



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

TRABAJO FIN DE GRADO
*“DESARROLLO TOXICOLÓGICO DE
NUEVOS MEDICAMENTOS:
VACUNAS”*

Autor: María del Carmen Jiménez León.

Tutor: José Antonio Guerra Guirao.

Convocatoria: Junio.

Índice

1. RESUMEN 3

2. INTRODUCCIÓN 3

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS 3

4. MATERIAL Y MÉTODOS 4

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 4

5.1 Descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos. 4

5.1.1 Fase de investigación o descubrimiento. 5

5.1.2 Fase preclínica o desarrollo no clínico. 6

5.1.2.1 Estudios de eficacia. 7

5.1.2.2 Estudios de seguridad. 7

5.1.3 Fase clínica o desarrollo clínico. 8

5.1.3.1 Estudios de fase I. 8

5.1.3.2 Estudios de fase II. 8

5.1.3.3 Estudios de fase III. 8

5.1.3.4 Farmacovigilancia o estudios de fase IV 9

5.1.4 Aprobación y registro 9

5.2 Vacunas. 10

5.3 Estudios preclínicos toxicológicos en vacunas: Ensayos toxicológicos para el desarrollo de nuevas vacunas. 11

5.3.1 Ensayos de toxicidad general. 13

5.3.1.1 Ensayos de toxicidad en dosis única. 14

5.3.1.2 Ensayos toxicidad en dosis repetidas. 14

5.3.2 Ensayos de genotoxicidad y mutagenicidad. 16

5.3.3 Ensayos de toxicología de la reproducción. 16

5.3.4 Ensayos de toxicidad embrionaria/fetal y perinatal. 16

5.3.5 Ensayos del potencial carcinógeno. 17

5.3.6 Ensayos de tolerancia local. 17

5.3.7 Ensayos de inmunotoxicidad. 17

6. CONCLUSIONES 19

7. BIBLIOGRAFIA..... 20

1. RESUMEN

Para que un nuevo medicamento llegue al mercado es necesario que pase por distintas fases, entre éstas está la del desarrollo toxicológico que forma parte de los estudios de seguridad de la fase preclínica.

Las vacunas al igual que cualquier otro fármaco debe pasar por todas esas fases, con la complejidad añadida de ser un medicamento biológico, de composición muy variada y que además faltan guías estandarizadas para su desarrollo.

La OMS señala a la inmunización como la intervención más costo-efectivas para la sociedad y también afirma que se está pasando por momentos difíciles para la inmunización por la consolidación de movimientos antivacuna planteándose el reto de combatirlos a través de información verídica.⁽¹⁾

Key Words: Nonclinical evaluation, Safety testing, Toxicological development and Vaccines.

2. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevos medicamentos es un proceso tedioso y prolongado en el tiempo que suele durar entre 10-15 años, cuyos objetivos fundamentales son demostrar y garantizar, a través de distintas fases de investigación, que un posible nuevo fármaco reúne los requisitos necesarios en cuanto a eficacia, seguridad y calidad para su posterior comercialización y administración.⁽²⁾ En pocas palabras que la relación beneficio-riesgo siempre sea positiva.

De hecho, aproximadamente el 98% de las nuevas moléculas y sustancias que son investigadas no llegan al mercado en forma de nuevos medicamentos⁽³⁾ porque el riesgo es mayor que el beneficio o bien porque no resultan más ventajosas respecto a medicamentos ya comercializados.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

De forma general las sociedades científicas se quejan de falta de guías estandarizadas para el desarrollo de nuevos medicamentos y más concretamente falta de conocimientos básicos sobre los requisitos mínimos necesarios para los ensayos de fase preclínica, lo que ocasiona sobre todo a nivel académico, retrasos en el desarrollo de terapias candidatas que llegan a la etapa preclínica, pero que luego cuesta mucho esfuerzo que pasen a la clínica y ya no solo crea retrasos temporales sino que también incrementa los costes.⁽²⁾

Actualmente la toxicología es una especialidad que está en el punto de mira a nivel social debido a la gran cantidad de sustancias comercializadas con influencia en la salud pública y ambiental. Lo que ha obligado a la creación de la denominada "toxicología regulatoria".⁽⁴⁾

Por otro lado, en los últimos años están siendo bastante publicitados movimientos en contra de las vacunas, que entre algunos de sus argumentos ponen en duda la seguridad de las mismas. ⁽⁵⁾

Además, en este caso, haciéndonos eco del auge de los movimientos antivacuna y su escusa relacionada con la toxicidad se evaluará su desarrollo que justifica la puesta en el mercado de las vacunas. Por todo lo anterior se han fijado los objetivos siguientes en este trabajo.

- ✓ Hacer una recopilación de los requisitos básicos para llevar a cabo los ensayos preclínicos de toxicidad y más concretamente los ensayos toxicológicos necesarios para el desarrollo de nuevas vacunas, a partir de las guías de mayor jerarquía a nivel internacional.
- ✓ Se pretende recordar la importancia de la vacunación, los objetivos conseguidos gracias a esta y apoyar, mediante la profundización de sus estudios toxicológicos, la idea de que cuando una vacuna se pone en el mercado es porque se ha garantizado su seguridad. Además de aportar información sobre las mismas con el fin de combatir ideas de movimientos antivacuna.
- ✓ Por último, se pretende añadir valor a los resultados que se obtienen de la investigación científica para promover el desarrollo preclínico.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Revisión bibliográfica, a partir de bases de datos como PubMed, Google Académico y Science Direct. También se ha recurrido a libros y artículos de revistas científicas relacionados con el desarrollo de medicamentos y más concretamente de vacunas. Además de realizar búsquedas en las páginas oficiales de distintos Organismos oficiales como son la OMS, FDA, EMA y AEMPS. Para completar el estudio se han tenido en cuenta guías oficiales y estandarizadas para el desarrollo de medicamentos sobre todo las acordadas en la *International Conference on Harmonisation (ICH)*.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos.

El proceso de desarrollo de nuevos medicamentos está formado por etapas en las que intervienen múltiples disciplinas. Cada fase exige gran estructuración, con un diseño previo pensado y ordenado. Hay que tener en cuenta que las diferentes fases no quedan totalmente aisladas unas de las otras, sino que hay ciertos momentos de solapamiento.

