

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

## **Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en  
Ciencias Biológicas

**“Ajustes para la producción del adyuvante de desarrollo local ISPA y  
obtención de variantes del mismo con mayores capacidades  
inmunoestimulantes”**

**Médica Veterinaria Giuliana Antonella Lupi**

Director de Tesis: Dr. Iván Marcipar

Co-director de Tesis: Dr. Gabriel Cabrera

Lugar de Realización: Laboratorio de Tecnología Inmunológica – Facultad  
de Bioquímica y Ciencias Biológicas – Universidad Nacional del Litoral

**-2022-**

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis, no hubiera sido posible sin todos los actores que han formado parte de ella. En primer lugar mi agradecimiento a las instituciones que han permitido su desarrollo. La Universidad Nacional del Litoral, mi segunda casa de estudios y lugar de trabajo, ANPCyT y CONICET, por las becas concedidas que permitieron financiar el desarrollo en su totalidad y a la AUIP (Asociación Universitaria Iberoamericana de Posgrado) por brindarme una beca de intercambio que me permitió desarrollar parte de la tesis en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada – España.

A mis directores, Iván, por haberme brindado la posibilidad de conocer un mundo que para mí era definitivamente inimaginable, por las infinitas charlas, los incontables correos de ida y vuelta, y los retos, cuando fue necesario “despertarme”, gracias por ayudarme a recordar en medio de la noche, que la prioridad era ir tras mi sueño. Han sido largas horas de aprendizaje mutuo, hemos trabajado y discutido en la mesada y tras las pantallas, pero vaya si me has ayudado a crecer trabajando en equipo todos estos años. Gracias por acompañarme en el trabajo más duro, a buscar soluciones de forma conjunta y a escribir conmigo esta tesis. Gabriel, por la templanza y la paciencia, la sabiduría en tiempos de pandemia y el acompañamiento no solo en los experimentos sino también cuando el camino se hizo angosto para todo el equipo en ausencia de Iván.

A mis compañeros Luz P., Estefi, Iva, Luz R., Ma. Sol, y los muchos tesinistas del LTI, porque cada uno a su manera fue dejando un pedacito en mí, enseñándome, compartiendo con humildad y compañerismo todo lo que sabían, sin ustedes no hubiera sido tan lindo aprender jugar en el mundo de las mesadas.

A las personas que han colaborado en los desarrollos de ISPA: a la Memoria de la Dra. Patricia Zamorano y al Dr. Juan Bidart por sus estudios del adyuvante en modelos de fiebre aftosa; Dra. Silvia Estein y su equipo por sus estudios del adyuvante en modelos de brucelosis ovina, Dra. Ana Rosa Pérez y su equipo por las numerosas colaboraciones y la cesión de moléculas que permitieron el desarrollo de este trabajo, Dra. Verónica González por su ayuda incansable en los análisis de nanopartículas, Dra. Ana Sonzogni por permitirme experimentar juntas con saponinas en modelos alternativos de inmunización, Dr. Claudio Berli y su equipo, por acompañarnos a la búsqueda de metodologías de trabajo alternativas en formulaciones de nanopartículas. A la Dra. Ma. Mercedes De Zan, por su ayuda desinteresada facilitándonos material de trabajo para cromatografía. Especialmente a los Dres. Álvaro Siano, Roque Spinelli, Gerardo M. Oresti, Florencia X. Santiago V., Ma. Laura Pisarello y Maira Maquiariain, gracias por el tiempo compartido, por las largas horas de mesada y por brindarse a ayudar siempre que fuera necesario, gran parte de los procesos de caracterización de saponinas y lípidos no hubieran



sido posibles sin un trabajo conjunto, han sido un pilar muy importante. Al Dr. Antonio Osuna, por brindarme la posibilidad de un intercambio en la etapa final de mi doctorado, por recibirme con las puertas abiertas dispuesto a colaborar en medio de una pandemia, por su calidez, su sabiduría y paciencia, gracias por tanto Antonio y equipo!

A la persona de Daniel Urrutia, por su colaboración con la edición de imágenes y compaginación de las mismas a lo largo de esta tesis. Gracias por tu compromiso en su edición y corrección!

A mi familia, mami y papi, hermanos, cuñada y sobrina. Mi motorcito diario desde donde nos toque estar, gracias por apoyarme siempre, por darme las alas tan necesarias para volar a tiempo, por darme tanto amor y acompañarme de toda manera posible cuando los días se hicieron largos, las ausencias se han sentido y los abrazos han faltado. A mis tíos, especialmente Tito y Yoyi, que más que tíos han sido padres, cuidando desde siempre, acompañando desde todo lugar posible, ojala todos tuvieran unos tíos así. A mi prima Norma, una amiga, una compañera, una guía en momentos poco claros, incondicional, solo gracias! A mis amigas, incontables, repartidas hoy por todo el mundo, gracias por estar siempre (especialmente Romi, Flor, Vero, Fati, Moni, Barby, Cande, Lili). A la Familia Ludi-Danielli, mis padres del corazón desde que llegue a Santa Fe, y con ellos a la memoria de Vani, que desde donde está, nos acompaña siempre.

A mi compañero, mi Facundito, la persona que me supo sostener a base de cuatro palabras. ¿Giuli, tú tienes FE?, gracias por tu compañía, por tu amor incondicional, tus abrazos apretados que de alguna forma son el lugar donde se me terminan todos los miedos, por darme la mano y al mismo tiempo empujarme a saltar al vacío solo para alcanzar mis sueños más grandes. Te amo tanto!

