

Desarrollo de un adyuvante superador en relación a los actualmente utilizados en formulaciones de vacunas veterinarias

Daiana Bertona

Lipomize, Parque Tecnológico, Ruta Nacional 168, Km 472.4

Laboratorio de Tecnología Inmunológica, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas (UNL), Paraje El Pozo

Área: Ciencias Biológicas; Sub-área: Biotecnología

INTRODUCCIÓN

En los últimos 30 años se ha comprendido el efecto que presentan los adyuvantes al permitir guiar el tipo de respuesta inmune generada (Mohan T. 2013). Este conocimiento permite, por ejemplo, decidir el uso de uno u otro adyuvante en función de si la vacuna desarrollada requiere presentar una respuesta dirigida a agentes infecciosos intracelulares o si debe ser dirigida a neutralizar toxinas en infecciones extracelulares. La mayoría de los adyuvantes disponibles para uso veterinario contribuyen sólo a la estimulación de una respuesta inmune humoral (producción de anticuerpos).

Los adyuvantes comúnmente utilizados incluyen a sales metálicas, tales como el hidróxido o fosfato de aluminio; liposomas; el monofosforil-lípido A derivado de bacteria, la toxina colérica, entre otros (Friede M. 2003).

Ya a fines de los años 80, el desafío de los investigadores era lograr obtener un adyuvante con la capacidad de estimular no solo una respuesta inmune humoral sino también una respuesta inmune mediada por células (caracterizada por la generación de citoquinas tipo Th1 y de células T citotóxicas). Esto fue logrado por Morein, quien desarrolló una partícula o un complejo inmunoestimulante denominado ISCOM (Sjolander A. 1998).

Los ISCOM son partículas esféricas con forma de jaula de aproximadamente 40 nm de diámetro, compuestas por saponina, colesterol, fosfolípidos y un antígeno proteico. Estas partículas esféricas pueden retener al antígeno mediante interacciones hidrofóbicas. ISCOMATRIX comprende al ISCOMs sin el antígeno, lo que permite una mayor flexibilidad en sus aplicaciones en comparación con ISCOM, debido a que no posee la limitación de requerir utilizar antígenos hidrofóbicos (Zhao L. 2013).

Las principales características de la tecnología ISCOM para una respuesta inmune humoral incluyen la magnitud, la velocidad y la longevidad de la respuesta de anticuerpos, así como también la oportunidad de reducir la dosis de antígeno haciéndola adecuada para el diseño de vacunas que requieren una rápida respuesta y para casos en que el antígeno se encuentra en forma limitada o su fabricación es costosa. En cuanto a la respuesta inmune celular, la principal característica de esta tecnología radica en la habilidad de inducir fuertes y perdurables respuestas de células T CD4+ y T CD8+. Además, esta tecnología combina la ventaja de un sistema delivery con la presencia de un adyuvante natural en su formulación (la saponina). Así mismo, se observó que la formulación del ISCOM o ISCOMATRIX retiene la actividad adyuvante de la saponina, incrementando la estabilidad, reduciendo su actividad hemolítica y produciendo menor toxicidad (Hong-Xiang S. 2009).

Los resultados obtenidos en ensayos previos realizados por nuestro grupo de trabajo, donde se comparó el desempeño del adyuvante ISCOMATRIX (de ISCONOVA) con el utilizado actualmente en las vacunas comerciales (hidróxido de aluminio), demostraron que la respuesta inmune en vacas es muy superior al utilizar ISCOMATRIX en relación al adyuvante actualmente utilizado (Camussone CM. 2012, Camussone CM.

Proyecto BIT 2014: Optimización de la producción de un adyuvante tipo ISCOM para su uso en formulaciones de vacunas veterinarias.

Director: Dr. Iván Marcipar

Co-director: Lic. Alcides Nicastro

2013). En base a estos resultados y teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, decidimos preparar nuestro propio adyuvante tipo ISCOM.

Durante el desarrollo de este proyecto se utilizó un método de obtención que se denomina “inyección etanólica”. En dicho método, soluciones etanólicas de colesterol y fosfolípidos se inyectan en soluciones acuosas de saponina. El método es simple, rápido, eficiente y ofrece la posibilidad de producción a gran escala comercial (Hong-Xiang S. 2009). Se evaluaron diferentes condiciones de producción, así como insumos de diferente procedencia, para estimar la mejor relación calidad-precio. A su vez se evaluaron liposomas catiónicos y aniónicos. De todas las condiciones evaluadas, se seleccionaron dos preparaciones y se compararon sus capacidades adyuvantes con la el producto ISCOM de ISCONOVA y diferentes adyuvantes comerciales. Se evaluaron utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como antígeno modelo y ratones de la cepa BALB/C como modelo biológico experimental.

