco a Eugenia desde octubre 1980, cuando inició su quinto curso de licenciatura y se incorporó como alumna al grupo de Historia de la Farmacia, del que yo era responsable en ese momento. Eugenia había llegado a la Facultad después de cursar el Bachillerato en El Colegio Miralba de las Jesuitas, y el COU en el Colegio Apostol Santiago de los Jesuitas de Vigo. Allí nació un interés por la Química, la Bioquímica y las aplicaciones sanitarias de estas ciencias, que condujo a que, a la hora de incorporarse a la Universidad, optase por la carrera de farmacia; una decisión que había de marcar su futuro profesional.

En la Facultad de Farmacia, Eugenia fue una alumna excepcional. El Premio Extraordinario de Licenciatura y el Premio Nacional de Terminación de Estudios, otorgado por el entonces Ministerio de Educación y Ciencia al mejor expediente de la licenciatura entre todos los de su curso en España, lo prueban documentalmente; y yo, que fui testigo directo de sus cualidades intelectuales, de su dedicación y de su capacidad de trabajo, puedo dar fe de que estas distinciones sólo confirmaban lo que ya era evidente para los que la conocíamos. En el último curso de la carrera, su inclinación por las ciencias biomédicas, la llevó a incorporarse al Departamento de Microbiología, en el que hizo su Tesina de Licenciatura “Estudio de las propiedades adhesivas de las cepas virulentas de *Escherichia coli*” bajo la dirección de los profesores Benito Regueiro Varela y M^a Isabel Bernárdez Hermida, y con la supervisión directa de dos jóvenes investigadores- que después habían de ser catedráticos de la Facultad de veterinaria-, el recordado profesor Enrique González y el profesor Jorge Blanco. A finales de 1981 y una vez defendida la Tesina, se incorpora para iniciar su Tesis Doctoral al grupo de Inmunología, del que formaban parte junto con su director, el profesor Benito Regueiro García, los investigadores Jose Faro, Adolfo Eiras, Sabela Lareo y Esperanza Cancio junto con los después profesores Florencio Martínez Ubeira y Rafael Seoane Prado. En los primeros años del doctorado cuenta con una beca del Plan de Formación de Personal Investigador, hasta que en 1985 se incorpora a Cooper-Zeltia como Jefe de desarrollo de productos biológicos. Su Tesis Doctoral “Inmunógenos y sistemas adyuvantes en la vacunación contra el virus de la enfermedad de Aujeszky”, defendida en 1991, es un buen reflejo de los beneficios de la colaboración entre la empresa y la academia a la hora de abordar problemas con repercusión práctica e interés industrial.

La inquietud de la Dra. Puentes Colorado por profundizar en su formación la llevó a asistir a cursos muy especializados, entre los que destaca el dedicado a la fisiología y la anatomía del sistema inmune, que impartieron en Basilea los Profesores Niels Jerne y George Köhler en 1984, año en el que recibieron el Premio

Nobel de Medicina por sus contribuciones al desarrollo de la inmunología. También efectuó una estancia postdoctoral en el Departamento de Biología Celular y Molecular, de la Universidad de Aberdeen entre enero de 1993 y mayo de 1994. Para desarrollar su proyecto *Diseño de un anticuerpo monoclonal humano neutralizante de la toxina alpha de Staphylococcus aureus* contó, inicialmente, con una ayuda postdoctoral del Programa Nacional de Formación del Personal Investigador para el intercambio entre industrias y centros públicos de investigación, y a partir de junio de 1993 con una beca del Programa de Capital Humano y Movilidad de la Comunidad Europea.

Eugenia ha vivido la evolución de la que ha sido siempre su empresa desde su incorporación en 1985. En 1991, Cooper-Zeltia se escinde y se constituye Cooper-Zeltia Veterinaria, que pasa a dedicarse de manera exclusiva a la fabricación de medicamentos de uso veterinario. A finales de 1993 se transforma en la actual CZ Veterinaria, a la que se incorpora junto con el resto del personal cualificado y toda la estructura científico-técnica.

La actividad de la Dra. Puentes Colorado como directora del departamento de I+D y Registros de CZ Veterinaria ha sido muy intensa, como lo prueba la importancia cualitativa y cuantitativa de los productos que la compañía ha desarrollado y registrado desde 1993, y los numerosos contratos de colaboración con organismos públicos que ha coordinado sobre paratuberculosis, brucelosis, vacunas clostridiales, colibacilosis, tuberculosis y lengua azul, así como las publicaciones y comunicaciones presentadas en congresos de su especialidad.

Entre los muchos proyectos financiados por entidades públicas en los que ha participado, quiero destacar por la actualidad del tema en el que se centra, el que lleva por título “Desenvolvimento de vacina inactivada contra a enfermidade do virus da lengua azul”, iniciado en el año 2007 con financiación de la Xunta de Galicia y en el que Eugenia es la investigadora principal.

Eugenia encuentra también tiempo para participar en las actividades del Comité Técnico Permanente de la Asociación Empresarial Española de la Industria de Sanidad y Nutrición Animal, Veterindustria, del que forma parte desde junio de 2002. Este Comité Técnico se ocupa del seguimiento de la normativa que afecta al sector, tanto en España como en la Unión Europea, prestando asesoramiento técnico a otros órganos de Veterindustria. En el Comité actúa como coordinadora del Grupo de trabajo de Inmunológicos, y forma parte de la representación permanente en la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

También es miembro de la Plataforma Tecnológica Española de Sanidad Animal, Vet+i, participando en el grupo de trabajo de priorización de enfermedades y detección de necesidades. Esta plataforma es un foro pluridisciplinar liderado por la Industria, en el que también participan la Administración, las Universidades y otras entidades interesadas en sanidad animal, que tiene como objetivo facilitar y acelerar el desarrollo y la distribución de herramientas eficaces para el control de las enfermedades animales más relevantes, con repercusión en la sanidad y el bienestar animal, la seguridad alimentaria y la salud pública. La Plataforma actúa, además como “mirror group”, de la Plataforma Europea de Sanidad Animal.

Aunque no siempre haya recibido la atención que merece desde el mundo farmacéutico, la farmacia veterinaria cuenta en Galicia con un nivel de desarrollo muy alto, que se reconoce en España y en Europa, y a ello ha contribuido de una manera muy importante la actividad de Eugenia. Con su incorporación, la farmacia veterinaria entra en nuestra Institución y la Academia gana una excelente profesional que va a contribuir a afianzar los vínculos con la industria y con la sanidad animal. Por todo ello, Eugenia te doy la bienvenida y felicito a la Academia por tu ingreso.

Santiago de Compostela, 15 de abril de 2009.







ACADEMIA DE FARMACIA DE GALICIA

Discurso de ingreso como Académica Correspondiente

**EL DESARROLLO INDUSTRIAL
DEL MEDICAMENTO INMUNOLÓGICO
VETERINARIO**

ILMA. SRA. D^a M^a EUGENIA PUENTES COLORADO

Santiago de Compostela
Abril de 2009





ÍNDICE

I. La industria de la sanidad animal	9
II. El medicamento inmunológico veterinario	13
III. Vacunas vivas de segunda generación	17
· Mutantes por delección genética	17
· Vectores recombinantes	18
IV. Vacunas inactivadas de segunda generación.....	23
· Vacunas de subunidades.....	23
· Péptidos sintéticos.....	25
· Vacunas de ADN	26
V. Adyuvantes inmunológicos.....	29
VI. Desarrollo industrial del medicamento inmunológico veterinario	35
· Calidad de los medicamentos inmunológicos	36
· Seguridad de los medicamentos inmunológicos.....	40
· Eficacia de los medicamentos inmunológicos	44
· Ensayos clínicos	46
· Medicamentos que contienen microorganismos modificados genéticamente	47
VII. Conclusión	51





Excmo. Sr. Presidente de la Academia de Farmacia de Galicia,
Excmos. e Ilmos. Sres. Académicos,
Sras. y Sres., queridos amigos,

Deseo comenzar mi discurso agradeciendo a los miembros de esta Academia su decisión de proponerme como Académica correspondiente, y por la oportunidad que con ello me dan de participar y colaborar en una Institución como ésta. Es un gran honor para mí. Muy en especial quiero agradecer al Profesor Ángel Concheiro Nine, por haber propuesto mi ingreso y, sobre todo, por el reconocimiento que con esta proposición hace al importante papel que en el campo de la salud ejerce la industria farmacéutica veterinaria. Agradeceros también a todos vuestra presencia y compañía en este día tan especial.

En mi discurso de ingreso a esta Academia me gustaría hacer una presentación de este sector de la industria farmacéutica, prestando particular atención al medicamento inmunológico veterinario.





I. LA INDUSTRIA DE LA SANIDAD ANIMAL

El mundo de la sanidad animal es un campo desconocido para muchos que cumple un papel sanitario, económico y social fundamental.

La industria de la sanidad animal trabaja en el desarrollo de productos destinados a prevenir y mejorar la salud, la productividad y el bienestar de los animales. Los medicamentos veterinarios son herramientas esenciales en la producción de alimentos seguros y de calidad que contribuyen además a controlar la transmisión de zoonosis y a mejorar la salud pública.

También colaboran en el mantenimiento de una agricultura sostenible y en la reducción del impacto ambiental que generan las explotaciones animales, al conseguir disminuir los residuos que producen y la excreción de microorganismos al medio. Además, el uso responsable de los medicamentos reduce la cantidad de animales necesarios para obtener una producción rentable.

El medicamento veterinario va destinado a dos mercados muy diferenciados, por un lado el de los propietarios de animales de compañía, y por el otro el de los propietarios de explotaciones de cría de animales para consumo humano. Estos últimos engloban sistemas de producción y manejo tan diversos como los de las explotaciones ganaderas, porcinas, equinas, avícolas, granjas de acuicultura, de apicultura etc..

El sector ganadero es un sector cada vez más industrializado en el que el animal tiene un valor económico y cuyo destino final es el de servir de alimento para consumo humano, la decisión de compra está por tanto muy influenciada por consideraciones económicas. A esto hay que añadirle la preocupación del consumidor por la seguridad del alimento. Por el contrario, la utilización de medicamentos veterinarios en animales de compañía se basa en una toma de decisión más emocional.

Si se compara con el del medicamento humano, el mercado de medicamentos veterinarios es más reducido. Además se trata de un mercado complejo y fragmentado. Un amplio rango de especies, con diferentes patologías y diferentes sistemas de manejo que se traduce en la necesidad de disponer de un gran número de productos con bajas ventas anuales.

El mercado global del medicamento humano es 40 veces superior al del medicamento veterinario. Se estima que los beneficios que genera una compañía farmacéutica humana por las ventas de un producto superan unas veinte veces los obtenidos por un producto equivalente en veterinaria¹. Por dar una referencia, el mercado potencial de la vacuna Gardasil® contra el virus del papiloma humano es de aproximadamente 1 billón de dólares, mientras que el resultante de la suma de dos de las vacunas veterinarias con mayor distribución, la vacuna contra la fiebre aftosa del ganado vacuno y la vacuna contra la micoplasmosis porcina, alcanza un 10-20 % de este valor².