Al final todo el proceso se traduce en un gran esfuerzo no solo económico sino también intelectual que tiene el objetivo de asegurar la máxima calidad, eficacia y seguridad para poder ser administrados en el ser humano. A su vez todo el proceso de desarrollo está apoyado y supervisado por diversos organismos reguladores. Con la globalización de la industria farmacéutica en la *Conference of Harmonisation*⁽⁶⁾ se implantó una estandarización en las directrices técnicas y los requisitos para el registro de productos farmacéuticos que deben cumplir los países que lo firmaron que fueron Japón, Estados Unidos y la Unión Europea. La armonización se logra con el consenso entre científicos, expertos reguladores y la industria de las tres regiones de la ICH. A partir de esto se elaboran guías aceptadas por las autoridades reguladoras de estas tres regiones que son: En Europa la EMA (European Medicines Agency)⁽⁷⁾, en EEUU la FDA (Food and drug Administration)⁽⁸⁾ y en Japón la MHLW (ministry of health, Labour Welfare)⁽⁹⁾.

En España también existe la AEMPS o Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios que es una Agencia estatal que trabaja en cooperación con la EMA.⁽¹⁰⁾ También emite guías específicas para llevar a cabo los estudios preclínicos de seguridad la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). Son guías enfocadas a las sustancias químicas pero que normalmente también son aplicables al desarrollo de medicamentos.⁽¹¹⁾

5.1.1 Fase de investigación o descubrimiento.

Es la fase que tiene una duración menos predecible ya que puede durar de 2 a 20 años. Básicamente consiste en buscar nuevas moléculas con una actividad biológica determinada a partir de un objetivo terapéutico influenciado por múltiples factores.⁽¹²⁾

La búsqueda de nuevas moléculas se hace tanto desde un punto de vista biológico como químico, utilizando modelos "in vitro" e "in vivo". Además, el desarrollo de la informática ha hecho posible hacer cribados "in silico", que consisten en modelos virtuales de receptores sobre los que se prueban productos virtuales. De forma paralela al diseño de nuevas moléculas se indagará sobre su síntesis. Finalmente se obtendrán un gran número de moléculas que tendrán que ser probadas y examinadas para ello se usa la técnica de cribado de alta calidad o High Throughput Screening (HTS). Es una tecnología que permite seleccionar moléculas capaces de reconocer una determinada diana.^{(13) (12)}

De forma general a todas aquellas moléculas capaces de reconocer una diana se las denominará *Hits* o prototipos. Pero su actividad podrá ser débil, ser inestable, tóxica.... Por lo que hay que seguir optimizándolos hasta llegar a productos, con los requisitos suficientes para

pasar a posteriores fases de investigación. A estos productos se les conoce como *leads* o productos líderes y son los que pasarán a la fase preclínica. Este modo de trabajo circular se conoce como *hit to lead* y se puede visualizar el diagrama de flujo en la figura 1.

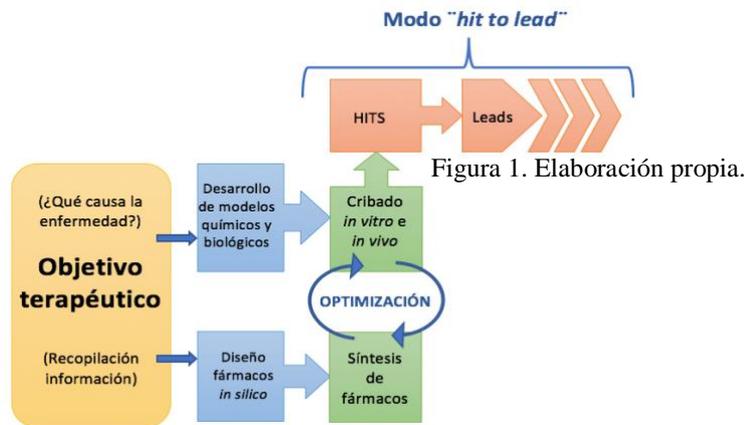


Figura 1. Elaboración propia.

Una vez terminada esta fase, se pasará a la fase preclínica. En este caso el paso de una fase a otra lo decide el propio grupo investigador, una vez conseguidos los objetivos fijados por ellos mismos previamente. ⁽²⁾

5.1.2 Fase preclínica o desarrollo no clínico.

Suele durar unos 2 años. Consiste en un conjunto de ensayos realizados principalmente en modelos *in vitro* e *in vivo*. Los dos objetivos principales son la caracterización del perfil de seguridad y el perfil de eficacia de un nuevo principio activo.

Tanto los estudios de toxicidad como los de eficacia son imprescindibles, pero es verdad que, en las etapas más tempranas del desarrollo, se da prioridad y se es más exigente, sobre todo por parte de las agencias regulatorias, a todo lo que concierne a los estudios de seguridad. La explicación de esto son varias, por un lado, es necesario que desde etapas tempranas de investigación quede demostrada la seguridad del paciente y por otro, posibles efectos adversos detectados en estas etapas pueden influenciar la continuación de los ensayos clínicos. Básicamente, se basa en conocer cuanto antes los riesgos, para así evitar y minimizar posibles daños en el ser humano y que quede justificada la posterior exposición al nuevo fármaco en pacientes. Esto entre otras cosas explica porque existen menos directrices y guías establecidas por las autoridades, en cuanto lo que refiere a los estudios de eficacia. Aunque no hay que olvidar que a los promotores de la nueva molécula no les interesa retrasar los estudios de este tipo puesto que a ellos les conviene conocer la eficacia antes de llegar a fases clínicas del desarrollo donde los costes se incrementan considerablemente. ⁽²⁾

5.1.2.1 Estudios de eficacia.

Como ya se ha descrito en líneas anteriores la regulación de este tipo de estudios es mucho menor en comparación con los de seguridad por lo que apenas existen guías oficiales acerca de cómo han de llevarse a cabo. Se estudia la farmacodinamia del compuesto cuyos objetivos son estudiar el mecanismo de acción, establecer curvas dosis-respuesta, la dosis mínima eficaz y establecer la pauta y vía de administración más adecuada.