A mis guías y maestros, esos que “no se ven” y que han hecho de mí una mejor persona, esos que desde algún plano paralelo me enseñaron a transitar el día a día de una manera diferente, enseñándome que donde haya amor todo será posible, todo. Si algo me ha quedado claro a lo largo de estos años es que sin fe no existiría la ciencia, hay que creer en lo “invisible” para crear lo “imposible”.

El fin de una etapa, el cierre de un ciclo, la llegada a la meta (una de tantas). La vida es un infinito camino de aprendizajes, algunos más dulces que otros y hay procesos de que nos cambian para siempre. Sin dudas que estos años han sido eso.

Gracias, Gracias, Gracias.

## APORTES CIENTÍFICO - TECNOLÓGICOS

### PATENTE

TÍTULO: UNA COMPOSICIÓN ADYUVANTE Y UN PROCESO PARA OBTENER DICHA COMPOSICIÓN – N° DE SOLICITUD: 20210103347 - PRESENTACIÓN: 02/12/2021 - 12:07:49 p.m. – TITULARES: UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL – CONICET.

### PUBLICACIONES

- Lupi, G. A., Santiago Valtierra, F. X., Cabrera, G., Spinelli, R., Siano, Á. S., González, V., Osuna, A., Oresti, G. M., & Marcipar, I. (2022). Development of low-cost cage-like particles to formulate veterinary vaccines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 110460. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2022.110460>
- Bidart, J., Kornuta, C., Gammella, M., Gnazzo, V., Soria, I., Langellotti, C., Mongini, C., Galarza, R., Calvino, L., Lupi, G., Quattrocchi, V., Marcipar, I., & Zamorano, P. (2020). A New Cage-Like Particle Adjuvant Enhances Protection of Foot-and-Mouth Disease Vaccine. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00396>
- Bidart, J., Mignaqui, A., Kornuta, C., Lupi, G., Gammella, M., Soria, I., Galarza, R., Ferella, A., Cardillo, S., Langellotti, C., Quattrocchi, V., Durocher, Y., Wigdorovitz, A., Marcipar, I., & Zamorano, P. (2021). FMD empty capsids combined with the Immunostant Particle Adjuvant -ISPA or ISA206 induce protective immunity against foot and mouth disease virus. *Virus Research*, 198339. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198339>
- Moran, M. C., Domínguez, M. P., Bence, A. R., Rodríguez, M. G., Goldbaum, F. A., Zylberman, V., Paola, P. R., Lupi, G., Marcipar, I. S., Lützelshwab, C. M., & Estein, S. M. (2022). Evaluation of the efficacy of polymeric antigen BLSOmp31 formulated in a new cage-like particle adjuvant (ISPA) administered by parenteral or mucosal routes against *Brucella ovis* in BALB/c mice. *Research in Veterinary Science*, 145, 29-39. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.02.001>
- Gamba, J. C., Roldán, C., Prochetto, E., Lupi, G., Bontempi, I., Poncini, C. V., Vermeulen, M., Pérez, A. R., Marcipar, I., & Cabrera, G. (2021). Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Enhance a Trans-Sialidase-Based Vaccine Against *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 671104. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.671104>
- Pacini, M. F., González, F. B., Dinatale, B., Bulfoni Balbi, C., Villar, S. R., Farré, C., Lupi, G., Espariz, M., Blancato, V. S., Magni, C., Marcipar, I., & Pérez, A. R. (2022).

Nasal immunization with a *L. lactis*-derived trans-sialidase antigen plus c-di-AMP protects against acute oral *T. cruzi* infection. *Vaccine*, S0264-410X(22)00223-7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.02.071>

- Sonzogni, A., Cabrera, G., Lupi, G., Gugliotta, L., Gonzalez, V., Marcipar, I., & Minari, R. (2022). Film Forming Nanogels for Needle-free Transdermal Vaccination. *Macromolecular Bioscience*, e2100515. <https://doi.org/10.1002/mabi.202100515>

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b> .....	8
<b>RESUMEN</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	16
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	19
1.1. EL ROL DE LOS ADYUVANTES EN LAS VACUNAS.....	20
1.2. EL USO DE ADYUVANTES EN EL DISEÑO DE VACUNAS.....	31
1.3. EL ADYUVANTE ISPA DE DESARROLLO LOCAL Y SUS ANTECEDENTES .....	46
1.4. NUEVAS METAS A ALCANZAR EN EL DESARROLLO DEL ADYUVANTE ISPA.....	48
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	49
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	50
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
<b>3. CAPÍTULO 1</b> .....	51
<b>Desarrollo de un proceso de obtención de saponinas con alta actividad adyuvante y baja toxicidad a partir de extractos crudos de <i>Quillaja saponaria</i></b> .....	51
3.1. INTRODUCCIÓN.....	52
3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	56
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
3.3.1. Obtención y caracterización fisicoquímica de saponinas derivadas de <i>Quillaja saponaria</i> .....	57
3.3.2. Formulación de partículas adyuvantes tipo ISPA.....	58
3.3.3. Evaluación del desempeño inmunológico.....	59
3.3.4. Análisis de datos.....	60
3.4. RESULTADOS.....	61
3.4.1. Obtención y caracterización fisicoquímica de saponinas derivadas de <i>Quillaja saponaria</i> .....	61
3.4.2. Formulación de partículas adyuvantes tipo ISPA con saponinas refinadas a partir del extracto Kerry®.....	64
3.4.3. Evaluación del desempeño inmunológico.....	65
3.5. DISCUSIÓN.....	68
3.6. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 1.....	70
<b>4. CAPÍTULO 2</b> .....	71
<b>Desarrollo de un proceso de obtención de lípidos y de la obtención de jaulas lipídicas para reducir los costos del adyuvante ISPA.</b> .....	71