Tabla 1: El mercado de la sanidad animal global, distribución de ventas por regiones

Regiones	% ventas año 2007
Europa	36,3
América del Norte	34,1
América del Sur	11,6
Asia	15,3
Otras regiones	2,80

Europa es una de las regiones que lideran a nivel mundial la industria de sanidad animal (ver **Tabla 1**). La cifras de ventas de medicamentos veterinarios en la Unión Europea en el 2007 fueron de 4.156.452.305 €, lo que representó el 36,3 % del mercado global. En la **Tabla 2** se muestra la distribución de la cifra de ventas en Europa por productos³.

La industria de la sanidad animal en España tiene un importante peso en la economía nacional. Las ventas del mercado de sanidad y nutrición en el 2007 fueron de 811.520.000 €, situándose en el tercer lugar del mercado europeo y en el séptimo del mundo⁴.

1. Promoting a positive environment for veterinary medicines,. The case for a separate regulation for the animal medicine sector. IFAH 2008. http://www.ifahsec.org/files/2008/mediaroom/0208/RegulatoryBrochure_pages_LRes.pdf
2. Meeusen, E.N.T., J. Walker, A. Peters, P. Pastoret y G. Jungersen. Current status of veterinary vaccines. Clin. Microbiol. Rev., 20, 489-510, 2007
3. Facts and figures about the European animal health industry. IFAH Europa 2008. <http://www.ifaheurope.org/news/FFfinal.pdf>
4. El sector español de sanidad y nutrición animal en España 2006-2007. Veterindustria 2008 <http://www.veterindustria.com/modules.php?name=webstructure&idwebstructure=371&n=1234694919>

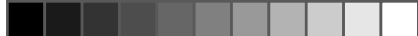
Tabla 2: El mercado de la sanidad animal europea en cifras

Grupo de productos	2007	% ventas en la UE
Vacunas	974.395.499 €	23,44
Antimicrobianos	875.582.521 €	21,07
Antiparasitarios	1.171.393.846 €	28,18
Productos de uso tópico	297.704.808 €	7,20
Otros productos	837.375.631 €	20,70

La industria de la sanidad animal, al igual que la humana, está altamente regulada. Sólo productos registrados pueden ser comercializados y las distintas actividades del negocio (investigación, desarrollo, fabricación, distribución y comercialización) están sujetas a regulación.

La regulación es crítica para establecer y mantener la confianza del consumidor en la seguridad, calidad y eficacia de los productos de sanidad animal y la industria farmacéutica reconoce el valor y la importancia de que exista esta regulación. El problema es que se están aplicando las mismas exigencias y estándares de calidad que al medicamento humano, sin tener en cuenta las características particulares del medicamento veterinario, ni su destino. La legislación vigente exige que las normas de buenas prácticas de fabricación se cumplan no sólo por parte de los laboratorios fabricantes del producto final, sino también para los fabricantes de los principios activos. En el caso de medicamentos destinados a animales productores de alimentos, entre otros, se deben llevar a cabo estudios complejos de depleción de residuos para garantizar que el alimento procedente del animal tratado es seguro para el consumo humano. También se deben realizar estudios de ecotoxicidad para garantizar que el medicamento no tiene efectos negativos sobre el medio ambiente.

El amplio rango de requerimientos específicos inherentes al sector de la sanidad animal requiere un esfuerzo de investigación significativamente elevado. Los requisitos de seguridad, calidad y eficacia exigen programas científicos complejos y exhaustivos para aportar todos los datos necesarios para obtener la aprobación. El coste de desarrollo de un nuevo producto se ha incrementado en los últimos 15 años en un 157 %. El tiempo que se requiere para desarrollar un nuevo producto y obtener una autorización de comercialización es de 8 a 12 años. El marco regulatorio constituye en la actualidad el principal



obstáculo a la innovación, seguido por el pequeño tamaño de los segmentos de mercado y la actitud negativa del consumidor ante cierto tipo de productos y nuevas tecnologías. Otro obstáculo importante es la falta de protección de la propiedad intelectual.

Las exigencias reguladoras no sólo han aumentado los costes de desarrollo de nuevos productos sino también los de mantenimiento de medicamentos ya existentes y como consecuencia se están generando importantes vacíos terapéuticos. Hoy en día existe una crisis de disponibilidad de medicamentos veterinarios en Europa. Los vacíos más importantes son para especies menores e indicaciones menores, especialmente en especies productoras de alimento. Dentro de las especies menores se encuentran la especie ovina productora de leche, la especie caprina, las aves menos el pollo, todos los peces salvo los salmónidos, los conejos y las abejas. La falta de medicinas para tratar y prevenir enfermedades en animales hace difícil el mantener unos estándares altos en la sanidad animal y constituye también un problema de salud pública, las autoridades son conscientes de este problema y se está trabajando para buscar vías de solución. Los animales sanos son esenciales para disponer alimentos seguros.



II. EL MEDICAMENTO INMUNOLÓGICO VETERINARIO

Las enfermedades infecciosas son la primera causa de mortalidad y pérdida económica en los animales domésticos. La vacunación es sin lugar a dudas la forma más económica de prevenir y controlar, e incluso erradicar, las enfermedades infecciosas.

Las vacunas veterinarias no sólo se emplean para prevenir enfermedades en los animales sino que también ayudan a resolver crisis de salud pública actuando de forma rápida y efectiva sobre patógenos emergentes y re-emergentes, la mayoría de los cuales no sólo afectan a los animales, sino que pueden ser transmitidos al hombre.

En el caso de infecciones virales, no se disponen de medicamentos de amplio espectro y las únicas herramientas disponibles para controlar la infección son medidas de tipo higiénico o la vacunación.

Los programas sanitarios coordinados entre las autoridades públicas y la profesión veterinaria, junto con el desarrollo de buenas técnicas de diagnóstico y medidas preventivas tales como la vacunación, constituyen un elemento clave para garantizar que los alimentos de origen animal son sanitariamente seguros.

Aunque las vacunas veterinarias sólo representan el 23% del mercado global de productos de sanidad animal (ver **Tabla 2**), el sector ha crecido de forma consistente en los últimos años, principalmente por los avances tecnológicos habidos en el desarrollo de productos inmunológicos. También ha influido en este crecimiento las restricciones en el uso de antibióticos por los problemas de residuos que generan y por la posibilidad de desarrollo de resistencias microbianas contra medicamentos utilizados en medicina humana.

La gran mayoría de las vacunas veterinarias que se comercializan en la actualidad son vacunas clásicas, vivas e inactivadas, producidas por métodos convencionales. Se tratan de medicamentos con un coste de producción bajo que han demostrado ser eficaces en el control de numerosas enfermedades, sobre todo de tipo bacteriano.

No obstante presentan ciertos inconvenientes. Las vacunas vivas clásicas contienen cepas atenuadas obtenidas de forma natural y, aunque eficaces, pueden presentar cierta virulencia residual. Además existe el riesgo potencial de recombinación y reversión a la virulencia. Las vacunas inactivadas están compuestas generalmente por cultivos completos del microorganismo inactivado o por extractos crudos del

mismo, aunque más seguras son menos inmunógenas que las vivas y requieren ser administradas en combinación con un adyuvante que potencie su inmunogenicidad, generalmente se necesita administrar más de una dosis para establecer y mantener una inmunidad adecuada. Existen determinadas enfermedades, fundamentalmente producidas por virus o parásitos, para los cuales no se disponen de vacunas eficaces.

Otro inconveniente de las vacunas convencionales es que no permiten diferenciar entre animales vacunados e infectados y por tanto interfieren con los sistemas de diagnóstico que se utilizan en las campañas de control y erradicación, pudiendo un país perder su estatus de libre de enfermedad. Esto ha llevado a que, a pesar de reconocerse su eficacia, se prohíba la utilización de vacunas en los programas de control sanitario de determinadas enfermedades, como por ejemplo la fiebre aftosa o la peste porcina clásica.

Los avances experimentados en los últimos años en el dominio de las técnicas de ingeniería genética y en el conocimiento de la biología molecular de los patógenos y los grandes avances que han tenido lugar en el campo de la inmunología, fundamentalmente en el conocimiento de la inmunidad innata y adquirida y de cómo las células T y las células B reconocen sus respectivos determinantes antígenos y de cómo se comunican las distintas poblaciones entre sí, han orientado e impulsado los estudios sobre nuevos sistemas de vacunación más seguros y eficientes. La tendencia es a la obtención de vacunas perfectamente definidas a nivel molecular que selectivamente activen la respuesta inmunitaria deseada.

La vacuna ideal debería activar este tipo de respuesta y establecer una inmunidad protectora, fundamentalmente frente a la infección, de forma rápida y duradera. El establecimiento rápido de la inmunidad es un factor importante en el caso de vacunaciones en situaciones de emergencia donde se persigue frenar la extensión del brote infeccioso.

En medicina veterinaria la vacunación es colectiva, no individual, el manejo de los animales es complejo y las vacunas generalmente se administran por vía parenteral. Es necesario estudiar nuevos sistemas de vacunación que faciliten la aplicación de este tipo de productos, como podría ser el diseño de vacunas eficaces con una dosis única o por otras vías de administración, por ejemplo la oral. También es deseable que sea estable e independiente de la cadena de frío. La vacuna debe ser segura para la especie de destino, para otras especies que convivan con



ella, para el ser humano y para el medio ambiente. Por último, el coste de producción debe ser bajo.

Una ventaja clara de la aplicación de las nuevas tecnologías al campo de las vacunas veterinarias es que han abierto la posibilidad de diseñar vacunas que contengan marcadores y que, en combinación con un sistema de diagnóstico adecuado, permitan la diferenciación entre animales vacunados sanos y animales infectados. Este tipo de vacunas marcadas son herramientas claves en las campañas de control y erradicación de las enfermedades y facilitan el mercado y movimiento de animales.





III. VACUNAS VIVAS DE SEGUNDA GENERACIÓN

Dentro de los nuevos diseños en vacunas vivas se encuentran los mutantes de delección obtenidos por ingeniería genética y los vectores recombinantes

Mutantes por delección genética

Las cepas atenuadas que forman parte de las vacunas vivas clásicas han derivado de una manera empírica a través de pases sucesivos en animales o en cultivos celulares, o por cambios en las temperaturas de crecimiento, o por modificaciones químicas, siendo el proceso una especie de “ruleta genética” que da como resultado una atenuación indefinida basada en la acumulación de numerosas mutaciones genéticas. Aplicando técnicas de ingeniería genética, hoy en día se pueden obtener mutantes por delección totalmente definidos genéticamente. Generalmente el criterio que se utiliza es el de eliminar aquellos genes responsables de la virulencia sin destruir la capacidad de infección ni de expresar epitopos inmunodominantes. El riesgo de reversión de las vacunas clásicas se reduce.

Esta tecnología permite la eliminación además de un gen no esencial, responsable de la expresión de una proteína inmunógena no relevante que pueda ser utilizada como proteína marcadora.

Esta tecnología permite la eliminación además de un gen no esencial, responsable de la expresión de una proteína inmunógena no relevante que pueda ser utilizada como proteína marcadora.