La farmacodinamia es fundamental para el desarrollo de los estudios toxicológicos y su extrapolación a humanos.⁽²⁾

5.1.2.2 Estudios de seguridad.

Estudios de seguridad, como ya se ha mencionado están regulados internacionalmente de forma muy estricta, existiendo numerosas guías de cómo han de llevarse a cabo. Estos estudios incluyen:

- Ensayos de farmacocinética, toxicocinética y metabolismo (ADME-tox). Los primeros ensayos sobre farmacocinética, deberían ser evaluados antes de iniciar los ensayos clínicos en humanos y los datos referentes a la serie ADME deberían estar disponibles de manera fiable antes de exponer a un gran número de pacientes al nuevo fármaco (generalmente antes de los Ensayos clínicos de fase III).⁽¹⁴⁾
- Ensayos de farmacología de seguridad. Son estudios que hacen una valoración general de los efectos del nuevo fármaco sobre los sistemas y órganos vitales como son el sistema nervioso central, el sistema circulatorio y el aparato respiratorio. Deben de llevarse a cabo antes de exponerse el fármaco a humanos. En algunos casos y estando justificado se podrán hacer ensayos concretos de este tipo ya en la fase clínica.⁽¹⁵⁾
- Ensayos toxicológicos. Son una batería de ensayos llevados a cabo en modelos "in vitro", "in vivo" e incluso actualmente también se tienen en cuenta modelos "in silico" que permiten hacer una caracterización toxicológica del nuevo compuesto.

Cada fármaco particular necesita su propio desarrollo preclínico en función del tipo de compuesto, mecanismo de acción e indicación clínica. Hay que recordar que el desarrollo de un medicamento no son fases aisladas entre sí, de ahí que algunos ensayos de fase preclínica no son exigidos hasta la fase clínica. Por eso se engloba bajo el concepto de "regulatoria preclínica" a todas aquellas pruebas toxicológicas realizadas en laboratorio "in vitro" o "in vivo" pero no en humanos, ya deban realizarse durante la etapa o antes.⁽²⁾ En este caso el paso de la preclínica a la etapa clínica está sujeta a la obtención de autorizaciones por parte de las agencias regulatorias pertinentes a partir de un dossier que resumen todo lo investigado hasta el momento.

5.1.3 Fase clínica o desarrollo clínico.

Se pasa a investigar por primera vez el nuevo fármaco en humanos. Todas las etapas tienen protocolos concretos y los voluntarios a estudio deben informados de todo lo que concierne al estudio del que van a formar parte. ⁽¹⁶⁾

5.1.3.1 Estudios de fase I.

Se administra por primera vez el fármaco en humanos. El objetivo principal, es evaluar la seguridad mediante la detección de signos de toxicidad y tolerabilidad, estableciendo rangos de dosis aceptables. Suele durar de 6 meses a 1 año. Se ensaya en un grupo reducido de personas sanas (menos de 100). ⁽¹⁷⁾

5.1.3.2 Estudios de fase II.

Se administra por primera vez el fármaco en personas enfermas. El objetivo central es verificar la eficacia del fármaco. Suele durar de 2 a 3 años. Se escoge un grupo de unas 100-200 personas que serán divididos a su vez en dos grupos. Un grupo que recibirá el fármaco a estudiar y otro grupo recibirá otro fármaco ya comercializado para esa patología o bien un placebo. Los datos de ambos grupos serán comparados para sacar conclusiones.

5.1.3.3 Estudios de fase III.

En este caso el fármaco se administra de cientos a miles de pacientes con características muy diversas pero muy concretas. Los objetivos son concretar los perfiles de eficacia y seguridad del fármaco además de detectar manifestaciones de toxicidad que no se hubieran detectado antes. Suelen durar de 3 a 5 años.

Una vez que se tienen analizados y recopilados todos los datos respecto a todo el progreso, tendrán que ser presentados en la administración pertinente, que emitirá los resultados y opiniones y en función de ello será aprobada o no la comercialización del nuevo medicamento.

Básicamente lo que se pretende con esto es evaluar y confirmar que científicamente queda demostrada la seguridad, eficacia y calidad del medicamento antes de su autorización y puesta en el mercado que se traduce en que los beneficios que se pueden conseguir son mayores a los posibles riesgos, ya que ningún medicamento se puede definir como 100% seguro. En el caso de ser aprobada la comercialización del medicamento, pasaría a ser considerado como medicamento innovador, se comercializaría y pasaría de forma indefinida a farmacovigilancia. La fase de revisión y aprobación del nuevo medicamento suele durar entre 2 o 3 años.

5.1.3.4 Farmacovigilancia o estudios de fase IV

Es una etapa que se puede definir como infinita, ya que una vez que un fármaco ha conseguido ser autorizado, estará continuamente en seguimiento y estudio. El objetivo de esta fase es que mientras un fármaco esté en el mercado el balance beneficio-riesgo siga siendo positivo al igual que cuando se autorizó. Concretamente lo que se hace es obtener de manera continuada información de los medicamentos comercializados cuantificando y evaluando sus riesgos y cuando proceda gestionarlos y emitir decisiones.

La justificación de esta etapa está basada en que trata de contrarrestar las propias limitaciones que tiene un ensayo clínico. El ensayo clínico es con el estudio que más inferencia causal. El problema es que para conseguir esto, es necesario que se diseñen con criterios de inclusión y exclusión muy restrictivos que permiten sacar conclusiones muy fiables, pero también supone limitar la diversidad de población a la que posteriormente en el mercado el fármaco sí que va a estar expuesto. Además, el tiempo de duración de los estudios clínicos son limitados en el tiempo y hay ciertas reacciones adversas que son acumulativas o bien no dan la cara hasta un tiempo muy prolongado de administración.

Por tanto, gracias a la farmacovigilancia se van a notificar y detectar efectos adversos de baja frecuencia o a largo plazo, además en algunas ocasiones esta fase ha servido para descubrir efectos terapéuticos no detectados anteriormente.⁽¹⁸⁾

5.1.4 Aprobación y registro

La aprobación y registro de un medicamento garantiza a los ciudadanos la existencia de un sistema de control independiente que evalúa todo el conocimiento existente sobre el fármaco en estudio.