4.1.	INTRODUCCIÓN .....	72
4.2.	OBJETIVO ESPECÍFICO .....	76
4.3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	77
4.3.1.	Obtención de nuevas fuentes de lípidos .....	77
4.3.2.	Formulación de partículas adyuvantes ISPA.....	81
4.3.3.	Evaluación del desempeño inmunológico.....	82
4.3.4.	Análisis de datos.....	83
4.4.	RESULTADOS.....	84
4.4.1.	Obtención de nuevas fuentes de lípidos: .....	84
4.4.2.	Formulación de partículas adyuvantes ISPA.....	92
4.4.3.	Evaluación del desempeño inmunológico.....	98
4.5.	DISCUSIÓN.....	105
4.6.	CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 2 .....	111
<b>5.</b>	<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>112</b>
	<b>Obtención de variantes potenciadas del adyuvante ISPA .....</b>	<b>112</b>
5.1.	INTRODUCCIÓN .....	113
5.2.	OBJETIVO ESPECÍFICO .....	116
5.3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	117
5.3.1.	Formulación de nanopartículas adyuvantes .....	117
5.3.2.	Derivatización de las nanopartículas adyuvantes con lípidos tipo vinil sulfona.....	117
5.3.3.	Evaluación del desempeño inmunológico.....	118
5.3.4.	Análisis de datos.....	120
5.4.	RESULTADOS.....	121
5.4.1.	Suplementación de nanopartículas ISPA con compuestos potenciadores de la respuesta adyuvante.....	121
5.4.2.	Derivatización de las nanopartículas adyuvantes con lípidos tipo vinil sulfona y su posible uso para ligación a proteínas de interés vacunal .....	127
5.5.	DISCUSIÓN.....	131
5.6.	CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 3 .....	138
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>139</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>141</b>

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<: menor a.

>: mayor a.

=: igual a.

®: registrado.

°C: grados centígrados.

µg: microgramos.

µl: microlitros.

A°: Armstrong.

Ac: anticuerpo.

ACF: adyuvante complete de Freund.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AEP: Asociación Española de Pediatría.

Ag: antígeno.

AGL: ácidos grasos libres.

AIF: adyuvante incompleto de Freund.

Al(OH): hidróxido de aluminio.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

AS01: nombre comercial del Sistema adyuvante 01.

AS03: nombre comercial del Sistema adyuvante 03.

AS04: nombre comercial del Sistema adyuvante 04.

AUC: de la sigla área bajo la curva.

BCG: bacilo Calmette-Guerin.

C<sub>3</sub>H<sub>80</sub>: isopropanol.

CD: célula dendrítica.

CD40: molécula coestimuladora CD40.

CD80: molécula coestimuladora CD80.

CD86: molécula coestimuladora CD86.

c-di-AMPC: adenosín mono fosfato di cíclico.

CH<sub>3</sub>CN: acetonitrilo.

Col: colesterol.

CPA: célula presentadora de antígenos.

CpG-ODN: oligodesoxinucleótidos CpG.

DAG: di-acilgliceroles.

DAMP: patrones moleculares asociados a peligro.

DGDG: di-galactosil-glicérido.

DHB: ácido 2,5-di-hidroxibenzoico.

DLS: dispersión dinámica de la luz.

DO: densidad óptica.

DPG: difosfatidilglicerol.

DPI: después de la primera inmunización.

DPPC: di-Palmitoil-fosfatidilcolina.

DTH: respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado.

EC: ésteres de colesterol.

ELISA: de su sigla ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

En vol.: en volumen.

EtOH: etanol.

FAME: metilésteres de ácidos grasos.

g: gramo.

GC: cromatografía gaseosa.

GPL: glicerofosfolípidos totales.

GyE: glucósidos y esteroides

h: hora.

H<sub>2</sub>O: agua.

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico.

HPLC: cromatografía líquida de alta precisión o alta resolución.

HPV: virus del papiloma humano.

HSPC: fosfatidilcolina de soja completamente hidrogenada

IA: inyección alcohólica.

IFN- $\gamma$ : interferón gamma.

IgA: inmunoglobulina de tipo A.

IgE: inmunoglobulina de tipo E.

IgG: inmunoglobulina de tipo G.

IgG1: inmunoglobulina de tipo G subclase 1.

IgG2a: inmunoglobulina de tipo G subclase 2a.

IgG2b: inmunoglobulina de tipo G subclase 2b.

IgG2c: inmunoglobulina de tipo G subclase 2c.

IgG3: inmunoglobulina de tipo G subclase 3.

IL-1: interleucina 1.

IL-10: interleucina 10.

IL-12: interleucina 12.  
IL-13: interleucina 13.  
IL-4: interleucina 4.  
IL-5: interleucina 5.  
ISCOM: complejos inmunoestimulantes.  
ISPA: de su sigla adyuvante de partículas inmunoestimulantes.  
LN: lípidos neutros.  
LPC: liso-fosfatidilcolina.  
LPE: liso-fosfatidiletanolamina.  
LPS: lipopolisacáridos.  
LTc: linfocito T citotóxico.  
M: molar.  
MALDI-TOF: técnica de espectrometría de masas basada en desorción-ionización por láser asistida por matriz acoplada a un analizador TOF o de tiempo de vuelo.  
MeOH: metanol.  
MF59: nombre comercial del adyuvante MFS9.  
mg: miligramos  
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.  
MHCI: complejo mayor de histocompatibilidad de tipo 1.  
MHCII: complejo mayor de histocompatibilidad del tipo 2.  
Min: minutos  
ml: mililitros.  
mm: milímetros.  
mM: milimolar.  
MPL®: nombre comercial del monofosforil-lípido-A  
MPLA: monofosforil-lípido-A  
N: normal.  
N<sub>2</sub>: nitrógeno.  
Na (OH): hidróxido de sodio.  
NaCl: cloruro de sodio.  
NK: células asesinas naturales.  
NLR: receptores tipo NOD.  
NLRP3 / NALP3: sigla representativa de complejo de proteínas formadoras de inflamasomas.  
nm: nanómetro.  
NO: de su sigla óxido nítrico.  
NOD: receptores similares al dominio de oligomerización y unión a nucleótidos.