OBJETIVOS

- 1) Elaboración de distintos prototipos de adyuvante por medio de la técnica de Inyección etanólica evaluando diferentes variables para su obtención.
- 2) Determinación de parámetros fisicoquímicos (tamaño de partícula y estabilidad).
- 3) Evaluación biológica de la actividad como adyuvante.

METODOLOGÍA

1) Obtención del adyuvante tipo ISCOMs mediante la técnica de “inyección etanólica”.

Luego de diferentes evaluaciones preliminares, se optó por una preparación de liposomas utilizando dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), colesterol y estearilamina (para liposomas catiónicos) y dipalmitoil-fosfatidilglicerol (para liposomas aniónicos). En cada caso, los tres componentes se disolvieron en la fase orgánica conteniendo etanol. Esta solución se inyectó en buffer acetato y posteriormente se sometió a un paso de extrusión y esterilización. Luego se preparó una fase acuosa conteniendo a la saponina. Finalmente, la fase acuosa se inyectó a la fase orgánica.

Las formulaciones obtenidas fueron denominadas ISPA+ e ISPA- (del inglés, *immunostimulant particle*).

2) Determinación de los parámetros físico-químicos (tamaño de partícula y estabilidad) del adyuvante obtenido.

- DLS (Dynamic Light Scattering): las muestras se analizaron mediante DLS con el objetivo de determinar el tamaño predominante así como la dispersión de tamaño de las partículas en suspensión.

- Estabilidad: a las formulaciones seleccionadas se le realizaron pruebas de estabilidad, repitiendo la determinación fisicoquímica anteriormente mencionada, a distintos tiempos y en distintas condiciones de conservación.

3) Evaluación biológica de la actividad del adyuvante.

INMUNIZACIÓN DE RATONES: se utilizaron hembras de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad al comienzo del protocolo de inmunización. Los animales (cada grupo con un n=5) recibieron 3 dosis por vía subcutánea, una cada 2 semanas, de las siguientes formulaciones: grupo control recibirá BSA + ISCOM de ISCONOVA, los grupos experimentales fueron BSA + adyuvante formulado con ISPA+, BSA + adyuvante formulado con ISPA- y BSA + adyuvantes comerciales (Hidróxido de Aluminio; Freund y el adyuvante oleoso Montanide, ISA206). Previamente a cada inoculación, y una semana

luego de la última, se obtuvo una muestra de sangre por punción retrorbital. Todos los procedimientos se realizaron bajo anestesia. Una vez finalizado el protocolo de inoculación, los ratones fueron sacrificados por sangrado bajo anestesia, se recuperó el suero y se conservó a -20°C hasta su utilización.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE: la producción de anticuerpos específicos, en sangre, se evaluó aplicando un ensayo de ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos tipo IgG1 e IgG2a anti BSA específicos.

RESULTADOS

Para llevar a cabo la determinación de los tamaños se realizó un análisis de “*Estimación de la Distribución de Tamaños de Liposomas (DTL) en Número*”. En la gráfica (Fig. 1), $N(D)$ indica la fracción (en número) de liposomas de los diferentes tamaños D . En el caso del ISPA cargado positivamente, se observa una DTL con una población principal por debajo de 100 nm, donde la distribución exhibe un tamaño medio en número de 59.0 nm. Para el caso del ISPA cargado negativamente, se puede observar una DTL con una población principal por debajo de 100 nm, donde la distribución exhibe un tamaño medio en número de 34.0 nm.

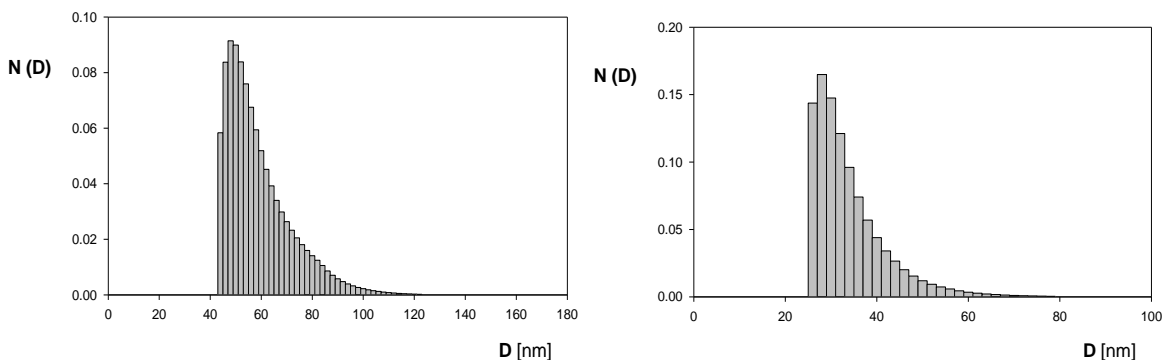


Fig. 1: Estimación de la Distribución de Tamaños de Liposomas (DTL) en Número para el ISPA cargado positivamente (a la izquierda) y para el ISPA cargado negativamente (a la derecha).