En Europa (ver **Tablas 3 y 4**)⁵ en el momento actual hay tres vacunas veterinarias autorizadas de este tipo: dos vacunas vivas, una contra la enfermedad de Aujeszky de la especie porcina y otra para la inmunización de los caballos frente a la infección producida por *Streptococcus equi*, y una vacuna inactivada frente al virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina.

La vacuna contra la enfermedad de Aujeszky⁶ además de no expresar un gen relacionado con la virulencia, el gen de la timidin-quinasa (TK),

5. European Public Assessment Report for authorised medicines. Veterinary Medicines.

European Medicines Agency, 2009. <http://www.emea.europa.eu/htmls/vet/epar/a.htm>

6. Ferrari, M., A. Brack, M.G. Romanelli, T.C. Mettenleiter, A. Corradi, N. Dal Mas, M.N.

Losio, R. Silini, C. Pinoni y A. Pratelli. A study of the ability of a TK-negative and gI/gE-negative pseudorabies virus (PRV) mutant inoculated by different routes to protect pigs against PRV infection. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health 47, 753-762, 2000

no expresa el gen de la glicoproteína E (gE) que actúa como proteína marcadora. En Europa solo se permite la utilización de vacunas contra esta enfermedad que no expresen este marcador. La vacuna bacteriana está compuesta por el mutante de delección *Streptococcus equi* TW928 que carece del gen *AroA*⁷. La vacuna inactivada frente al virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina⁸ (IBR) también es una vacuna marcada que no expresa la gE.

Vectores recombinantes

La aplicación de las técnicas de ingeniería genética también ha permitido la utilización de virus de animales y bacterias como vectores de expresión de genes no relacionados. Los vectores más utilizados son en primer lugar los poxvirus (el virus vacuna, el virus de la viruela aviar y el virus de la viruela del canario)⁹, seguidos por los adenovirus y los herpesvirus.

Uno de los primeros vectores utilizados a nivel experimental fue el virus vacuna. El virus vacuna¹⁰, y los poxvirus en general, presenta la ventaja frente a otros sistemas de expresión viral de que el tamaño de su genoma permite la inserción de varios genes procedentes de distintos patógenos en un vehículo único, sin perder la capacidad de infección; su replicación se produce en el citoplasma; no son oncogénicos; las proteínas disponen de los pasos de procesamiento adecuados, incluidos la glicosilación y transporte a membranas; inducen inmunidad humoral y celular, incluso tras la administración de una sola dosis; puede administrarse por distintas rutas y permiten la diferenciación entre vacunados e infectados. La seguridad del vector se puede aumentar mediante la delección de varios genes, como es el caso de la cepa NYVAC derivada de la cepa Copenhagen¹¹.

7. Jacobs, A.A., D. Goovaerts, P.J. Nuijten, R.P. Theelen, O. M. Hartford y T.J. Foster. Investigations towards an efficacious and safe strangle vaccine: submucosal vaccination with a live attenuated *Streptococcus equi*. Vet. Rec. 147, 563-567, 2000.

8. Van Oirschot, J.T., M.J. Kaashoek y E.A. Rijsewijk. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. Vet. Microbiol. 53, 43-54, 1996

9. Paoletti, E. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 11349-11353, 1996

10. Moss, B. y C. Flexner. Vaccinia virus expresión vectors. Ann. Rev. Immunol. 5, 305-324, 1987

11. Tartaglia J., M.E. Perkus, J. Taylor, E.K. Norton, J.C. Audonnet, W.I. Cox, S.W. Davis, J. Van der Hoeven, B. Meignier, M. Riviere. NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. Virology, 188, 217-232, 1992



La primera vacuna recombinante utilizada en el campo fue una vacuna contra el virus de la rabia, en la cual la glicoproteína G del virus se expresó en la cepa Copenhagen del virus vacuna¹². Esta vacuna se empleó con éxito en Europa y Estados Unidos en el control de la rabia mediante la inmunización de zorros y otros reservorios silvestres por vía oral.

El virus vacuna presenta el inconveniente de no ser específico de especie lo que ha cuestionado su utilización –sobre todo en Europa– ante el peligro potencial de expresión en animales distintos a la especie de destino.

Estas objeciones han llevado al estudio de otros vectores virales más específicos del hospedador como los poxvirus aviares. En concreto cepas atenuadas del virus de la viruela aviar y del virus de la viruela del canario están sirviendo de plataforma para el diseño de una gran variedad de vacunas veterinarias. Estos sistemas han demostrado su seguridad en un rango amplio de especies, presentando la ventaja de que la inmunización se consigue sin una replicación productiva del virus¹³ con lo que se reduce el riesgo de diseminación del vector.

Un inconveniente a tener en cuenta en este tipo de vacunas es que la inmunidad que se genera frente al vector puede reducir la eficacia de una segunda vacunación con el mismo vector.

Actualmente sólo existen cuatro vacunas vivas de esta categoría autorizadas en Europa. Tres de ellas utilizan como vector de expresión una cepa del virus de la viruela del canario y están indicadas para la protección frente a la leucemia felina y la protección frente a la influenza equina¹⁴. La cuarta es una vacuna bivalente para pollos, que utiliza el herpesvirus de pavo como vector de expresión, que protege frente al virus de la enfermedad de Marek y frente al virus de la bursitis infecciosa aviar (IBDV)¹⁵ (ver **Tabla 3**).

12. Pastoret, P.P., B. Brochier, J. Blancou, M. Artois, M. Aubert, M.P. Kieny, J.P. Lecocq, P. Languet, G. Chappuis y P. Desmettre. Development and deliberate release of a vaccinia-rabies recombinant virus for the oral vaccination of foxes against rabies. En: Recombinant Poxviruses, Binns M.M., Smith G.L., eds. CRC Press, Boca Raton, USA, 1992

13. Biotechnology in the diagnosis of infectious diseases and vaccine development. En: OIE Manual of Diagnostic test and vaccines for terrestrial animals 2008. Capítulo 1.1.7, 2008. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/1.1.07_BIOTECHNOLOGY.pdf

14. Minke, J.M., J.C. Audonnet y L. Fischer. Equine viral vaccines: the past, present and future. *Vet. Res.* 35, 425-443, 2004

15. Dartail, R., M. Bublot, E. Laplace, J.F. Bouquet, J.C. Audonnet y M. Riviere. Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV challenge in chicken. *Virology*, 211, 481-490, 1995



Tabla 3: Vacunas vivas veterinarias de segunda generación autorizadas por la Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos (EMA)

Mutantes de delección

Nombre comercial	Mutante de delección	Adyuvante	Indicación
<i>Equilis Srep E</i>	<i>S. equi</i> cepa TW928, Aro A ⁻	--	<i>Streptococcus equi</i>
<i>Suvaxyn Aujeszky 783 +O/W</i>	V. Aujeszky, cepa NIA3-783, TK ⁻ y gE ⁻	Al(OH) ₃ y Marcol 52	Virus de la enfermedad de Aujeszky

Vectores recombinantes

Nombre comercial	Antígeno	Vector expresión	Adyuvante	Indicación
<i>Purevax FELV</i>	vCP96 recombinante	V. viruela del canario	--	Virus leucemia felina
<i>Vaxxitek HVT+IBD</i>	vHVT013-69 recombinante (VP2 de IBDV)	Herpesvirus de pavo	--	Virus de la enfermedad de Marek Virus IBDV
<i>Proteqflu</i>	Influenza A/equi-2/Ohio/03 [H3N8] recombinante (vCP2242) (Hemaglutinina) Influenza A/equi-2/Newmarket/2/93 [H3N8] recombinante (Hemaglutinina)	V. viruela del canario	Carbomer	Influenza equina
<i>Proteqflu-Te</i>	Influenza A/equi-2/Ohio/03 [H3N8] recombinante (vCP2242) Influenza A/equi-2/Newmarket/2/93 [H3N8] recombinante (Hemaglutinina) Toxide <i>Cl. tetani</i>	V. viruela del canario	Carbomer	Influenza equina Toxina tetánica

Tabla 4: Vacunas inactivadas veterinarias de segunda generación autorizadas por la EMEA

Mutantes de delección

Nombre comercial	Mutante de delección	Adyuvante	Indicación
<i>Ibraxion</i>	Virus IBR, cepa gE-, inactivado	Parafina líquida	Virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina

Vacunas de subunidades que contienen proteínas purificadas de superficie

Nombre comercial	Antígeno	Adyuvante	Indicación
<i>Equilis Prequenza</i>	Hemaglutinina Neuraminidasa	Iscom	Influenza equina
<i>Equilis Prequenza Te</i>	Hemaglutinina Neuraminidasa Toxide tetánico	Iscom	Influenza equina Toxina tetánica
<i>Eurican Herpes 205</i>	gB de herpes virus canino	Parafina líquida	Herpes virus canino
<i>Nobivac Piro</i>	Antígeno soluble de <i>B. canis</i> y <i>B. rossii</i>	Saponina	<i>Babesia canis</i>

Vacunas de subunidades obtenidas por la tecnología de ADN recombinante

Nombre comercial	Antígeno	Vector expresión	Adyuvante	Indicación
<i>Bayovac CSF E2</i>	Glicoproteína E2	Baculovirus	Marcol 52	Virus de la peste porcina clásica
<i>Ingelvac Circoflex</i>	Proteína ORF2 tipo 2	Baculovirus	Carbomer	Circovirus porcino
<i>Neocolipor</i>	Fimbria F4 Fimbria F5 Fimbria F6 Fimbria F41	<i>E. coli</i>	Al(OH) ₃	<i>E. coli porcino</i>
<i>Porcilis AR-T DF</i>	Proteína dO <i>P. multocida</i> <i>B. bronquiseptica</i>	<i>E. coli</i>	dl- α -Tocoferol acetato	Rinitis atrófica de los lechones
<i>Porcilis PCV</i>	Proteína ORF2 tipo 2	Baculovirus	Parafina líquida dl- α -Tocoferol acetato	Circovirus porcino
<i>Porcilis pesti</i>	Glicoproteína E2	Baculovirus	Parafina líquida	Influenza equina



IV. VACUNAS INACTIVADAS DE SEGUNDA GENERACIÓN

Vacunas de subunidades

La reducción en las reacciones adversas típicas de las vacunas inactivadas mediante el empleo de la fracción soluble en solventes lipídicos del virus influenza, llevó al estudio de nuevas vacunas que contuvieran el inmunógeno más relevante, principalmente proteínas procedentes de la superficie de la partícula (envoltura o cápside externa), eliminando los componentes no esenciales del virión. Algunas de estas vacunas, además de la citada, han sido comercializadas y empleadas con éxito.

Muchos virus, bacterias y parásitos poseen proteínas de superficie que retienen su inmunogenicidad después de su aislamiento y pueden ser utilizadas en vacunas de subunidades. No obstante, este tipo de vacunas están parcialmente purificadas y aún contienen un gran número de epitopos irrelevantes. El paso siguiente ha sido intentar la obtención artificial de proteínas de superficie y sus fracciones activas, por clonaje molecular o por síntesis orgánica.