O/W: emulsión oil / water o de aceite en agua.  
OMS: Organización Mundial de la Salud.  
OVA: Ovoalbúmina.  
PA: Acido fosfatídico  
PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos.  
PRRs: patrones de reconocimiento de patógenos.  
PBS: de su sigla tampón fosfato salino.  
PC: fosfatidilcolina.  
PE: fosfatidiletanolamina.  
PEG: poli-etilenglicol.  
PI: fosfatidilinositol.  
PL: fosfolípidos.  
PL: precursor liposomal.  
PRR: receptores de reconocimiento de patrones.  
PS: fosfatidilserina.  
PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.  
*Q. brasiliensis: Quillaja brasiliensis.*  
*Q. saponaria: Quillaja saponaria.*  
QH-A: fracción de *Q. saponaria* de elución temprana de RP-HPLC.  
QH-B: fracción de *Q. saponaria* de elución intermedia de RP-HPLC.  
QH-C: fracción de *Q. saponaria* de elución posterior de RP-HPLC.  
QS-17: fracción QS-17 de *Q. saponaria*.  
QS-18: fracción QS-18 de *Q. saponaria*.  
QS-21: fracción QS-21 de *Q. saponaria*.  
QS-7: fracción QS-7 de *Q. saponaria*.  
*rf*: relación de frentes.  
Rpm: revoluciones por minuto.  
*S. aureus: Staphylococcus aureus*  
SAXS: de la sigla correspondiente al nombre de una técnica analítica que mide las intensidades de rayos X dispersados en una muestra como función del ángulo de dispersión.  
Sn.: solución.  
SP.: saponina  
T CD4+: linfocitos T CD4.  
T CD8+: linfocitos T CD8.  
TAG: triacilgliceroles  
TEM: microscopía electrónica de transferencia.

TFA: ácido trifluoroacético.  
TH0: linfocito T virgen.  
TH1: linfocito T helper 1.  
TH2: linfocito T helper 2.  
Thf: linfocito T helper folicular .  
TLC: cromatografía en capa fina.  
TLR: receptores tipo Toll.  
TLR2: receptores tipo Toll 2.  
TLR4: receptores tipo Toll 4.  
TLR7: receptores tipo Toll 7.  
TLR9: receptores tipo Toll 9.  
TMB: 3, 3', 5, 5'-tetrametil-benzidina.  
TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa.  
Treg: linfocito T regulatorio.  
™: marca registrada.  
UV: ultravioleta.  
v/v/v/v: volumen/ volumen/ volumen/ volumen.  
v/v/v: volumen/ volumen/ volumen.  
v/v: volumen/ volumen.  
v/w: volumen en peso.  
VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.  
VLP: virus-like-particle o partículas similares a virus.  
W/O: emulsión tipo water / oil.  
x g: indicativo de fuerza centrífuga (medida como xg, gravedad).  
 $\Delta$ mm: delta o diferencia expresada en milímetros.

## RESUMEN

Las vacunas de subunidades son consideradas la plataforma más segura cuando se deben realizar ensayos clínicos. Es por ello que estas vacunas son las más elegidas por los laboratorios productores que buscan lograr la aprobación de las agencias regulatorias. Sin embargo, debido a que ha sido ampliamente descrito que las moléculas de subunidades aisladas son poco inmunogénicas, estas deben formularse con adyuvantes. Esto ha dado lugar a un creciente interés por parte de los desarrolladores de vacunas de disponer de nuevos adyuvantes que mejoren los actualmente disponibles.

En un trabajo previo realizado en el Laboratorio de Tecnología Inmunológica de la FBCB-UNL, en el cual se ha desarrollado esta tesis, se describió una formulación adyuvante denominada ISPA (Partícula Inmunoestimulante) compuesta por nanopartículas tipo jaula. Si bien el adyuvante ISPA puede prepararse por un método simple y más económico que los descritos anteriormente para las partículas tipo jaula, su preparación requiere fosfolípidos comerciales, saponinas y colesterol que son costosos, haciendo inviable su uso en vacunas veterinarias. Por lo tanto, en esta tesis el objetivo fue obtener y evaluar partículas tipo jaula estables que pudieran prepararse mediante un método económico estandarizado y escalable. Para ello se trabajó en: i) la obtención de saponinas y lípidos de bajo costo y ii) la determinación de las proporciones y del método a utilizar para obtener partículas en forma de jaula con estos nuevos reactivos (teniendo en cuenta que la proporción de componentes necesaria para formar las partículas depende simultáneamente de la naturaleza química de los reactivos y del método utilizado para obtenerlos). Como objetivo adicional, se planteó obtener formulaciones de partículas en forma de jaula que presentaran una actividad mejorada en relación con el ISPA original. Las partículas obtenidas con los diferentes componentes y métodos fueron evaluadas funcionalmente mediante su formulación con Ovoalbúmina (OVA), inmunizando ratones y luego midiendo los niveles de anticuerpos específicos anti-OVA tipo IgG1 e IgG2a en el suero de los animales, así como midiendo la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH). Las partículas formuladas alternativamente con las diferentes saponinas y los lípidos obtenidos en este trabajo se compararon en su desempeño inmunológico con el adyuvante ISPA original. También se comparó la formulación más prometedora con Alhydrogel® (una formulación comercial a base de hidróxido de aluminio). Las nuevas formulaciones potenciadas con compuestos inmunoestimulantes también se compararon con el ISPA original y, en este caso, se estudiaron las poblaciones de linfocitos activados a largo plazo para valorar si la potenciación favorece la persistencia de la respuesta inmune en el tiempo. Los resultados obtenidos en la tesis se describen en cuatro apartados:

La introducción general analiza la utilidad del uso de adyuvantes en las vacunas y los

mecanismos por los cuales actúan en base a la literatura previa.