En EEUU es la FDA (*Food and Drug Administration*) quién se encarga de todo lo referente a las decisiones sobre la aprobación de medicamentos, pero en Europa existen diversos organismos como es la EMA (*European Medicines Agency*) y Agencias Nacionales Europeas.

En Europa existen diferentes procedimientos para solicitar la comercialización de un medicamento. Son registro por procedimiento centralizado, registro por reconocimiento mutuo y registro por proceso descentralizado. Cada método tiene unas características y dependiendo del tipo de medicamento puede resultar una más ventajosa que la otra. Hay ciertos medicamentos que por sus características su registro se tiene que realizar por procedimiento centralizado. Estos fármacos están recogidos en el reglamento nº 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo.⁽¹⁹⁾

5.2 Vacunas.

Según la OMS la definición de vacuna era cualquier preparación destinada a generar inmunidad contra una enfermedad estimulando la producción de anticuerpos. Pero con su desarrollo han pasado a definirse como proteínas, polisacáridos o ácidos nucleicos de los microorganismos patógenos que son suministrados al sistema inmunitario como entidades simples, como partes de partículas complejas o por agentes vivos atenuados o vectores con el objeto de inducir respuestas inmunitarias específicas que inactiven, destruyan o supriman al agente infeccioso patógeno. Esta definición se queda corta porque existen nuevas líneas de investigación de vacunas para enfermedades no infecciosas. ⁽²⁰⁾

La vacunación junto con el saneamiento de las aguas han sido las medidas sanitarias más eficaces en relación al beneficio obtenido. Además, la vacuna es el único medicamento cuya efectividad es mayor a su eficiencia, gracias al efecto de grupo, lo que ha contribuido a que la vacunación haya sido uno de los triunfos más grandes de la salud pública. Pero parece que en el siglo XXI esta medida preventiva se está ahogando en su propio éxito, ya que está habiendo un incremento de enfermedades prevenibles. Y parece que esto se puede ver fundamentado por el incremento del número de personas que las rechazan. ⁽²¹⁾

Históricamente las vacunas han tenido detractores y en los últimos años han tomado auge movimientos antivacuna que ponen en duda la necesidad de la inmunización. Son movimientos pequeños pero que cada vez son más publicitados gracias a internet. ⁽⁵⁾ Entre los argumentos que utilizan estos grupos están los referentes a la falta de seguridad, que todo es un negocio de las farmacéuticas y que las enfermedades pueden ser prevenibles mediante estilos de vida.

El porcentaje de población que rechaza la vacunación es pequeño. En Europa se estima que es de un 5% y en EEUU de un 6%-8% y entre las razones para su rechazo destacan los efectos adversos y falta de información. ⁽²²⁾

Para combatir lo anterior se llegó a la conclusión de que la medida más efectiva era incrementar la información que se daba a la población no solo mediante programas de información a la población, por parte de los profesionales sanitarios, sino también dar más cobertura aquellas páginas web que aporten información científicamente avalada sobre la calidad y seguridad de las vacunas frente aquellas que justifican lo contrario con argumentos que científicamente quedaron invalidados. ⁽²³⁾

5.3 Estudios preclínicos toxicológicos en vacunas: Ensayos toxicológicos para el desarrollo de nuevas vacunas.

A la hora de llevar a cabo el desarrollo de un nuevo medicamento hay que tener muy en cuenta que cada fármaco en función de sus características necesita un desarrollo preclínico concreto, además el valor predictivo de los ensayos toxicológicos para ser extrapolables al ser humano depende directamente de cómo se diseñen y se analicen los datos. Lo primero que hay que tener en cuenta es que las sustancias activas se pueden clasificar de forma simplificada en:

- Moléculas pequeñas o *small molecules*: son sustancias de origen sintético o natural. Con un peso molecular inferior a 1000 Da no poliméricas. El mecanismo de acción suele ser conocido mediante en los principios de la toxicología clásica. Este tipo de moléculas son las que forman parte de medicamentos clásicos como los analgésicos. ⁽²⁾
- Moléculas grandes o sustancias de origen biológico: son todas aquellas que se producen o extraen de una fuente biológica. Por tanto, van a ser moléculas de gran variabilidad en cuanto a su origen y producción por lo que son considerados como medicamentos especiales que necesitan condiciones específicas para demostrar su calidad, seguridad y eficacia. La ventaja que presentan es que a priori la toxicidad de los mismos suele ser pequeña debido al modo de obtención. Lo que no excluye que se puedan dar reacciones adversas ya que conllevan un riesgo inherente de tipo inmunológico. ⁽²⁾

En este grupo se incluyen medicamentos inmunológicos y medicamentos hemoderivados. Con el desarrollo de nuevas terapias hay autores que hablan de dos nuevas categorías que son los biotecnológicos y terapias avanzadas pero de forma global se podrían incluir como casos especiales dentro de los biológicos. ⁽²⁴⁾

Las vacunas se incluyen dentro de los medicamentos biológicos pero debido a la diversidad de productos por las que pueden estar formadas también podrían ser consideradas como medicamentos biotecnológicos. Por lo que para su desarrollo se necesita tener en cuenta los protocolos referentes a ambos tipos de productos sin olvidar que son productos complejos lo que obliga a evaluar uno por uno sus propias especificaciones.

En este estudio nos centraremos en los ensayos de toxicidad de las vacunas. Hay que tener en cuenta es que habrá ensayos de estricto cumplimiento para pasar a las siguientes fases de estudio, otros serán optativos y otros requeridos en las etapas ya clínicas. Por eso, a los investigadores y promotoras de los nuevos medicamentos les interesa saber perfectamente cuales tienen que llevar a cabo en cada momento para ahorrar dinero y tiempo.