Hoy en día es posible identificar individualmente en el patógeno proteínas protectoras y epitopos y producirlas, mediante la tecnología del ADN (ácido desoxi-ribonucleico) recombinante, por clonaje y expresión del gen que la codifica en células hospedadoras procariontas o eucariotas. La biosíntesis de proteínas está siendo ampliamente utilizada en el desarrollo de vacunas de subunidades contra diversas enfermedades tanto de naturaleza vírica, como bacteriana o parasitaria. Frente a los otros procedimientos presenta la ventaja de aumentar la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna al eliminar otros componentes inmunosupresores o competidores. También permite la posibilidad de diseñar vacunas que diferencien entre vacunados e infectados. Los vectores de expresión que se emplean son: bacterias (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), células de mamíferos (CHO), baculovirus y plantas.

La expresión en células procariontas presenta una serie de inconvenientes como son: desnaturalización de la proteína por las proteasa de *E.coli*; posible contaminación con toxinas bacterianas, y el no poseer los mecanismos de glicosilación necesarios en el caso de síntesis de glicoproteínas. Por el contrario, las levaduras sintetizan

y procesan las proteínas por los mismos mecanismos que las células de los mamíferos y pueden efectuar con mayor facilidad los procesos glicosilativos necesarios para la obtención de las glicoproteínas de los virus con envoltura.

El clonaje y la expresión de genes es hoy en día una técnica muy extendida y se podría decir que existen muy pocas proteínas que no puedan ser producidas en grandes cantidades y con un alto grado de pureza, con la ventaja añadida de no contener ácido nucleico.

Destacar dentro de este tipo de vacunas los virosomas, partículas de entre 20-100 nm con una estructura similar a la viral pero que no contienen el ácido nucleico. Los virosomas pueden formarse por el ensamblaje de distintas proteínas de un mismo virus o de virus diferentes. Por su naturaleza particulada son capaces de estimular tanto una respuesta inmunitaria celular como humoral. En medicina humana se comercializan varias vacunas recombinantes de este tipo¹⁶. La primera autorizada fue la vacuna contra la hepatitis A y la más reciente es la vacuna contra el virus del papiloma humano¹⁷. En el campo de la sanidad animal, se está estudiando partículas con una estructura viral similar a la del virus de la lengua azul, formadas por la expresión y ensamblaje en baculovirus de cuatro proteínas estructurales de dicho virus. Estas partículas son seguras y han demostrado, combinadas con un adyuvante oleoso, proteger frente a la infección experimental¹⁸. Este sistema de expresión permite la combinación de proteínas procedentes de diferentes serotipos y ser utilizado como vacuna marcada¹⁹.

En lo que se refiere a las vacunas de subunidades que utilizan plantas como vectores de expresión, actualmente existen varias compañías que están trabajando en esta área de investigación. Las plantas producen subunidades antigénicas que pueden ser purificadas y recogidas a partir de la cosecha del cultivo. En un escenario ideal,

16. Metcalfe, I.C. y R. Glück. Virosomes for vaccine delivery. En: V.E.J.C. Schijns D.T. O'Hagan (Eds). Immunopotentiators in Modern Vaccines, Academic Press, Burlington, MA, pp 179-189, 2006.

17. Harper, D.M., E.L.Franco, C. Wheeler, D.G. Ferris, D. Jenkins, A. Schuind, T. Zahaf, B. Innis, P. Naud, N.S. De Carvalho, C.M. Roteli-Martins, J. Teixeira, M.M. Blatter, A.P. Korn, W. Quint y G. Dubin. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 364, 1247-1255, 2006.

18. Roy P., From genes to complex structures of bluetongue virus and their efficacy as vaccines. *Vet. Microbiol.* 33, 155-168, 1992.

19. Bhanuprakash, V., B.K. Indrani, M. Hosamani, V. Balamurugan y R.K. Singh. Blue-tongue vaccines: the past, present and future. *Expert Rev. Vaccines* 8(2), 191-204, 2009

se podría alimentar directamente a los animales, aunque para ello se requeriría altos niveles de expresión del antígeno.

En la **Tabla 4** se citan como ejemplo, vacunas veterinarias autorizadas por la Agencia Europea del Medicamento que contiene subunidades antigénicas purificadas o proteínas recombinantes.

Péptidos sintéticos

La utilización de péptidos obtenidos por síntesis orgánica ofrece, en principio, ventajas sobre otros sistemas de vacunación. Es un producto químicamente definido y no son necesarios procesos de purificación adicionales. No existe la necesidad de producción a gran escala y al no ser termolábiles, se aumenta la estabilidad y la vida media de la vacuna.

Los dos requerimientos básicos para una vacuna de péptidos son el disponer de una secuencia de aminoácidos capaz de interactuar con los linfocitos B y de una secuencia capaz de interactuar con linfocitos T. La identificación de los epitopos que reconocen los linfocitos B se realiza a partir de la localización de regiones de alta hidrofilia y de alta movilidad térmica, cuya probabilidad de ocupar posiciones sobre la superficie o formar una estructura secundaria en hélice alfa o giro beta sea alta. Otros sistemas se basan en la determinación de regiones de alta variabilidad. El problema a la hora de obtener péptidos que imiten el determinante antigénico para el linfocito B, es que en la mayoría de las ocasiones éste reconoce determinantes conformacionales que no son secuenciales. En cuanto a la identificación del epitopo que interactúa con los linfocitos T, éstos, al contrario que los anticuerpos, tienden a reconocer un número muy limitado de determinantes antigénicos que frecuentemente coinciden con regiones de naturaleza anfipática que presentan una zona posiblemente capaz de interactuar con la molécula del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) y otra con el receptor de la célula T²⁰. Existen dos limitaciones a la hora de utilizar péptidos de síntesis como vacunas, la restricción CMH y la baja inmunogenicidad.

A pesar de que los péptidos sintéticos para muchos representan el diseño de vacuna ideal, su desarrollo está siendo complejo. En los últimos veinte años son numerosos los esfuerzos que se han dedicado al

20. Berzofsky J.A. Features of T-cell recognition and antigen structure useful in the design of vaccines to elicit T-cell immunity. *Vaccines*, 6, 90-93, 1988

estudio de una vacuna sintética contra la fiebre aftosa y todavía existen problemas que no han sido resueltos²¹.

Vacunas de ADN

Los avances habidos en el campo de la terapia génica han contribuido al desarrollo de una nueva forma de vacunación, las vacunas de ADN. Recientemente se ha demostrado que la inoculación de plásmidos que codifiquen un gen de una proteína inmunogénica de un agente infeccioso en la piel o el músculo de un animal puede resultar en la expresión de la proteína y la estimulación del sistema inmunitario. Las vacunas de ADN presentan varias ventajas: su producción es relativamente económica, biológicamente son estables, no necesitan refrigeración durante su transporte, son seguras, estimulan una respuesta tanto humoral como celular, permiten la inmunización frente a varios antígenos a la vez y actúan en presencia de anticuerpos maternos. Además se pueden combinar diferentes genes simultáneamente y obtener así vacunas multivalentes. También permiten la diferenciación de animales vacunados de infectados. Desde un punto de vista teórico todavía sin demostrar, en su contra está la posible integración en el genoma del hospedador, la activación de proto-oncogenes, la inactivación de los genes supresores tumorales y la posibilidad de generar anticuerpos anti-nucleares.

En el campo veterinario²², en los últimos años se han llevado a cabo numerosas pruebas de vacunas ADN contra distintas enfermedades (fiebre aftosa, herpesvirus bovino, enfermedad de Aujeszky, peste porcina clásica, virus de la rabia, influenza aviar, virus respiratorio sincitial bovino, parvovirus canino, virus de la inmunodeficiencia felina, distintos virus de peces²³). La vacunación con ADN es una de las técnicas de inmunización más prometedoras frente a patógenos contra los cuales las vacunas convencionales no han sido efectivas.

Las primeras pruebas con vacunas ADN fueron desalentadoras ya que estimularon una baja o nula respuesta en la especie de destino.

21. Vaccine Technology. En: Veterinary Vaccines, Animal Pharm Reports, Capítulo I, 2005. <http://www.animalpharmnews.com/magnoliaPublic/ap/reports/2005/chapter1/veterinary-vaccines.html>

22. Dhama K., M. Mahendran, P.K. Gupta y A. Rai. DNA vaccines and their applications in veterinary practice: current perspectives. Vet. Res. Commun. 32, 341-356, 2008

23. Kurath G. Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. Rev. Sci. Tech. 27(1), 175-196, 2008.



Sin embargo, como veremos a continuación, el desarrollo de nuevos sistemas adyuvantes diseñados para potenciar la inmunogenicidad y disminuir la dosis han devuelto las esperanzas en este modelo. Se han estudiado también mecanismos que mejoren el transporte y la expresión en las células diana de la piel o el músculo del animal.

Las primeras dos vacunas veterinarias de ADN fueron aprobadas en 2005, una en Estados Unidos y la otra en Canadá. La primera fue una vacuna para caballos contra el virus de West Nile²⁴ y la segunda una vacuna para la prevención de la necrosis hematopoyética infecciosa de los salmones²⁵. En Europa no existe al día de hoy ninguna vacuna autorizada de este tipo.

24. Davis, B.S., G. J. Chang, B. Cropp, J.T. Roehrig, D.A. Martin , C.J. Mitchell, R. Bowen y M.I. Bunning. West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Virol.* 75: 4040-4027, 2001.
25. Simard, N., C. Lyngoy, V. Funk, G. Traxler, S. LaPatra y K. Salenius. Research to market: meeting safety and efficacy requirements for a DNA vaccine used in Atlantic salmon. En: *Proceedings of the International Veterinary Vaccine and Diagnostics Conference*, Oslo, Norway. Ed: I. Olsen and T. Gjøen, p. 46, 2006.





V. ADYUVANTES INMUNOLÓGICOS

Un problema que presentan las vacunas inactivadas y muy especialmente los nuevos diseños de vacunas basados en subunidades purificadas y vacunas de ADN, es que son inmunógenos débiles y necesitan que se combinen con adyuvantes inmunitarios que potencien su inmunogenicidad.

Los adyuvantes fueron por primera vez descritos por Ramon en 1925²⁶ como sustancias que combinadas con un antígeno producían una respuesta inmunitaria mas fuerte que la inducida por el antígeno sólo. Desde entonces se han valorado muchas sustancias naturales y sintéticas para potenciar la respuesta inmunitaria y la eficacia de las vacunas. Los adyuvantes inmunológicos constituyen un grupo amplio y heterogéneo de sustancias capaces de estimular el sistema inmunitario de una manera inespecífica y por tanto aumentar la respuesta contra sustancias débilmente antigénicas

La respuesta del sistema inmunitario frente a un estímulo antigénico se caracteriza por su heterogeneidad potencial. El carácter de la misma (humoral, celular, local o sistémica) está sujeto al proceso de inmunización y a la naturaleza de la interacción del antígeno con las células del sistema inmunitario. En esta interacción, juega un papel muy importante el vehículo que se utilice para administrar el antígeno.

Definir el mecanismo de acción de un adyuvante es difícil debido a la complejidad del sistema inmunitario y a la propia complejidad de su composición, reforzada por la particularidad de que un único componente puede tener múltiples efectos.

Un aspecto clave en el desarrollo de nuevos adyuvantes es su toxicidad. Muchos de los adyuvantes que han demostrado una actividad potente han visto restringido su uso por los efectos adversos que producen.