En el Capítulo 1 se presentan los resultados correspondientes a la extracción de saponinas a partir del extracto crudo comercial Kerry® de *Quillaja saponaria*. Se describe la obtención de un extracto de saponinas con bajos niveles de impurezas. El extracto se obtuvo mediante diálisis y se caracterizó por TLC (cromatografía en capa fina), HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) y MALDI-TOF (técnica de espectrometría de masas basada en desorción-ionización láser asistida por matriz acoplada a un TOF o tiempo de analizador de vuelo). También se describe que el desempeño inmunológico de las partículas preparadas con el nuevo extracto fue similar al del ISPA original preparado con Quil-A®.

El Capítulo 2 describe la obtención de lípidos alternativos a los utilizados originalmente. Se obtuvieron y ensayaron fosfolípidos alternativos a la di-palmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) utilizados en la fórmula original, así como el colesterol de huevo (Chol). Estos nuevos lípidos correspondieron a fosfolípidos comerciales derivados de la soja (HSPC), lípidos extraídos de residuos de la industria del aceite de soja y una mezcla de lípidos que contenían fosfolípidos y colesterol obtenidos de la yema de huevo de gallina por extracción etanólica. Los extractos lipídicos obtenidos se caracterizaron por TLC (cromatografía en capa fina) y GC (cromatografía de gases). Posteriormente, los diferentes lípidos extraídos se combinaron alternativamente con la saponina comercial Quil-A® o con la saponina semirrefinada Kerry® mediante el método de inyección etanólica (IA) o el método del precursor liposomal (PL) para obtener diferentes preparados de partículas tipo jaula. En base al objetivo planteado en este capítulo de lograr un adyuvante de bajo costo, la formulación que presentó los resultados más prometedores correspondió a las partículas formadas por el método del precursor liposomal con saponinas Kerry® y los lípidos derivados del extracto de yema de huevo (ISPA YOLK-PL). Esta preparación permitió obtener niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2a superiores a los de la formulación original desarrollada con componentes comerciales ( $p < 0,05$ ). La respuesta de anticuerpos y DTH de los adyuvantes ISPA original e ISPA YOLK-PL también se comparó con Alhydrogel®. Se encontró que tanto ISPA original como ISPA YOLK-PL superaron al adyuvante comercial ( $p < 0,001$ ). A su vez, ISPA YOLK-PL presentó mayores niveles de anticuerpos que ISPA original luego de la primera y segunda dosis ( $p < 0,05$ ). La respuesta DTH de ISPA YOLK fue altamente significativa en relación al grupo control y Alhydrogel™ ( $p < 0,001$ ).

En el Capítulo 3 se evaluaron diferentes estrategias para mejorar los adyuvantes ISPA. En primer lugar se ensayó complementar las partículas tipo jaula con otros inmunopotenciadores que actúen por diferentes modos de acción que las mismas. Con ese criterio se seleccionaron los candidatos rapamicina, c-di-AMPC y un antagonista de CCR4 que han sido descritos por su importante capacidad para aumentar la respuesta inmune pero que lo hacen por vías diferentes a

ISPA. Dichas moléculas se combinaron con el adyuvante ISPA y OVA como antígeno modelo en la formulación utilizada para la inmunización. En este estudio se evaluaron cuatro formulaciones alternativas inmunizando ratones: i) ISPA con dosis bajas de rapamicina ii) ISPA con dosis altas de rapamicina iii) ISPA con c-di-AMPc y iiiii) ISPA con antagonista CCR4. Además, se trató a un grupo de ratones con PBS con ova y sin ISPA como grupo CONTROL. Se realizaron 2 experimentos independientes y se analizó la respuesta humoral y DTH de los animales a los 45, 75 y 175 días post inmunización en el primer ensayo y a los 45 y 75 en el segundo ensayo. Las respuestas humorales obtenidas con las diferentes formulaciones fueron similares a lo largo del tiempo, aunque al analizar la sumatoria de todas las respuestas en el curso de la inmunización calculado el área de respuesta bajo la curva (AUC), en los dos ensayos la formulación suplementada con rapamicina en baja concentración presenta un mayor valor (aunque no significativo) que la obtenida con ISPA no combinado y en el segundo ensayo esto se observó para el agregado de c-di-AMPc siendo la diferencia muy significativa a los 45 DPI. En todos los grupos se encontró una alta respuesta de DTH, que no disminuyó con el tiempo. A los 45 días DPI (después de la primera inmunización), la DTH fue mayor para ISPA con dosis altas de rapamicina en comparación con ISPA-OVA sin suplementos ( $p < 0,05$ ). Estos resultados sugieren que tanto rapamicina como c-di-AMPc podrían ser candidatos potenciales para complementar al adyuvante ISPA. Finalmente, se determinó la capacidad de generar linfocitos activados a los 75 y 165 DPI para las formulaciones usando solo ISPA, ISPA suplementado con dosis bajas y altas de rapamicina, ISPA suplementado con c-di-AMPc, así como ISPA con antagonista CCR4. Para ello se realizó un cultivo celular de células de bazo estimuladas con OVA y se midieron células activadas dentro de los Linfocitos T CD4 luego de 72 hs. Si bien los grupos inmunizados con OVA y suplementados con los adyuvantes ISPA-rapamicina en alta y baja concentración, así como ISPA-c-di-AMPc presentaron una tendencia a incrementar el porcentaje de linfocitos T CD4+ activados (CD4-CD44<sup>high</sup>) en el bazo estos ensayos deben ser repetidos ya que, en uno de los experimentos, el grupo control no inmunizado presentó la misma tendencia.