Antes de desarrollar el tipo de ensayos a llevar a cabo se tendrán en cuenta ciertas peculiaridades que tienen las vacunas por ser un producto biológico. Lo primero a considerar es, que en las preparaciones biológicas pueden existir productos derivados del material del que provienen que pueden dar lugar a reacciones de tipo inmunológico además de distintos tipos de infecciones. Por otro lado, también este tipo de preparaciones podrían contener impurezas y contaminantes que es preferible eliminar previo a los ensayos preclínicos por técnicas de purificación en vez de analizar de forma concreta el efecto de ese contaminante o impureza. ⁽²⁴⁾ Además de lo anterior es necesario hacer las siguientes consideraciones:

1. Selección de especies animales relevantes, entendiendo como especie relevante aquella en el que el material de prueba es farmacológicamente activo, ya que si no se lleva a cabo de esta forma los resultados no aportarán datos predictivos sobre la actividad en humanos. Idealmente serían especies sensibles al microorganismo o toxina patógena y que fueran capaces de desarrollar una respuesta inmune frente al antígeno de la vacuna. En aquellas situaciones en los que no se encuentren animales relevantes se podrá recurrir al uso de moléculas homólogas o modelos transgénicos. ⁽²⁴⁾
2. Número y sexo de los animales de experimentación, el número de animales utilizados por dosis está directamente relacionado con la capacidad de detectar la toxicidad, por lo que tamaños de muestra muy pequeños pueden provocar detecciones incorrectas de toxicidad, aunque esto se puede contrarrestar aumentando la frecuencia y la duración de la vigilancia de los animales. Generalmente en los ensayos de toxicidad de *small molecules* son necesarios dos especies animales (un roedor y un no roedor), pero en este tipo de productos en algunos casos será suficiente utilizar una sola especie; Por ejemplo cuando solo se encuentra una especie relevante, cuando se conoce bien la actividad biológica del fármaco o bien cuando se empezaron a realizar los estudios con dos especies viéndose que no había diferencias significativas entre ambas y el resto de ensayos siguientes ya se realizaron solo en una. Se debe considerar al menos una especie roedora a menos que exista fundamento científico para usar no roedores. Los estudios en dos especies no roedoras no se consideran apropiadas. ⁽²⁵⁾ En casos en los que el mecanismo de protección que adquiere el individuo gracias a la vacuna no es bien conocido se puede requerir más de dos animales. ⁽²⁶⁾ Generalmente se suelen utilizar ambos sexos de animales, aunque en algunos casos especiales se puede omitir algún género siempre que esté justificado. ⁽²⁷⁾ Se recomienda uso de animales exogámicos. ⁽²⁵⁾

3. Vía de administración y dosis. Deben ser lo más parecidas posibles a la clínica, aunque en algunos casos y de forma justificada pueden hacerse modificaciones para que se aproxime más lo que pasa en el modelo animal y luego en humanos. Por ejemplo, modelos animales con tasas de aclaramiento más altas necesitan frecuencias de administración más cortas que en humanos.⁽²⁴⁾ La dosis a utilizar debería ser aquella que maximizase la respuesta inmune inducida.

Para la caracterización completa del perfil toxicológico de una vacuna se deben tener en cuenta los ensayos que a continuación serán descritos en función de las guías de mayor importancia teniendo en cuenta tanto guías concretas para vacunas y adyuvantes como guías referentes a los medicamentos biotecnológicos.^{(24),(25),(28)}

Los ensayos descritos hacen referencia a las vacunas que la *Guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines* de la EMEA (The European Agency for the Evaluation of medicinal Product) considera como nuevas, que son todas aquellas formadas por antígenos no descritos en monografías de la Farmacopea Europea, antígenos conocidos, pero con un nuevo conjugado o cualquier combinación de antígenos conocidos o desconocidos. En este caso debido a la complejidad de las vacunas de DNA que aún están en investigación no se tendrán en cuenta. Todos los ensayos se deben hacer con la formulación más parecida a la que se utilizará en los ensayos clínicos incluyendo todos los componentes que tendrá la vacuna.⁽²⁸⁾

5.3.1 Ensayos de toxicidad general.

Su objetivo es demostrar cualquier efecto tóxico que pudiera afectar al ser vivo. Para ello se administrarán diversas dosis durante tiempos variables y se valorarán datos cuánticos (por ejemplo datos de mortalidad e incidencia de signos fármaco-tóxicos) y datos graduados (por ejemplo peso corporal y consumo de alimento).⁽²⁹⁾ También se harán análisis hematológicos e histopatológicos. Los exámenes histopatológicos de tejidos se deberán hacer, en órganos vitales y en el caso concreto de las vacunas sobre órganos inmunes (bazo, timo, médula ósea...), así como los órganos que pueden verse afectados por la vía de administración elegida. Con el conjunto de resultados obtenidos en este tipo de ensayos se obtendrán curvas de dosis-respuesta a partir de los cuales se podrá establecer el MTD (máxima dosis tolerada) o el NOEL (Ningún efecto observable).

5.3.1.1 Ensayos de toxicidad en dosis única.

Estos ensayos evalúan la toxicidad aguda, es decir aquella toxicidad que se produce con la administración de una dosis única relativamente alta o bien varias dosis, pero en un intervalo no mayor a 24 horas. ⁽³⁰⁾

Este tipo de estudios aportan información general sobre la toxicidad intrínseca del producto tanto a nivel local como sistémico. Además, pueden ser el punto de partida para seleccionar dosis para los estudios posteriores. También dan información del riesgo que conlleva una exposición aguda, dato valioso para medicamentos cuyo destino final son pacientes con riesgo de sobredosificación como son pacientes depresivos, con demencia o con dolor.⁽³¹⁾

Históricamente para hacer este tipo de ensayos, se necesitaba dos especies de mamíferos (roedor y no roedor) a los cuales se les administraba una dosis única de sustancia y el fin último era la muerte del animal para establecer la DL50 o CL50. La administración de la sustancia se debía hacer por dos vías, la parenteral y la que fuera a ser clínica. La observación del animal se realizaba hasta un máximo de 14 días tras los cuales si el animal no había muerto se le sacrificaba. Todos los animales eran autopsiados y sometidos exámenes para analizar los daños. ^{(30), (31)} Pero desde 2002 este procedimiento fue eliminado en su totalidad sustituido por otras técnicas que siguiesen el principio de las 3 R (reducción, refinamiento y reemplazo). Actualmente la OECD (Organización para la cooperación y el desarrollo económico) acepta métodos alternativos que siguen el principio anterior en el que el uso de animales es más moderado, el fin último deja de ser la muerte del animal sino la aparición de la llamada toxicidad aparente, aunque algunas muertes siguen siendo inevitables. Estos métodos son método de la dosis fija, método de la clase tóxica aguda y el método arriba y abajo. ⁽²⁷⁾