Los resultados obtenidos de los ensayos biológicos realizados para evaluar la respuesta inmune generada por ambas formulaciones de ISPA (cargados positiva y negativamente) y por los adyuvantes comerciales se muestran en la figura 2.

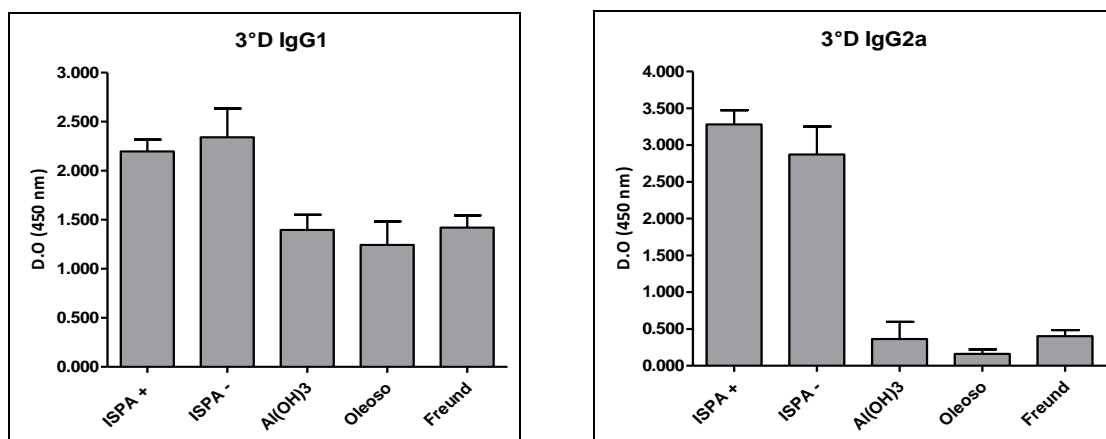


Fig.2: DO medida para la subclase de inmunoglobulina IgG₁ (a la izquierda) e IgG_{2a} (a la derecha). ISPA +: ISPA cargado positivamente; ISPA -: ISPA cargado negativamente; Al(OH)₃: Hidróxido de Aluminio; Freund y el adyuvante oleoso (Montanide, ISA206); 3°D: tercera dosis. Dilución del suero: 1/1000.

CONCLUSIONES

Las gráficas permiten ver la superioridad en el desempeño de nuestro adyuvante en comparación con los actualmente disponibles en el mercado. Se puede observar la generación de un perfil de respuesta humoral inflamatorio/regulador equilibrado, destacándose por permitir una respuesta inflamatoria TH1 que los demás adyuvantes no permiten.

Si bien todavía no hemos podido finalizar los ensayos de estabilidad que nos permitirían llevar a cabo la elección definitiva del ISPA cargado positiva o negativamente, hemos decidido evaluar en el tiempo tanto a los ISPA negativos como positivos. Esto es así ya que si bien ISPA presenta un mejor desempeño a nivel inmunogénico el excelente desempeño de ISPA cargado negativamente podría ser superior luego de un año en el caso en que confirmaremos su mayor estabilidad en el tiempo.

Una vez finalizados los ensayos de estabilidad estaremos en condiciones de comenzar ensayos destinados a formular vacunas de uso comercial. Las características de practicidad y poder adyuvante de nuestro producto lo posicionan como un candidato de gran interés comercial para reemplazar los adyuvantes actualmente usados en vacunas veterinarias.

BIBLIOGRAFÍA

- Camussone CM., Veaute CM., Porporatto C., Morein B., Marcipar IS., Calvinho LF.** 2012. Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell vaccine formulated with ISCOMATRIX™ adjuvant. *J Dairy Res*; 80(1):72-80.
- Camussone CM., Veaute CM., Pujato N., Morein B., Marcipar IS., Calvinho LF.** 2013. Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell and lysate vaccine formulated with ISCOM Matrix adjuvant. *Res Vet Sci.*; 96(1):86-94.
- Friede M., Garcon N.** 2003. Vaccine comprising an ISCOM consisting of sterol and saponin which is free of additional detergent. US 6,506,386 B1
- Hong-Xiang S., Yong X., Yi-Ping Y.** 2009. ISCOMs and ISCOMATRIX™. *Vaccine* 27: 4388-4401.
- Mohan T., Verma P., Rao N.** 2013. Novel adjuvants y delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. *Indian J Med Res* 138: pp 125-141
- Sjolander A., Cox J.C., Barr I.G.** 1998. ISCOMs: an adjuvant with multiple functions. *Journal of Leukocyte Biology*, Vol. 64.
- Zhao L., Seth A., Wibowo N., Zhao CX., Mitter N., Yu C., Middelberg A.P.J.** 2013. Nanoparticle vaccines. *Vaccine* 32: 327-337.