Como segundo enfoque para potenciar la respuesta inmunitaria, se utilizó una estrategia de derivatización química de las jaulas lipídicas para lograr una entrega conjunta del antígeno y el adyuvante al sistema inmune. Para ello, se derivatizaron nanopartículas ISPA original e ISPA YOLK para unir OVA a las mismas mediante un enlace químico. Se evaluó la respuesta humoral (IgG1 específica – IgG2a – IgG2b – IgG3) desarrollada por ratones inmunizados con las diferentes preparaciones, observándose que esta estrategia no incrementó la respuesta humoral en los ratones ( $p > 0,05$ ).

## ABSTRACT

Subunit vaccines are considered the safest platform when clinical trials have to be done. That is why these vaccines are the most chosen by laboratories producers that aims to achieve the approval of the regulatory agencies. However, as it has been widely described that isolated subunits molecules are poorly immunogenic, they have to be formulated with adjuvants. This has given rise to a growing interest from vaccine developers in having new adjuvant candidates that improve the currently available.

In a previous work performed in the Immunological Technology Laboratory of the FBCB-UNL, in which this thesis has been developed, an adjuvant formulation called ISPA (Immunostimulant Particle) based on cage-like nanoparticles was described. Although the adjuvant ISPA could be prepared by a simple and cheaper method than those previously described for the cage-like particles, its preparation requires commercial phospholipids, saponins and cholesterol that are expensive making unfeasible its use in veterinary vaccines. Therefore, in this thesis the objective was to obtain and evaluate stable cage-like particles, which could be prepared by a standardized and scalable economical method. For this aim we worked on: i) obtaining low-cost saponins and lipids and ii) determining their proportions and the method to be used to obtain cage-like particles with these new reagents (taking into account that the proportion of components necessary to form the particles depends simultaneously on the chemical nature of the reagents and the method used to obtain them). In addition, we aimed to obtain formulations of cage-like particles that present an enhanced activity in relation to original ISPA. The particles obtained with the different components and methods were functionally evaluated by formulating them with Ovalbumin (OVA), immunizing them in mice and then measuring the levels of specific anti-OVA type IgG1 and IgG2a antibodies in the sera of the animals as well as measuring delayed hypersensitivity response (DTH). The particles formulated alternatively with the different saponins and the lipids obtained in this work were compared in their immunological performance with the original ISPA adjuvant. The most promising formulation was also compared with Alhydrogel® (a commercial formulation based on aluminium hydroxide). The new formulations potentiated with immunostimulatory compounds were also compared with the original ISPA and, in this case, the populations of activated lymphocytes 45 days DPI (days post immunization) were analysed to assess if the potentiation favours the persistence of the immune response over time. The results obtained in the thesis are described in four sections:

The general introduction analyses the value of using adjuvants in vaccines and the mechanisms by which they act based on the previous literature.

Chapter 1 presents the results corresponding to extraction of saponins from Kerry®

commercial unrefined extract of *Quillaja saponaria*. The obtention of an extract with low levels of impurities is described. The extract was obtained using dialysis and was characterized by TLC (thin layer chromatography), HPLC (high performance liquid chromatography) and MALDI-TOF (mass spectrometry technique based on desorption- matrix-assisted laser ionization coupled to a TOF or time-of-flight analyser). It is also reported that the immunological performance of the particles prepared with the new extract was similar to that of the original ISPA prepared with Quil-A®.

Chapter 2 describes the obtention of alternative lipids to those originally used. Alternative phospholipids to di-palmitoil-phosphatidylcholine (DPPC) used in the original formula as well as egg cholesterol (Cho) were obtained and tested. These new lipids corresponded to commercial phospholipids derived from soybeans (HSPC), lipids extracted from the soybean oil industry waste and a mixture of lipids obtained from chicken egg yolk by ethanolic extraction containing phospholipids and cholesterol. The obtained lipid extracts were characterized by TLC (thin layer chromatography) and GC (gas chromatography). Subsequently, the different lipids obtained were combined alternatively with commercial saponins such as Quil-A® or with the semi-refined saponins Kerry® using the ethanolic injection method (IA) or the liposomal precursor method (PL) to obtain different preparations of cage-like particles. According to the objective aimed in this chapter of achieving a low-cost adjuvant, the formulation that presented the most promising results corresponded to the particles formed with Kerry® saponins together with the lipids derived from egg yolk extract using the liposomal precursor method (ISPA YOLK - PL). This preparation allowed obtaining higher levels of IgG1 and IgG2a antibodies than the original formulation developed with commercial components ( $p < 0.05$ ). The antibody and DTH response of original ISPA and ISPA YOLK-PL adjuvants was also compared with Alhydrogel®. Both, original ISPA and ISPA YOLK-PL were found to outperform the commercial adjuvant Alhydrogel™ ( $p < 0.001$ ). In turn, ISPA YOLK - PL presented higher levels of antibodies than original ISPA after the first and second doses ( $p < 0.05$ ). The DTH response of ISPA YOLK was highly significant in relation to the control group and Alhydrogel™ ( $p < 0.001$ ).