Hoy en día y para el caso concreto de las vacunas estos estudios deben hacerse en al menos una especie animal con dosis que proporcionen un margen de seguridad adecuado en relación con la dosis humana posterior y pueden tener una duración de hasta 1 mes, aunque no será necesario hacer un ensayo exclusivo de toxicidad aguda, sino que se puede acoplar con los ensayos de dosis repetidas. ^(28,32) Además normalmente en toxicidad básica no va a ser necesario determinar la dosis letal.⁽³³⁾

5.3.1.2 Ensayos toxicidad en dosis repetidas.

Este tipo de estudios evalúan la toxicidad a más largo plazo, haciendo uso de modelos animales. Los tipos de toxicidad posibles a evaluar son:

- Toxicidad subaguda, se define como aquellos efectos adversos que se manifiestan tras la administración repetida de una sustancia durante un periodo relativamente corto (entre 14-30 días).
- Toxicidad subcrónica, aquellos efectos tóxicos que se manifiestan como consecuencia de la exposición a la sustancia en un periodo de tiempo mayor al 10% de la vida del animal.
- Toxicidad crónica, es aquella toxicidad que se produce por la exposición durante largos periodos de tiempo >90 días, generalmente a dosis pequeñas de sustancia.

En el caso de las vacunas estos estudios se solicitan tanto para vacunas que requieren dosis múltiples, como para una única administración. La ruta de administración deberá reflejar el uso clínico previsto y su duración está marcada por la duración de los ensayos clínicos posteriores que a su vez está condicionada por la indicación clínica del producto en investigación. Generalmente estos ensayos de dosis repetidas deberán ser igual o superior a la duración de los ensayos clínicos en humanos. El diseño de estos estudios deberá tener en cuenta las posibles diferencias entre animales y humanos respecto al tiempo de respuesta. ⁽²⁸⁾

Este tipo de estudios en productos de tipo *small molecules* se realizan utilizando dos mamíferos un roedor y un no roedor, en el caso de las vacunas dependerá del modelo animal relevante y normalmente se necesita solo de una especie. A continuación, se adjunta la tabla 1, que resumen la duración recomendada de los estudios toxicológicos en función de la duración del ensayo clínico y la tabla 2, que esquematiza la duración que deberían tener los ensayos toxicológicos para avalar posteriormente la comercialización del mismo. Las tablas son orientativas ya que siempre hay que evaluar las consideraciones de cada producto caso por caso.

Tabla 1: Duración recomendada estudios dosis repetidas dependiendo de la duración del ensayo clínico.

Duración prevista de los ensayos clínicos en función de la iniciación.	Duración mínima recomendada de los estudios para respaldar los ensayos clínicos.	
	Roedor	No roedor
Hasta 2 semanas.	2 semanas.	2 semanas.
Entre 2 semanas y 6 meses.	Equivalente al ensayo clínico.	Equivalente al ensayo clínico.
Más de 6 meses	6 meses.	9 meses.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2: Duración necesaria estudios dosis repetidas para la autorización de la comercialización.

Duración indicada del tratamiento.	Roedor	No roedor
Hasta 2 semanas.	1 mes.	1 mes
Más de 2 semanas y hasta 1 mes.	3 meses.	3 meses
Más de 1 mes hasta 3 meses.	6 meses	6 meses
Más de 3 meses.	6 meses	9 meses.

Fuente: Elaboración propia.

Ciertos fármacos con indicación de 2-3 meses pero que experiencia clínica ha demostrado que se tiende a utilizar durante tiempos más prolongados de los indicados (por ejemplo, analgésicos, ansiolíticos o antihistamínicos) se deben hacer ensayos de más de 3 meses. ⁽³¹⁾

Es normal añadir un grupo de animales de tratamiento extra en el cual se evaluará la reversibilidad, persistencia o exacerbación de los procesos toxicológicos evaluándolos más días que al resto de grupos tras el cese de la administración del fármaco. En el caso de los datos de hematología y química sérica se deben considerar 1-3 días después de la administración de la primera y última dosis y al final del periodo de recuperación.

5.3.2 Ensayos de genotoxicidad y mutagenicidad.

Estos ensayos tienen el objetivo de evaluar la capacidad de provocar cambios (mutaciones) en el genotipo de las células. Se estudia mediante diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo*, de complejidad variable en función del mecanismo biológico que se quiera analizar.

En el caso de los productos biotecnológicos y más concretamente en el caso de las vacunas normalmente este tipo de estudios no son necesarios ya que no se espera que este tipo de sustancias interactúen con el ADN u otro material cromosómico. Tampoco se consideran necesarios para evaluar el potencial genotóxico de los posibles contaminantes y en el caso de que se realice hay que justificarlo científicamente. Para aquellos productos que por sus características se piensen que pueden conllevar algún riesgo estos estudios se realizarán en sistemas relevantes. ⁽²⁴⁾

5.3.3 Ensayos de toxicología de la reproducción.

Son estudios que evalúan los posibles efectos de las sustancias sobre la función reproductiva y fertilidad. La necesidad de estos estudios viene determinada por el tipo de producto, indicación clínica y la población sobre la que tiene previsto incidir la nueva sustancia. En el caso concreto de las vacunas generalmente no son necesarios estos estudios, la información obtenida gracias a la histopatología de los ensayos de toxicología general son suficientes sobre la integridad de este tipo de órganos. ⁽²⁴⁾

5.3.4 Ensayos de toxicidad embrionaria/fetal y perinatal.

Este tipo de toxicidad generalmente en las vacunas no es necesario, pues la mayoría se durante la infancia, pero sí pueden ser requeridos estos ensayos para vacunas en mujeres en edad fértil o durante el embarazo. El objetivo de estos estudios sería demostrar que con la

administración de la vacuna no aumenta el riesgo de abortos involuntarios, la aparición de malformaciones o poen el caso de vacunas contra virus que acabaran provocando una infección fetal. También se suele aportar información respecto a este tipo de toxicidad con datos epidemiológicos y clínicos de los agentes infecciosos y vacunas en el embarazo.