Actualmente se tiende hacia un diseño racional de vacunas en el que se empleen por un lado, estructuras antigénicas perfectamente caracterizadas y, por otro, sistemas adyuvantes que sean capaces de estimular el tipo de respuesta inmunitaria deseada y que además sean tolerados por el individuo.

26. Ramon G. Sur la toxine et l'anatoxine diphthériques. Pouvoir floclulant et propriétés immunisantes. Ann. Inst. Pasteur, 38, 1-10, 1924.



Mediante la incorporación de un determinado adyuvante a la formulación se puede conseguir acelerar el establecimiento de la inmunidad. Un adyuvante puede además aumentar la duración de la misma. También puede influir selectivamente en el tipo de respuesta inmunitaria que se estimule, induciendo una respuesta bien del tipo *T helper* 1 (Th1) o *T helper* 2 (Th2), ó puede favorecer el procesamiento endógeno del antígeno en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I o clase II y activar la respuesta de poblaciones de células T citotóxicas CD8+. La incorporación de un adyuvante puede hacer disminuir la dosis de antígeno necesaria, aspecto importante cuando la capacidad de producción es limitada. También puede mejorar la estabilidad de la vacuna. El adyuvante que se seleccione puede permitir vías de administración distintas a la vía parenteral.

Los adyuvantes se pueden agrupar por su estructura en adyuvantes particulados y no particulados. En la **Tabla 5** se relaciona una selección perteneciente a ambos grupos indicando su mecanismo de acción principal.

Adyuvantes particulados

Los adyuvantes particulados²⁷ incluyen una serie de sustancias que existen como partículas y deben en parte su mecanismo de acción a esta propiedad. Se trata de sustancias que provocan la formación de un depósito del antígeno en el lugar de inyección, del cual se libera lentamente ampliando el tiempo de interacción entre el antígeno y la célula presentadora. También pueden actuar como vehículos de los antígenos favoreciendo su presentación a estas células. Dentro de este tipo de adyuvantes se encuentran:

- Las sales minerales como el fosfato de aluminio o el hidróxido de aluminio. El gel de hidróxido de aluminio por su baja toxicidad es el único adyuvante autorizado en vacunas humanas y es un componente que con frecuencia forma parte de la composición de las vacunas veterinarias. Da lugar a un depósito de corta duración, es un buen vehículo e induce una fuerte respuesta del tipo Th2²⁸.

27. D.T. O'Hagan y M. Singh. Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems. *Expert Rev. Vaccines* 2(2), 269-283, 2003

28. Cox, J.C. y A.R. Coulter. Adjuvants. A classification and review of their modes of action. *Vaccine*, 15(3), 248-256, 1997



- Las emulsiones oleosas del tipo agua/aceite o agua/aceite/agua a base de aceites minerales o de aceites metabolizables, también utilizadas comúnmente en vacunas veterinaria. Este tipo de adyuvantes forman depósitos más duraderos y estimulan una buena respuesta humoral.

- El MF59, que es una emulsión oleosa del tipo aceite/agua compuesta a base de aceite de escualeno. Este adyuvante ha sido autorizado para uso en humanos²⁹ por su buena tolerancia. Actúa como vehículo y favorece la presentación del antígeno a las células inmunocompetentes.

- El complejo inmunoestimulante ISCOM³⁰, que es una matriz con una estructura estable característica tipo jaula de un diámetro medio de 35 nm que resulta de la interacción de una proteína antigénica, el adyuvante Quil A, moléculas de colesterol y fosfolípidos. Este complejo tiene la gran ventaja de permitir la incorporación en una misma estructura del antígeno y del adyuvante. Este tipo de estructuras ha demostrado estimular una potente respuesta inmunitaria tanto humoral como celular. Hoy en día existen vacunas veterinarias en el mercado que emplean este complejo (ver **Tabla 4**).

- Los liposomas, esferas concéntricas compuestas de bicapas de fosfolípidos. Sus propiedades adyuvantes dependen del número de capas que lo forman, la carga neta, la posición lipídica, el tamaño y el modo de localización del antígeno dentro del mismo³¹. Por su naturaleza versátil los liposomas permiten la incorporación de otras moléculas inmunomoduladoras tanto lipófilas como hidrófilas y así consiguen un efecto sinérgico.

- Dentro de los nuevos sistemas adyuvantes particulados citar las nano y micro partículas constituidas por polímeros biodegradables, fundamentalmente el ácido poli-DL-láctico-co-glucólico (PLG) y el ácido poliláctico (PLA). Este tipo de polímeros son prácticamente inocuos y se utilizan en medicina humana para la fabricación de suturas e implantes. El principal atractivo de estas partículas es que se puede controlar la velocidad de liberación y por tanto formar un depósito del cual el antígeno encapsulado es liberado gradual y lentamente. Gracias

29. Peek, L.J. C.R. Middaugh y Berkland C. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* 60, 915-928, 2008.

30. Morein, B., K. Lövgren, S. Höglund y B. Sundquist. The ISCOM: an immunostimulating complex. *Immun. Today*, 8, 333-338, 1987

31. Gregoriadis G. Immunological adjuvants: a role for liposomes. *Immun. Today*, 11, 89-97, 1990

a ello se puede conseguir un aumento de la duración de la inmunidad o incluso el desarrollo de vacunas efectivas a dosis única³².

- También se están estudiando nanopartículas no biodegradables⁹, compuestas a base de oro, latex, sílice o poliestireno, como adyuvantes y sistemas de transporte, en concreto como vehículo de vacunas ADN administradas por electroporación o por vía intradérmica.

Adyuvantes no particulados

Dentro de los adyuvantes no particulados se agrupan sustancias que presentan una actividad inmunomoduladora. Dentro de esta categoría se encuentran:

- La saponina y sus derivados Quil A y QS 21³³. La saponina es un glicósido triterpénico que se extrae de la planta *Quillaria saponaria*. La saponina es otro de los adyuvantes que se utilizan con frecuencia en vacunas veterinarias, sola o combinada con el hidróxido de aluminio. Su actividad adyuvante es consecuencia de su actividad como agente tensoactivo y de la capacidad que tiene de unirse al colesterol en las membranas celulares formando poros y favoreciendo la presentación del antígeno a las células inmunocompetentes a través de la ruta endógena, permitiendo la estimulación de la respuesta T citotóxica.

- Otro adyuvante con actividad inmunoestimulante es el monofosforil lípido A, un derivado del lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella Minnesota*, que conserva la mayoría de las propiedades adyuvantes del LPS pero con una toxicidad reducida. Es un agonista del receptor TL4 (*toll-like*) y, entre otros efectos, provoca una fuerte respuesta Th1.

- También dentro de esta categoría se encuentran las citoquinas, mediadores endógenos de naturaleza glicoproteica capaces de modular la respuesta inmunitaria. Dentro de ellas citar como ejemplo la interleuquina (IL)-1, la IL-2, la IL-12 y el interferón (IFN)- γ . A pesar de su actividad, su coste de producción es elevado y presentan los inconvenientes de ser específicas de especie, tener cierta toxicidad y por

32. Jaganathan, K.S., Y.U. Rao, P. Singh, D. Prabakaran, S. Gupta, A. Jain, S.P. Vyas. Development of a single dose tetanus toxoid formulation based on polymeric microspheres: a comparative study of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) versus chitosan microspheres. *Int. J. Pharm.* 294, 23-32, 2005.

33. Rajput Z.I., S. Hu, C. Xiao, A.G. Arijo. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 8(3), 153-161, 2007

su naturaleza proteica ser inestables. En el caso de las vacunas ADN, se ha probado potenciar su actividad asociando la vacuna con plásmidos que expresan citoquinas.

- El conocimiento de que la inmunidad innata está regulada por una red compleja de interacciones receptor-ligando, que reconoce componentes altamente conservados de los patógenos, denominados patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMP), ha abierto una nueva línea de investigación de adyuvantes³⁴. El reconocimiento por este sistema de receptores de estos componentes, produce su activación y da lugar a una reacción en cascada que resulta en la producción de una variedad de citoquinas las cuales, activan y dirigen el desarrollo de la inmunidad adquirida. Estos receptores se encuentran presentes en la superficie de la piel y de las mucosas y son expresados por distintas células inmunitarias, incluidas las células presentadoras de antígenos y los linfocitos. Moléculas que activen la inmunidad innata constituyen una nueva clase de adyuvantes. Este tipo de moléculas además de activar la respuesta inmunitaria podrían ser utilizadas de forma selectiva para diseñar el tipo de respuesta deseada. Frente al uso directo de citoquinas presentan la ventaja de que se consigue una estimulación regulada de la respuesta inmunitaria adquirida. Dentro de este tipo de adyuvantes se encuentran los oligodeoxinucleótidos sintéticos que, al igual que el ADN bacteriano y a diferencia del ADN de los vertebrados, contienen moléculas CpG (C de citosina, G de Guanina y p *-phospho*-por el enlace fosfo diester que las une). Secuencias de moléculas CpG insertadas en el plásmido de vacunas ADN han conseguido aumentar su inmunogenicidad³⁵.

34. Mutwiri G., V. Gedts, M. Lopez y L.A. Babiuk. Innate immunity and new adjuvants. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 26: 147-156, 2007

35. Pontarrollo R.A., L.A. Babiuk, R. Hecker y S. Van Drunen Little-Van Den Hurk. Augmentation of cellular immune responses to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D by vaccination with CpG-enhanced plasmid vectors. J. Gen. Virol. 83, 2973-2981, 2002

Tabla 5.: Selección de adyuvantes que han sido utilizados para aumentar la respuesta inmunitaria de vacunas veterinarias

		Immunomoduladora	Vehículo	Presentación	Inducción CTL	Depósito
Particulados	Geles de Al(OH) ₃	Fuerte Th2	+	-	-	+ (corta duración)
	Emulsiones w/o y w/o/w	Débil	-	-	-	+++ (corta duración)
	Emulsiones o/w (MF 59)	Débil	+	+++	-	-
	ISCOMs®	Fuerte Th1 y Th2	+++	++++	++++	-
	Liposomas	-	++	+++	++	-
	Micro y nanopartículas					
	< 10 µm	-	++++	-	-	-
	> 10 µm	-	-	-	-	+++ (larga duración)
	Saponina/Quil A/QS21	Fuerte Th1 y Th2	-	-	+	-
	Lípido A	Fuerte Th1	-	-	-	-
No particulados	Citoquinas (ej: IL-1, IL-2, IL12, IFN-γ)	Varios	-	-	-	-
	Agonistas receptores inmunidad innata, PAMP (ej: CpG)	Varios	-	-	-	-

VI. DESARROLLO INDUSTRIAL DEL MEDICAMENTO INMUNOLÓGICO VETERINARIO.

Que la investigación de una nueva vacuna constituya un éxito científico no es suficiente para que pueda ser comercializada y finalmente utilizada en el campo. El desarrollo industrial es un proceso largo y complejo, condicionado por diversos factores y que debe ser contemplado desde un contexto económico.