In Chapter 3, different strategies to enhance ISPA adjuvants were assessed. Firstly, cage like particles was complemented with other immunopotentiators that showed to have different modes of action than ISPA. With this criterion we selected three candidates that have been described for their important ability to increase the immune response as rapamycin, c-di-AMP and CCR4 antagonist, which stimulates the immune system in a different way than ISPA. The different molecules were combined with the ISPA adjuvant and OVA as a model antigen in the formulation used for immunization. Four alternative formulations were evaluated in this study: i) ISPA with low-dose rapamycin ii) ISPA with high-dose rapamycin iii) ISPA with c-di-AMP

and iii) ISPA with CCR4 antagonist. Also, a group of mice were treated as previously described using OVA without ISPA. Two independent experiments were carried out and the humoral response and DTH of the animals were analyzed at 45, 75 and 175 days post immunization in the first assay and at 45 and 75 in the second assay. The humoral responses obtained with the different formulations were similar over time, although when analyzing the sum of all responses in the course of immunization (by calculating the area of response under the curve (AUC)), the formulation supplemented with low concentration of rapamycin presents a higher value (although non-significant) than that obtained with non-combined ISPA. The same result was obtained in second assays using the formulation with c-di-cAMP. Also, for this group at 45 DPI the levels of antibodies were higher than the obtained for the other formulation. A high DTH response, which did not decrease over time, was found in all groups. At 45 days DPI, DTH was higher for ISPA with high doses of rapamycin compared to ISPA-OVA without supplements ( $p < 0.05$ ). These results suggest that both rapamycin and c-di-AMPC would be potential candidates to complement the ISPA adjuvant. Finally, 75 and 165 DPI the ability to trigger activated lymphocytes was determined for the formulations using only ISPA, ISPA supplemented with low and high doses of rapamycin, ISPA supplemented with c-di-cAMP as well as ISPA with CCR4 antagonist. For this aim, activated CD4 T lymphocytes from different groups were measured in cultured spleen cells stimulated with OVA for 72 h. Although the groups immunized with OVA and supplemented with ISPA-Rapamycin adjuvants in high and low concentration, as well as ISPA-c-di-AMPC, showed a tendency to increase the percentage of activated CD4+ T lymphocytes (CD4-CD44<sup>high</sup>), this study should be repeated as non-immunized control group presented the same tendency.

As a second approach to enhance the immune response, a strategy of chemical derivatization of the lipid cages was used to achieve a joint delivery of the antigen and the adjuvant to the immune system. For this, original ISPA and ISPA YOLK nanoparticles were derivatized to bind OVA to them by means of a chemical bond. The humoral response (specific IgG1 – IgG2a – IgG2b – IgG3) developed by mice immunized with the different preparations was evaluated, finding that this strategy did not increase the humoral response in the mice ( $p > 0.05$ ).



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. EL ROL DE LOS ADYUVANTES EN LAS VACUNAS

Uno de los capítulos más destacados de la historia de la ciencia es el impacto de las vacunas en la longevidad y la salud humanas (S. Plotkin, 2014). Con la excepción del agua potable, ninguna otra modalidad, ni siquiera los antibióticos, ha tenido un efecto tan importante en la reducción de la mortalidad y el crecimiento de la población (S. L. Plotkin & Plotkin, 2013). Las vacunas han reducido significativamente la incidencia de varias enfermedades que afectan al hombre como la viruela, la difteria, la poliomielitis o el sarampión, en muchos países del mundo. La reducción de muchos de estos casos de enfermedades se ha logrado mediante la implementación de regímenes pediátricos de vacunación contra dichos patógenos. Son útiles dentro de la población en general para reducir la carga asociada con enfermedades causadas por patógenos como el virus de la influenza, el herpes zóster o el virus del papiloma humano, y actualmente están disponibles para brindar protección a las personas durante los viajes como por ejemplo las vacunas contra enfermedades como la fiebre amarilla (Hill et al., 2021). En el campo de la vacunología veterinaria han dado lugar a cambios significativos que han afectado el bienestar humano y animal, y la capacidad de convivencia. La virtual eliminación de la rabia canina en América del Norte y Europa occidental ha llevado indirectamente a un vínculo muy cercano entre humanos y animales que no era factible cuando la rabia canina era relativamente común. Sin embargo, quedan muchas enfermedades para las que no existe una vacuna eficaz o efectiva. Muchas enfermedades parasitarias, así como enfermedades de naturaleza intracelular crónica, no están cubiertas por ninguna vacuna disponible. En algunos casos, los perfiles de seguridad o las características de eficacia de las vacunas existentes no son aceptables. Afortunadamente, permanentemente se están desarrollando tecnologías prometedoras aplicables a todos los componentes que conforman las vacunas que pueden cerrar las brechas técnicas para la prevención de estas enfermedades desafiantes (McVey & Shi, 2010).