Además, es importante evaluar la transferencia de anticuerpos maternos midiendo los anticuerpos inducidos por la vacuna en la sangre del cordón umbilical o fetal para verificar la exposición del embrión o el feto a los anticuerpos maternos. La vía de administración se debe limitar la ruta clínica de administración. ⁽²⁶⁾

También se recomienda incorporar un período de seguimiento postnatal de las crías desde el nacimiento hasta el destete en el diseño del estudio para evaluar la normalidad del crecimiento, el aumento de peso corporal, la actividad de lactancia y la viabilidad.

5.3.5 Ensayos del potencial carcinógeno.

Estos ensayos tratan de poner de manifiesto la capacidad de una sustancia para inducir procesos neoplásicos. Estos estudios para los productos biotecnológicos no se pueden hacer mediante las técnicas convencionales y su evaluación debe hacerse en función de la duración de la dosificación, el tipo de pacientes y la actividad biológica el producto, considerando diversos enfoques para evaluar el riesgo. En el caso de las vacunas no es necesario este tipo de estudios en términos generales. ⁽²⁸⁾

5.3.6 Ensayos de tolerancia local.

Este tipo de toxicidad puede ser evaluada en un ensayo concreto, pero lo normal es que se compruebe acoplado este ensayo a los de toxicidad general. Se evalúa la toxicidad en todos aquellos sitios con los que entra en contacto el preparado vacunal. En el caso de las vacunas normalmente por su modo de administración hay que comprobar la tolerancia a nivel intramuscular, subcutáneo o intramuscular. Hay algunos casos, que en este tipo de estudios se encuentran anomalías y se necesita una mayor profundización en la que se explique el efecto tóxico. ⁽²⁶⁾ Lo ideal sería llevar a cabo estos ensayos con la formulación final que luego se va a utilizar en la práctica clínica, pero no siempre es posible por lo que tendría que ser una formulación lo más parecida posible.

5.3.7 Ensayos de inmunotoxicidad.

Todo lo que hace referencia a la evaluación de la inmunogenicidad de la vacuna se estudia mediante los estudios farmacodinámicos, pero en ciertos casos en los que hay resultados

que aportan indicios sobre una posible toxicidad mediada por un mecanismo inmunológico deberá ser evaluado de forma más exhaustiva mediante este tipo de ensayos. El mayor problema toxicológico referente a la inmunidad que puede surgir es que la vacuna induzca una respuesta inmune contra los determinantes antigénicos propios del hospedador. Esto se puede dar en casos en los que los determinantes antigénicos de la vacuna tuviesen similitud con los del hospedador provocando esas reacciones autoinmunes. Este aspecto sobretodo complica el desarrollo de vacunas relacionadas con patologías autoinmunes en el que la selección del modelo animal es fundamental y debe hacerse con gran evidencia científica.

Deberán también valorarse todos aquellos compuestos que pudieran provocar reacciones de hipersensibilidad como podría ser el propio antígeno, los adyuvantes o conservantes.

Otra de las consideraciones en el caso de vacunas sería realizar estudios de pirógenicidad, de todos sus componentes en conjunto. ⁽²⁸⁾

Algunas vacunas en su composición llevan adyuvantes, es importante que estos cumplan con los requisitos exigidos por la farmacopea. Habrá que estudiar la toxicidad preclínica del adyuvante de forma individual en el caso de que sea un adyuvante nuevo y siempre que una vacuna lleve adyuvante los ensayos toxicológicos deben hacerse con la mezcla antígeno adyuvante. Lo mismo pasa con los conservantes, en el caso de los conservantes nuevos debe evaluarse por un lado su toxicidad de forma aislada y siempre comprobar la toxicidad conjunta obtenida de la mezcla antígeno-conservante. ^{(26), (25)}

Hay que tener en cuenta que para llevar a cabo todos los estudios de seguridad que dan soporte a la aprobación de ensayos clínicos, incluyendo estudios de toxicidad general, genotoxicidad, toxicocinética y farmacología de seguridad deben ser realizados utilizando condiciones GLP (*Good Laboratory Practice*) también llamadas BPL (*Buenas prácticas de laboratorio*). Lo que garantiza la calidad y validez de los resultados de los ensayos en los distintos territorios. ⁽³⁴⁾ Por otro lado, sí es bien es conocido que mientras para la realización de los ensayos clínicos es necesario utilizar lotes fabricados mediante GMP (*Good Manufacturing Practice*), para el desarrollo preclínico no hace falta este tipo de lotes aunque se recomiendan que sean lotes bien conocidos y caracterizados lo más parecidos a los que se utilizan en la fase clínica.⁽²⁾

Actualmente la sociedad está muy concienciada con el uso de animales en el laboratorio y sí bien es verdad que con el avance de distintas técnicas mucha información se puede obtener por métodos *in vitro*, el uso del animal de experimentación sigue siendo una herramienta fundamental, necesaria e inevitable, puesto que es con el modelo con el que se consigue mayor información

extrapolable al ser humano. Pero lo que sí que se ha hecho, es imponer una mayor regulación sobre la racionalización de su uso. Así lo establece la Directiva 86/609/EEC que afirma que siempre que haya alternativa científicamente razonable y satisfactoria se evitará la utilización de animales. Por ello, también es muy importante que los propios científicos se mantengan actualizados sobre los métodos de evaluación toxicológica que se ajusten a la regla de las 3R (reducción, refinamiento y reemplazo), es decir utilizar técnicas que optimicen la utilización de animales, evitando sufrimiento, muertes innecesarias y potenciar la utilización de alternativas a los animales. Con todo esto se conseguirá una investigación más racional y sólida desde el punto de vista científico y más humana desde un punto de vista ético. ^{(35), (36)}

6. CONCLUSIONES

El desarrollo de un medicamento es un proceso complejo que en el caso concreto de las vacunas se ve aún más dificultado por la heterogeneidad del material de partida. Los ensayos toxicológicos preclínicos para su desarrollo, difieren de los métodos tradicionales y deben cumplir los requisitos mínimos referentes a desarrollo de fármacos biológicos.

Las sociedades de expertos demandan la existencia de más guías homogenizadas y estandarizadas para el desarrollo toxicológico lo que permitiría reducir tiempo, costes y recursos, además de facilitar la gestión del proceso de evaluación legal de la solicitud de nuevas vacunas. También en este sentido las agencias regulatorias recomiendan hacer uso de sus programas de asesoría. Además, el plantear de formar organizada el desarrollo toxicológico es una buena herramienta para evitar el uso innecesario de animales, cumpliendo con los principios éticos que la sociedad demanda.