En primer lugar, antes de que un nuevo medicamento veterinario pueda ser puesto en el mercado debe obtener una autorización de comercialización, lo cual implica una revisión rigurosa, científica e independiente por parte de las autoridades reguladoras para asegurar que es seguro, de alta calidad y eficaz. Como veremos a continuación, las diferentes fases que componen el desarrollo industrial de una vacuna están dirigidas a satisfacer los requerimientos que establece la legislación. Esta legislación está en un proceso de continua revisión, y vacunas que podrían haber sido registradas hace 20 años hoy no serían autorizadas.

Al proyectar el desarrollo industrial de una nueva vacuna es importante definir el perfil y las características del producto que se pretende comercializar, y hacer una valoración inicial de las pruebas que hay que realizar para cumplir todos y cada uno de los requerimientos que la legislación exige para autorizar su comercialización. Se deben tener en cuenta los requisitos especiales para vacunas vivas así como la legislación que se aplica en caso de utilizar organismos modificados genéticamente (OMG). La realización de estas pruebas marcará no sólo el coste de desarrollo del producto sino también el tiempo que tardará en comercializarse.

Como término medio el desarrollo industrial de una nueva vacuna puede durar de 5 a 7 años, y el proceso de autorización de un año y medio a 3 años. La legislación puede cambiar durante el desarrollo del producto y afectar tanto al coste, como al tiempo del mismo.

En Europa, los medicamentos que utilizan en su desarrollo técnicas de ADN recombinante deben ser obligatoriamente autorizados a nivel comunitario a través del procedimiento centralizado³⁶.

36. Reglamento (CE) nº 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo del 31 de marzo del 2004 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos. Diario Oficial L136/1, 30.04.2004

Existen enfermedades cuya distribución geográfica es limitada y este procedimiento de autorización sólo es viable si el mercado lo justifica. Como parte del desarrollo también es importante conocer la postura del consumidor ante las nuevas tecnologías.

Por las particularidades del sector veterinario que ya hemos comentado, un factor a tener en cuenta es el precio de la dosis. El propietario de un animal, a menos que exista una obligatoriedad por parte de las autoridades sanitarias, sólo vacunará sus animales si el coste de la intervención tiene un retorno económico positivo.

No menos importante es valorar la capacidad de fabricación y, si desde el punto de vista industrial, tecnológicamente es factible.

Por último, es necesario conocer las políticas sanitarias y las normas del mercado internacional frente a una determinada enfermedad y si están a favor o en contra de la vacunación. Para la industria el que un gobierno pueda decidirse a favor de una campaña de vacunación contra una enfermedad específica es un factor importante a la hora de decidir el desarrollo de una nueva vacuna, o la mejora de una vacuna disponible. Un ejemplo reciente ha sido en Europa el desarrollo por parte de varios laboratorios nacionales y multinacionales de vacunas frente a el virus de la lengua azul. En cuanto a las normas del comercio internacional, a menos que la decisión sea a nivel europeo, estas pueden condicionar la utilización del producto. Cualquier país que haya conseguido erradicar una enfermedad específica exigirá que toda la carne o animal vivo que se importe este libre de la misma, como consecuencia, los países exportadores se verán forzados a adoptar campañas similares para proteger sus exportaciones.

Calidad de los medicamentos inmunológicos

Se ha comentado anteriormente que las diferentes fases y pruebas a realizar durante el desarrollo industrial de una vacuna están marcadas por la legislación que se aplique en el país donde se quiere comercializar el medicamento³⁷. El objetivo es generar toda la documentación que en términos de *Calidad, Seguridad y Eficacia* la legislación requiere para poder obtener una Autorización de Comercialización. En Europa, la Directiva

37. Desmettre, Ph. y S. Martinod. Research and Development. En: *Veterinary Vaccinology*, capítulo 9. Ed: PP Pastoret, J. Blancou, P. Vannier y C. Verschuere, Elsevier Science B.V., 1997

2001/82/CE³⁸ modificada^{39, 40}, establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios. En el anexo I de dicha Directiva se describen las normas y protocolos analíticos, de inocuidad, preclínicos y clínicos en materia de ensayos. En el título II de dicho anexo se describen los requisitos relativos a los medicamentos veterinarios inmunológicos. Esta normativa se complementa con directrices de la Comisión Europea⁴¹, que tratan sobre distintos aspectos específicos relacionados con la calidad, seguridad y eficacia, y con los requerimientos que establecen la Farmacopea Europea⁴² y las Farmacopeas Nacionales.

Es importante que en las distintas etapas de desarrollo se tengan en cuenta las normas de buenas prácticas de fabricación, de buenas prácticas de laboratorio y, en los estudios con animales, las buenas prácticas clínicas. Su no cumplimiento invalidará los estudios que se realicen.

El primer requisito que debe cumplir un medicamento para que sea autorizado en la Unión Europea es que se produzca en unas instalaciones que hayan sido inspeccionadas y que dispongan de un certificado oficial de cumplimiento con las normas de buenas prácticas de fabricación según establece la Directiva 91/412/CE⁴³. Una planta que produzca vacunas⁴⁴, además de los requisitos básicos aplicables a la fabricación de todo medicamento, debe cumplir los específicos que se aplican a la fabricación de medicamentos inmunológicos veterinarios y a la fabricación de medicamentos estériles. El objetivo de esta normativa es garantizar que los medicamentos que se liberan al mercado sean fabricados de forma consistente y adecuada.

38. Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios. Diario Oficial L311, 28.11.2001

39. Directiva 2004/28/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004 que modifica la Directiva 2001/82/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios Diario Oficial L 136 58, 30.4.2004

40. Directiva 2009/9/CE de la Comisión de 10 de febrero de 2009 que modifica la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios. Diario Oficial L44/10, 14.2.2009

41. Scientific Guidelines for Veterinary Medicinal Products. European Medicines Agency. <http://www.emea.europa.eu/htms/vet/vetguidelines/background.htm>

42. European Pharmacopoeia, 6th Edition. EDQM, Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, Francia, ISBN 978-92-871-6054-6, 2007

43. Directiva 91/412/CE de la Comisión de 23 de julio de 1991 por la que se establecen los principios y directrices de las prácticas correctas de fabricación de los medicamentos veterinarios. Diario Oficial L 228/70, 17.8.1991

44. The Rules Governing Medicinal Products In the European Community. Volume 4: Guidelines for Good Manufacturing Practise for Medicinal Products for human and veterinary use. http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/eudralex_en.htm

Dada la variabilidad inherente a los productos biológicos es de suma importancia que esta normativa se cumpla durante el desarrollo del producto, sobre todo en las primeras etapas de preparación de los bancos maestros y de trabajo, y en la elaboración de los lotes pilotos que se utilizarán en las pruebas de seguridad y eficacia, y en todas y cada una de las fases de su producción. A diferencia de los medicamentos farmacológicos, los productos biológicos no contienen moléculas pequeñas con una composición química definida, por lo que los controles de calidad que se pueden aplicar sobre el producto final aportan una información muy limitada. Además su producción se caracteriza por la realización de varios pases de cultivo y ausencia de procesos de esterilización terminal y ello implica un riesgo de contaminación.

Para garantizar la consistencia en la calidad de los lotes, la producción se debe realizar aplicando *un sistema de lote de inóculo*. Esto significa que todos los lotes que se produzcan deben partir de un banco de inóculo de trabajo del microorganismo, que a su vez ha sido preparado a partir de un banco de inóculo maestro. Asimismo y para minimizar la variabilidad, se debe establecer un número máximo de pases durante el proceso, que a menos que se justifique no debe ser superior a cinco.

El primer paso en el desarrollo industrial de una vacuna es por tanto la preparación y caracterización de los bancos maestros y de trabajo de los microorganismos, así como de las líneas celulares que se utilicen para la propagación de los virus.

Es importante realizar una caracterización completa de los bancos que se preparen utilizando técnicas microbiológicas, bioquímicas, serológicas y moleculares y además +comprobar la ausencia de contaminación bacteriana y fúngica, la ausencia de contaminación por micoplasmas y la ausencia de contaminación por otros agentes extraños. Los métodos que se deben aplicar para garantizar la pureza de los bancos de microorganismos y líneas celulares están descritos en la Farmacopea Europea y en las directrices específicas de vacunas veterinarias. Mediante la realización de técnicas generales y específicas, y la utilización de líneas celulares apropiadas (cultivos primarios de la especie de origen, cultivos sensibles a virus patógenos para la especie de destino y cultivos sensibles a pestivirus), se pretende demostrar la ausencia de contaminación por virus y bacterias específicos tanto de la especie de origen del material de partida, como de las especies a las que

el producto va a ir destinado. En el caso de bancos de líneas celulares se debe identificar la especie de origen y demostrar la estabilidad de la línea mediante el análisis cariológico del banco maestro y del pase más alto que se utilice durante la producción; también se deben llevar a cabo ensayos de tumorigenicidad.

Es clave en las primeras fases del desarrollo del producto la selección de los materiales de partida que van a intervenir en la producción, sobre todo aquellos que sean de origen animal. Aunque la tendencia sea la utilización de medios de cultivo sintéticos, en la elaboración de un producto biológico es difícil evitar la utilización de materiales de origen animal y estos pueden constituir una fuente de contaminación. Se deben establecer controles lo suficientemente sensibles y métodos válidos de inactivación para garantizar su pureza. Asimismo, con el fin de minimizar el riesgo de transmisión de agentes responsables de las encefalopatías espongiiformes, en el caso de materiales de partida de origen rumiante se debe conocer su origen geográfico y, en la medida de lo posible, seleccionar proveedores que dispongan de certificados de idoneidad emitidos por el EDQM (EDQM, European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care), organismo de la Comisión Europea responsable de la valoración de la calidad de los medicamentos.

A escala de laboratorio, se optimizarán y establecerán los procesos de producción, se pondrán a punto los métodos de control y se estudiará la formulación de la vacuna. Si existe una monografía específica se tendrán en cuenta los requerimientos que establezca para su producción y control. También se llevarán a cabo estudios dosis-respuesta que permitan definir la composición cuali-cuantitativa.

En vacunas veterinarias y en el caso de presentaciones multidosis, se permite la incorporación de un conservante para evitar la contaminación del producto durante su administración en el campo. Se deberá demostrar la eficacia de dicho conservante en el producto final, teniendo en cuenta los criterios que frente a bacterias y hongos dicta la Farmacopea Europea.

A partir del banco de inóculo de trabajo se prepararán lotes piloto. La preparación de estos lotes piloto va a permitir la validación de los procesos de producción y de control. La consistencia de la fabricación a escala industrial se demostrará aportando datos de la producción de tres lotes consecutivos de vacuna cuyo tamaño sea como mínimo un 10% del tamaño del lote comercial.



En el caso de vacunas inactivadas, el proceso de inactivación es una etapa crítica. Mediante estudios de cinética de inactivación se calcula el tiempo necesario para la total inactivación del producto. El tiempo total establecido para el procedimiento de inactivación debe superar como mínimo en un 33% al tiempo requerido para la inactivación. El título del cultivo que se utilice en estos estudios fijará el máximo permitido para la conformidad de un lote de antígeno. La sensibilidad del método utilizado para controlar la inactivación debe ser demostrada.

Otros controles críticos que deben ser validados son el método de control de esterilidad en el producto final, el método de cuantificación que se aplique para formular la vacuna, el método de cuantificación del adyuvante y del conservante y el método de valoración de la potencia de la vacuna. La validación de este último es particularmente compleja ya que se deberá demostrar estadísticamente su correlación con la eficacia de la vacuna en la especie de destino. En la medida de lo posible se recomienda el desarrollo de métodos *in vitro* que reduzcan la utilización de animales de experimentación.

A partir de la información generada, se establecerán las especificaciones y límites de aceptación que deberán cumplir tanto los productos en fase como el producto terminado. En general la Farmacopea Europea establece que en cada lote de producto final se controle: la esterilidad o pureza, las características generales, la seguridad en una de las especies de destino, la identidad del principio activo y la potencia. En el caso de vacunas vivas se deberá controlar la humedad residual y la concentración en gérmenes viables. En el caso de vacunas inactivadas se deberá garantizar la inactivación realizando un segundo control, y se determinará la concentración del agente inactivante residual. Se identificará y cuantificará el adyuvante, si es posible, y el agente conservante.

Por último y utilizando lotes piloto, se llevarán a cabo con las distintas presentaciones comerciales estudios de estabilidad a tiempo real, que van a permitir demostrar la compatibilidad del producto con el material de acondicionamiento y fijar las condiciones de conservación de la vacuna y el periodo de validez.

Seguridad de los medicamentos inmunológicos

El objetivo que se persigue con las pruebas de seguridad es evaluar el riesgo potencial del uso de la vacuna. No solo se debe demostrar que la nueva vacuna es segura y eficaz para todas y cada una de las especies a la que va destinada, sino también que es segura para



otras especies que convivan con la especie vacunada, para la persona que lo administra y para el consumidor. También se valorará que el medicamento inmunológico no representa un riesgo potencial para el medio ambiente.

Tabla 6: Requisitos de seguridad y eficacia de los Medicamentos Inmunológicos (Directiva 2001/82/CE y sus modificaciones y Directiva 2001/18/CE)

<p>Pruebas de laboratorio de Seguridad</p>	<p>Seguridad de la administración de una dosis Seguridad de la administración repetida de una dosis Seguridad de la administración de una sobredosis Examen de la función reproductora Examen de las funciones inmunológicas Estudio de residuos Interacciones Seguridad para el usuario Evaluación ecotoxicidad</p> <p><i>Requisitos especiales vacunas vivas</i> Transmisión de la cepa vacuna Ausencia de excreción Distribución en el animal vacunado</p> <p>Estudios de reversión a la virulencia</p> <p>Recombinación o redistribución genómica de las cepas Propiedades Biológicas</p>
<p>Pruebas de laboratorio de Eficacia</p>	<p>Protección por desafío infeccioso Establecimiento de la inmunidad Duración de la inmunidad Interferencia de los anticuerpos maternos</p>
<p>Ensayos Clínicos</p>	<p>Pruebas de campo de seguridad Pruebas de campo de eficacia</p>
<p>Evaluación Riesgo Medioambiental</p>	
<p>Medicamentos que contienen OMG</p>	<p>Información técnica (Anejo IIIA Directiva 2001/18/CE)</p> <p>Evaluación riesgo para la salud humana y el medio ambiente (Anejo II, Directiva 2001/18/CE)</p>

En la **Tabla 6** se presenta la relación de las pruebas de seguridad establecidas en la legislación para garantizar la seguridad de la administración de un medicamento inmunológico.

El primer paso es la realización de *pruebas controladas de laboratorio* en la especie de destino para demostrar la seguridad de la administración de una dosis. En el estudio se utilizará un lote de medicamento producido según el proceso de fabricación propuesto. En el caso de vacunas vivas la dosis debe contener el título máximo especificado y en el de vacunas inactivadas el máximo contenido de antígeno. El medicamento se administrará por todas las vías de administración recomendadas a animales de cada especie y categoría en las que se vaya a utilizar, incluyendo animales de la edad mínima de administración y, en el caso de que se recomiende su uso, hembras gestantes. Los animales se observarán durante un periodo mínimo de 14 días para signos de reacciones sistémicas o locales. Se registrará la temperatura corporal y en la medida de lo posible otros parámetros productivos. Se realizará también un examen detallado macroscópico y microscópico del punto de inyección.

Si en la pauta de vacunación se recomienda la administración de más de una dosis, esto obliga a demostrar la seguridad de la administración de varias dosis vacunales a intervalos de tiempo. Este estudio se realizará fundamentalmente con el fin de detectar posibles reacciones alérgicas que puedan producirse como consecuencia de la administración repetida de la vacuna durante la vida del animal. El diseño del estudio es similar al anterior, prestando especial atención a la ausencia de shock anafiláctico y otros signos de tipo alérgico.

También se investigará el riesgo potencial de la administración de una sobredosis. En el caso de las vacunas inactivadas se administra el doble de la dosis recomendada y en el caso de las vacunas vivas, diez veces la dosis recomendada. La realización de esta prueba es sobre todo importante en el caso de vacunas vivas por su posible virulencia residual. Aunque hasta ahora se exigía la realización de pruebas de sobredosis en todo tipo de vacunas, recientemente y en aras del bienestar animal se ha publicado una modificación del anejo 1⁴⁰ de la Directiva 2001/82/CE limitando la exigencia de pruebas de sobredosificación a las vacunas vivas.

Bien formando parte de *las pruebas controladas de laboratorio* o en *las pruebas de campo*, se deberá evaluar como la vacunación puede

afectar a la función reproductora de machos y hembras gestantes y no gestantes. También se investigarán los posibles efectos adversos en la progenie, así como posible efectos teratogénicos y abortivos. En el caso de que la vacuna se recomiende para hembras gestantes, la seguridad se deberá valorar en las distintas fases de la gestación. Asimismo es necesario realizar un estudio del efecto sobre las funciones inmunológicas del animal.

En el caso de vacunas vivas existen unos requisitos especiales. En primer lugar se investigará la posible transmisión de la cepa vacunal desde el animal vacunado a otros animales no vacunados que convivan con él, así como la transmisión a otras especies que puedan ser sensibles a la cepa vacunal.

Se llevarán a cabo estudios sobre la excreción de la cepa vacunal, determinando la presencia del microorganismo en las heces, orina, leche, huevos y secreciones, y la distribución de la misma en el cuerpo, prestando especial atención a los lugares favoritos de replicación del microorganismo. En el caso de vacunas contra enfermedades zoonóticas se tendrá en cuenta la persistencia de la cepa vacunal en el punto de inyección.

En este tipo de vacunas se deberá realizar estudios para demostrar la estabilidad genética y la no reversión a la virulencia. Esta prueba se debe llevar a cabo con material procedente del banco maestro o, si esto no fuera posible, con el pase menos atenuado utilizado para la producción. La vacunación inicial se realiza por la vía de administración que pueda producir con mayor probabilidad la reversión a la virulencia y se llevará a cabo como mínimo cinco pases seriados en animales de la especie de destino. En cada pase los animales son observados para signos clínicos y reacciones locales o sistémicas, también se registra la temperatura corporal y parámetros de tipo productivo. En el último pase, se debe efectuar una caracterización completa del aislado y comparar los resultados obtenidos con el inóculo maestro.

Por último, es preciso evaluar la probabilidad de recombinación o redistribución genómica de la cepa.

Los medicamentos inmunológicos se encuentran fuera del ámbito de aplicación del Reglamento que establece la fijación de límites máximos de residuos de medicamentos en los alimentos de origen animal⁴⁵. A menos que se utilicen adyuvantes u otros componentes

45. Reglamento CEE N° 2377/90 del Consejo de 26 de junio de 1990 por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. Diario Oficial L224/1, 18.8.90

en la formulación que sí estén afectados por esta reglamentación, generalmente no es necesario realizar estudios de depleción de residuos para fijar un tiempo de espera.

Si entre las características del producto se desea incluir una declaración de compatibilidad con otros medicamentos es necesario investigar la seguridad de la combinación.

A partir de la información obtenida en las pruebas de seguridad y teniendo en cuenta las características del producto se llevará a cabo una evaluación de riesgo para el usuario, incluyendo el tipo y grado de exposición humana al medicamento. Con este análisis se formularán las correspondientes advertencias para el usuario.

La evaluación del riesgo medioambiental permitirá valorar los posibles efectos nocivos derivados del uso del medicamento. Esta evaluación normalmente se realiza en dos fases. En la primera fase se valora la posible exposición del medio ambiente al medicamento y el riesgo asociado a esta exposición, teniendo en cuenta las especies animales de destino, la utilización propuesta, el modo de administración, el grado probable de incorporación del producto al ecosistema, la posibilidad de que el medicamento o sus principios activos pasen de los animales tratados al medio ambiente, la persistencia en las excretas y la eliminación de medicamentos no utilizados u otros residuos. En el caso de vacunas vivas posiblemente zoonóticas, también se debe evaluar el riesgo para las personas. Cuando las conclusiones de la primera fase apunten a una posible exposición medioambiental al medicamento, se pasará a la segunda fase y se investigará en profundidad los riesgos asociados. Si es necesario se realizarán estudios sobre las repercusiones del medicamento en el suelo, las aguas, el aire, los sistemas acuáticos u otras especies.

Eficacia de los medicamentos inmunológicos

Al igual que en el apartado la seguridad, se deben llevar a cabo *pruebas controladas de laboratorio* en la especie de destino para demostrar la eficacia de la vacuna.

En el diseño de las pruebas de eficacia es importante tener en cuenta el perfil del producto y las recomendaciones que se deseen proponer en el prospecto ya que todas las indicaciones que se realicen en relación con las propiedades, efectos y utilización del medicamento, como por ejemplo: protección frente a la infección, protección frente a la sintomatología clínica, reducción de la excreción etc., deberán estar

plenamente justificadas por los resultados que se obtengan. Si existe una monografía específica de la Farmacopea Europea, se tendrán en cuenta los requerimientos que en ella se establezcan.

La valoración de la respuesta inmunitaria inducida tras la vacunación no es suficiente para establecer la eficacia de una vacuna. Es necesario valorar la protección mediante la realización de pruebas de desafío infeccioso o infección experimental. Esto implica la necesidad de disponer de instalaciones que, además de cumplir con las buenas prácticas de laboratorio, dispongan de las medidas de contención adecuadas para el germen en cuestión. La infección experimental se debe realizar en condiciones que imiten en la medida de lo posible las condiciones naturales de infección. En la selección de la cepa que se utilice para la infección se tendrá en cuenta su patogenicidad, su virulencia y la información epidemiológica de que se disponga. La dosis que se emplee durante la infección se ajustará de forma tal que sea suficiente para desarrollar en el grupo control no vacunado la enfermedad. Si la dosis es demasiado alta se puede producir una patología que no sea la de la infección natural y subestimar la protección conferida por la vacuna.

La eficacia se demostrará para cada categoría de las distintas especies de destino cuya vacunación se recomiende, utilizando cada una de las vías de administración recomendadas y siguiendo la posología propuesta.

Al contrario que en las pruebas de seguridad, las pruebas de eficacia se deben llevar a cabo con lotes producidos de acuerdo con el procedimiento establecido en el dossier de calidad, obtenidos a partir del pase más alto. En el caso de vacunas vivas la dosis debe contener el título mínimo y en el de vacunas inactivadas la concentración mínima de antígeno.