La vacunación es la medida sanitaria más exitosa para salud pública y realmente lo que ha ocurrido es que gracias a la vacunación muchas enfermedades están muy controladas, tienen una baja incidencia, la población no percibe los efectos de la enfermedad y lo que se maximiza es la percepción de las reacciones adversas de la inmunización. Es decir, la población solo es consciente de la “punta del gran iceberg” (las reacciones adversas) pero no de todas las muertes, comorbilidades y complicaciones que se evitan gracias a la vacunación. Esto es uno de los argumentos que están utilizando los movimientos antivacuna que, si bien son minoritarios, están siendo muy publicitados gracias a plataformas informáticas.

Hay que tener en cuenta que el uso de un medicamento y en concreto de las vacunas no es 100% seguro, pero la forma en cómo se hace el desarrollo hasta su comercialización intentan reducir al mínimo las posibles incidencias con los mismos y si está comercializada es porque se ha comprobado que el balance beneficio-riesgo es positivo y con esto colaboran los ensayos toxicológicos preclínicos.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). [Available from: <http://www.who.int/topics/vaccines/es/>].
2. De Miguel M, Gracia C, Martín L, Escribano M. Guía de desarrollos preclínicos. . In: González C, editor. Fundación para el Desarrollo de la investigación en Genómica y Proteómica (Genoma España). Cheo Machín ed. España2012. p. 87.
3. EUPATI. Cómo se fabrica un fármaco. Pasos 3 y 4: Elección de una molécula o cabeza de serie. España2015
4. Silbergeld EK. Toxicología. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. p. 84.
5. Roque Valdés A. Autismo y vacunas pediátricas.: VacciMonitor; 2010.
6. ICH harmonisation for better health [Available from: <http://www.ich.org/home.html>].
7. European Medicines Agency [Available from: <http://www.ema.europa.eu/ema/>].
8. Food and Drug Administration (FDA). [Available from: <https://www.fda.gov/>].
9. Ministry of Health Labour and Welfare (MHLW). [Available from: <http://www.mhlw.go.jp/english/>].
10. Agencia Española del Medicamento y productos sanitarios. [Available from: <https://www.aemps.gob.es/home.htm>].
11. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). 2018 [Available from: <https://www.oecd.org/centrodemexico/laocde/>].
12. Cuadro AM, Burgos C, Álvarez-Builla J. El fármaco y su desarrollo: diez preguntas y una consideración. Real Sociedad Española de Química [Internet]. 2006; 3 [13-21 pp.].
13. Peláez F. Paradigmas actuales en las etapas tempranas del proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Investigación Química [Internet]. 2010; 1 [36-45 pp.].
14. Pauta ICH S3A. Toxicokinetics: the assessment of systemic exposure in toxicity studies. 01/06/1995.
15. Pauta ICH S7A: Estudios de seguridad farmacológica para productos farmacéuticos humanos., (Noviembre de 2000).
16. Hereu P, Arnau JM. El consentimiento informado en los ensayos clínicos. Luces y sombras en la investigación clínica. 5 158-73.
17. Magos Guerrero GA, Lorenzana-Jiménez M. Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. 2009;52: 260-4.
18. ¿Qué es el Sistema Español de Farmacovigilancia de medicamentos de Uso Humano (SEFV-H)? España2015 [Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.:[Available from: <https://www.aemps.gob.es/en/vigilancia/medicamentosUsoHumano/SEFV-H/home.htm>].
19. Reglamento (CE) N° 726/2004 del Parlamento Europeo y el Consejo. 31 de marzo de 2004.
20. Luna CM, Rizzo O, Monteverde A, Caberlotto O, Buljuvasich D, Ceccato A, et al. Recomendaciones de vacunación en adultos con enfermedades respiratorias. . Revista Americana de Medicina Respiratoria [Internet]. 2015.; 4 [314-24 pp.].
21. Aparicio Rodrigo M. Antivacunas: un reto para el pediatra. 2015. p. 325.
22. Stefanoffa P, Mamelundb S, Robinsonc M, Netterlidd E, Tuellse J, Riise Bergsakerb M. Seguimiento de las actitudes de los padres sobre la vacunación en los países europeos: seguridad, actitudes, formación y comunicación en materia de vacunas
23. R. W, Sharp L. Anti-vaccinationists past and present. BMJ. ed2002.
24. ICH guideline S6 (R1) – preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals, (2011).
25. Guideline on adjuvants in vaccines for human use, EMEA/CHMO/VEG/134716/2004 (2005).
26. R. W, Sharp L. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. Word Health Organisation (OMS); 2005. p. 151.
27. Directiva 2004/73/CE de la Comisión de 29 de abril de 2004, por la que se adapta por vigésimo novena vez al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del Consejo, relativa a la aproximación de disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas., DOUE-L-2004-81116 (2004).
28. Note for Guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines (CPMP/SWP/465/95), (1997).
29. Arencibia Arrebola DF, Rosario Fernández LA, López Ferie Y, Fariñas Medina M, Infante Bourzac JF, Días Rivero D, et al. Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda RETEL (Revista de toxicología en línea). 2003:15.
30. Gámez R, Rosa. M. Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados. CENIC Ciencias Biológicas. 2007:5
31. Pauta ICH: Orientación sobre los estudios de seguridad para pacientes farmacéuticos y la comercialización de medicamentos M3 (R2). 2009. p. 24
32. Preguntas y respuestas sobre la retirada del CPMP Nota para orientación sobre ensayos preclínicos farmacológicos y toxicológicos de vacunas (CPMP/SWP/465) EMA/CHMP/SWP/242917/2016 (2016).
33. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. Word Health Organisation (OMS); 2005. p. 151.
34. Principios de las buenas prácticas de laboratorio.: OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico); [OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico):[Available from: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-series-on-principles-of-good-laboratory-practice-and-compliance-monitoring_2077785x].
35. Agular Catalán A, Coyo Asensio N, Giménez Terré A. Bioética en experimentación animal. Facultad de Veterinaria2012. p. 209.
36. Hernández S. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. Facultad de Medicina Uruguay.2006. p. 252-6.