Las pruebas de protección frente a la infección, se deberán completar con estudios para determinar el establecimiento de la inmunidad y la duración de la misma. Esta última, a menos que se demuestre una correlación entre la respuesta inmunitaria estimulada y la protección frente a la infección, también con pruebas de desafío. De la misma forma se debe evaluar como puede afectar a la eficacia la presencia de anticuerpos maternos.

En el caso de vacunas polivalentes se demostrará la eficacia para cada uno de los componentes y si se quiere recomendar la administración del medicamento en asociación con otro, se demostrará su compatibilidad y la eficacia de la asociación.

Ensayos clínicos

Los resultados de *las pruebas de laboratorio* se completarán con *ensayos clínicos*. Estas pruebas permiten en condiciones de campo y a gran escala verificar los resultados obtenidos en las pruebas de laboratorio. Además permiten investigar aspectos de seguridad y eficacia que no pueden ser valorados en condiciones de laboratorio como por ejemplo: enfermedades donde no exista un modelo de infección experimental, enfermedades causadas por más de un agente, enfermedades donde factores ambientales juegan un papel importante en su etiología o casos donde existen instalaciones especiales de alojamiento de los animales.

Existe una directriz de la Unión Europea que describe los estándares de buenas prácticas clínicas que se deben aplicar para la realización de pruebas de campo con vacunas veterinarias⁴⁶. Antes de realizar una prueba de campo, se solicitará a la Agencia del Medicamento del país donde se va a llevar a cabo, la autorización de producto en fase clínica y la autorización del protocolo del ensayo clínico. Los propietarios de las explotaciones deben ser informados de la naturaleza experimental de la vacuna y del protocolo que se seguirá, y firmar un contrato de consentimiento con el patrocinador del estudio.

En el caso de pruebas de eficacia, el éxito va a depender en gran medida de la selección que se realice de las explotaciones. Es importante antes de iniciar la prueba conocer de forma precisa el estado sanitario de las mismas. Lo ideal es que en la prueba los animales vacunados se infecten de forma natural, sin embargo una infección natural no se puede predecir ni estandarizar. Puede que en el curso de la prueba no aparezca, sea débil o aparezca con una incidencia baja. Si se trata de vacunas polivalentes la infección natural frente a todos los patógenos es improbable.

En el protocolo del estudio se definirán los parámetros que se evaluarán y que estarán justificados en relación a las indicaciones y recomendaciones que se pretendan proponer. Si es factible, se deben utilizar métodos que diferencien animales naturalmente infectados de animales vacunados.

En las pruebas se debe comparar el grupo de animales vacunados con un grupo equivalente de animales no vacunados. Cuando se

46. Good Clinical Practice for the conduct of clinical trials on veterinary medicinal products in the European Union. Scientific guidelines for medicinal product for veterinary use. Eudralex, Volumen 7 <http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol-7/a/7ae1a.pdf>

proponga la vacunación de toda la explotación, se puede utilizar como grupo control animales vacunados con un producto autorizado cuyas indicaciones sean equivalentes. Lo apropiado es que sea un ensayo doble ciego con un control al que se le administre un placebo.

En lo que se refiere a la infección natural, se demostrará que los animales vacunados y el grupo control han sido expuestos al patógeno. El diagnóstico clínico estará apoyado por pruebas de laboratorio. El agente se detectará e identificará. En el caso de vacunas vivas se debe diferenciar el aislado de campo de la cepa vacunal. Para apoyar la infección se pueden utilizar resultados serológicos de un número estadísticamente significativo de animales

También es importante confirmar en condiciones de campo la inocuidad tanto de la administración de una dosis como la de varias dosis. Es recomendable realizar las pruebas de seguridad en distintas zonas geográficas e incluir distintas razas que sean representativas. La prueba debe ser diseñada para detectar reacciones locales o sistémicas a la vacunación y de nuevo se comparará el grupo de animales vacunados con un grupo equivalente de animales no vacunados. Para valorar la reacción local se observará y registrará el tamaño, la duración y naturaleza de cualquier lesión que aparezca en el punto de inoculación. Para valorar la aparición de efectos secundarios de tipo sistémico se realizará un registro de la temperatura corporal en un número representativo de animales, observándose y registrándose en todos los animales la aparición de cualquier reacción adversa (reacciones alérgicas, muerte, anorexia, cambios en el comportamiento, abortos, efectos teratogénicos, etc.). También es interesante controlar parámetros de tipo productivo tales como ganancia de peso, producción de leche, producción de huevos, calidad de la piel y la lana, efecto sobre la fertilidad.... En el caso de vacunas vivas se debe documentar el comportamiento del microorganismo en la población animal.

Medicamentos inmunológicos que contienen organismos modificados genéticamente (OMG)

En el caso de vacunas vivas que contengan OMG, además de cumplir los requisitos que establece la Directiva 2001/82/EC para la autorización de un medicamento veterinario, se debe cumplir la Directiva 2001/18/EC⁴⁷ que regula su utilización confinada y su

47. Directiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de marzo de 2001 sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente y por la que se deroga la Directiva 90/220/CEE del Consejo. Diario Oficial L106/1, 17.4.2001

liberación intencional con fines experimentales o comerciales. Aunque teóricamente estas vacunas son más seguras que aquellas obtenidas por métodos clásicos, la novedad y poca experiencia de que se dispone con este tipo de productos exige por parte de las autoridades de un mayor control. Los principios que inspiran esta normativa son los de prevención y cautela. La protección de la salud humana y del medio ambiente exige que se preste la atención debida al control de los riesgos derivados de su liberación intencional en el medio ambiente. La pieza clave para otorgar la autorización es la elaboración de un informe exhaustivo de evaluación del riesgo, tanto para la salud humana como para los distintos elementos que integran el medio ambiente. Dicha evaluación debe tener en cuenta debidamente los posibles efectos acumulados a largo plazo asociados con la interacción con otros OMG y el medio ambiente. En la evaluación de riesgo las autoridades dan una importancia particular a la presencia en el OMG de genes de resistencia a antibióticos

La Directiva presta especial importancia al respeto de los principios éticos de los Estados miembros y a la opinión del público.

La autorización de utilización de OMG en ensayos clínicos o con fines de investigación y desarrollo se autoriza a nivel nacional. En España, es el Consejo Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente quien concede estas autorizaciones, previo informe de la Comisión Nacional de Bioseguridad. El procedimiento a seguir para la solicitud se describe en el Real Decreto 178/2004⁴⁸.

La autorización de la comercialización de productos que contengan OMG debe realizarse a nivel comunitario y, en el caso de medicamentos veterinarios, es obligación de la EMEA, a través de su Comité para Productos Medicinales Veterinarios (CVMP), el realizar la evaluación del riesgo para la salud humana y el medio ambiente. En el expediente de solicitud se debe incluir:

- Resultados de los estudios de investigación y desarrollo y copia de las autorizaciones otorgadas por las Autoridades Competentes para la utilización del OMG para la realización de pruebas clínicas.
- La información técnica que requiere la Directiva 2001/18/EC en sus anejos III y IV

48. Real Decreto 178/2004 de 30 de enero por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003 de 25 de abril por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente. Boletín Oficial de Estado nº27, 31.01.2004



- El informe de evaluación de los riesgos para la salud humana y el medio ambiente, que deberá incluir la metodología utilizada y las conclusiones sobre su impacto potencial en el medio ambiente, tal y como se refleja en el Anexo II de la Directiva 2001/18/EC.

Durante el proceso de evaluación, las autoridades competentes de todos los Estados Miembros son informadas y consultadas. La opinión del Comité es enviada a la Comisión Europea, que al igual que para otros medicamentos, es quien concede la autorización.

El procedimiento es complejo, en Europa sólo hay 6 vacunas que contienen OMG autorizadas (ver **Tabla 3**).





VII. CONCLUSIÓN

Es incuestionable que la vacunación ha influido profundamente en la mejora de la sanidad animal a nivel mundial y continuará siendo una herramienta fundamental para enfrentarse a futuros desafíos sanitarios.

La vacunación veterinaria es un tema complejo en el que intervienen un gran número de patógenos y especies biológicamente distintas con respuestas inmunitarias diferentes. Es necesario continuar investigando y profundizando en el conocimiento de la inmunología de las especies de las que se ocupa la medicina veterinaria. También es importante seguir investigando en las bases moleculares de las enfermedades, en como interacciona huésped y patógeno y en la biología molecular de estos últimos.

A pesar de que hoy en día se dispone de un rango amplio de vacunas todavía existen muchos problemas por resolver. El uso de las nuevas tecnologías permitirá solucionar algunos de los problemas a los que se enfrenta actualmente la medicina veterinaria y desarrollar vacunas seguras y eficaces frente a enfermedades contra las cuales los sistemas convencionales han fracasado. La aplicación de este conocimiento también permitirá adaptar de forma rápida las vacunas a la situación epidemiológica existente, no hay que olvidar que los microorganismos patógenos están mutando constantemente con el fin de sobrevivir y evadir los mecanismos de defensa del hospedador. Un gran avance dentro de la medicina veterinaria es el poder disponer como herramienta en las campañas sanitarias de vacunas marcadas. Los nuevos sistemas adyuvantes jugarán un papel primordial en el diseño de nuevos sistemas de vacunación y, sobre todo, en el estudio de nuevos modos de administración.

Es necesaria una legislación más flexible, adaptada a las particularidades de los medicamentos veterinarios. Además se deben establecer procedimientos que permitan la rápida introducción de nuevas variantes de cepas vacunales sin tener que iniciar un procedimiento de registro completo.

Uno de los retos futuros son las enfermedades emergentes. En los últimos años y de forma alarmante ha aumentado la frecuencia de aparición de enfermedades emergentes. Según un informe de

la Organización Mundial de la Salud el 75%⁴⁹ de las enfermedades emergentes humanas son zoonosis. Son varias las razones que explican este incremento. Por un lado, el aumento en la demanda global de proteína animal como fuente de alimento, que ha dado lugar a una intensificación de los métodos de producción y a un mayor confinamiento de los animales. También ha habido un cambio en la costumbre de la población, con un incremento en el turismo y los viajes internacionales con el consecuente aumento de riesgo de desplazamiento de personas infectadas y vectores. Otras causas son la globalización del mercado, en particular del mercado de productos animales, el movimiento de los animales y el cambio climático que permite que vectores y patógenos sobrevivan en nuevas áreas. La amenaza de la gripe aviar y los brotes ocurridos en Europa de fiebre aftosa o virus de la lengua azul han puesto de manifiesto la necesidad de que todas las partes implicadas en la planificación de programas sanitarios se adelanten a las amenazas de enfermedad adoptando medidas adecuadas para su control.

Es importante que exista un permanente diálogo entre las autoridades sanitarias, las autoridades reguladoras, la comunidad científica y la industria farmacéutica para el desarrollo de vacunas veterinarias contra enfermedades infecciosas críticas.

Muchas gracias

49. World Health Organization. Report of the WHO/FAO/OIE joint consultation on emerging zoonotic diseases, 3-5 May, pp 65, 2004. http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_CDS_CPE_ZFK_2004.9.pdf







Este discurso se realizó
el día 15 de abril de 2009