En líneas generales, los componentes de una vacuna son cuatro (Comité Asesor de Vacunas de la AEP, 2022): 1) El o los antígeno / s contra los cuales se montara una respuesta defensiva específica, 2) un conjunto de sustancias utilizadas como vehículo de vacuna o líquido de suspensión, comúnmente agua estéril para inyección o solución salina, 3) compuestos preservantes, estabilizantes y / o antibióticos, sustancias utilizadas para estabilizar los distintos componentes de la vacuna o para impedir la contaminación por otros microorganismos o la degradación de la misma y 4) los Adyuvantes, una serie de compuestos incorporados a las vacunas para aumentar la inmunogenicidad de los antígenos o prolongar su efecto estimulador, haciendo posible la disminución de la cantidad del mismo o del número de inyecciones de la serie vacunal. Mediante la interacción de estos componentes, las vacunas protegen presentando antígenos no propios en el contexto inmunológico correcto, para expandir la cantidad de células

T y B vírgenes específicas contra dichos antígenos y generar luego una subpoblación de células de memoria. Las poblaciones de memoria expandidas permiten así un despliegue más rápido de efectores adaptativos en futuros contactos con el patógeno (Ward et al., 2022). El tipo y composición de los componentes mencionados presentes en las vacunas depende del tipo de vacuna que se desea formular. En particular la utilización o no de adyuvantes está ligada al tipo de plataforma de vacuna que se utiliza.

Las primeras vacunas desarrolladas por Jenner y Pasteur fueron las vacunas vivas atenuadas y muertas. Luego, el desarrollo de nuevos métodos microbiológicos, genéticos, químicos, bioinformáticos así como de todas las áreas de las ciencias biológicas, ha llevado a disponer de nuevas plataformas vacunales y a complejizar la clasificación de posibles vacunas (Canouï & Launay, 2019). Existen según la bibliografía distintas clasificaciones de las mismas, sin embargo, en revisiones recientes (Canouï & Launay, 2019; V. Schijns et al., 2021) se las puede diferenciar entre: Vacunas vivas atenuadas, vacunas muertas o inactivadas (de células enteras y de subunidades), vacunas de ARN, de ADN, de vectores virales recombinantes o de vectores bacterianos recombinantes. Las vacunas vivas atenuadas, se caracterizan porque contienen al agente infeccioso que conservan la capacidad de proliferar, pero el mismo presenta una baja virulencia. Inducen así una forma atenuada, incluso asintomática, de la enfermedad, estimulando todo el repertorio de la respuesta inmune. La propiedad principal es una inmunogenicidad muy alta (protección inmunológica cercana a la que sigue a la infección natural), obtenida rápidamente (dentro de 10 a 14 días) pero exponiendo al riesgo de enfermedad vacunal. Existen varios métodos de preparación y por lo tanto de composición de este tipo de vacuna, sin embargo, al tratarse de una vacuna viva, la respuesta inmunitaria inducida es completa (inmunidad innata y adaptativa). Por lo tanto, este tipo de vacuna no requiere adyuvante (es auto adyuvante) y requiere un número reducido de dosis. Las vacunas muertas o inactivadas, en cambio, están desprovistas de poder infeccioso. Incluyen las vacunas de patógenos enteros, patógenos lisados y de subunidades que corresponden a fracciones de patógenos o a moléculas purificadas de los mismos. Estas fracciones están conformadas habitualmente por moléculas determinantes de virulencia del patógeno, las cuales permiten inducir la inmunidad vacunal. Estas vacunas presentan menor reactogenicidad pero también menor inmunogenicidad por lo que en general requieren de la adición de un adyuvante y de la aplicación de varias dosis, e incluso, refuerzos de por vida. Las vacunas de ARN, basadas en ARNm transcrito in vitro tienen el potencial de expresar transitoriamente la proteína codificada in situ. Para traducirse y provocar una respuesta inmunitaria específica de antígeno, una vacuna de ARNm tiene que llegar al citosol de sus células diana. Existen dos enfoques básicos para la administración de vacunas de ARNm: 1) carga de ARNm en células dendríticas ex vivo, seguida de reinfusión de las DC transfectadas, o 2) inyección directa de ARNm con o sin

portador en las células objetivo. Los transportadores más comunes utilizados para complejar el ARNm son la protamina (un péptido catiónico), los lípidos o las nanopartículas basadas en polímeros. En cambio, una vacuna de ADN, comprende el ADN que codifica los antígenos de la vacuna. Después de la administración del ADN al huésped, se producen antígenos in vivo, desencadenando de esta forma la respuesta inmunitaria. A diferencia de una vacuna de ARN, la expresión de proteínas mediante una vacuna de ADN requiere que el ácido nucleico atraviese dos membranas celulares, el plasma y la membrana nuclear. Por lo tanto, la transfección exitosa es crucial para la eficacia de la vacuna de ADN. Con esta finalidad, se han desarrollado varios métodos de administración, incluida la pistola de genes, la inyección a chorro, electroporación in vivo, pero también diferentes formulaciones de ADN, por ejemplo, encapsulación en nanopartículas lipídicas, adsorción a polímeros y adsorción o encapsulación en nanopartículas biodegradables. Los virus, por su parte, han demostrado ser vehículos muy eficaces para introducir ácidos nucleicos extraños en las células diana. Además, los virus son detectados por varios receptores tipo PRRs (del inglés *Pattern-recognition receptors*) intracelulares y extracelulares e inducen intrínsecamente respuestas inmunitarias del huésped tras la infección celular. Una vez en la célula, los vectores virales imitan la infección viral natural, induciendo así potentes respuestas inmunitarias. Por lo tanto, las vacunas basadas en vectores virales pueden administrarse sin adyuvantes adicionales ya que promueven fuertes respuestas inmunes humorales y celulares específicas de antígeno contra el antígeno objetivo. De forma alternativa, pueden mencionarse en el marco de una plataforma vacunal de tipo viral, a las VLP (partículas similares a virus). Estas partículas son complejos de proteínas multiméricas que imitan la organización de los virus nativos pero carecen del genoma viral. Por lo tanto, las VLP constituyen un enfoque seguro y eficaz para la inducción de anticuerpos neutralizantes contra proteínas de superficie (Reina, 2012). En lo que respecta a las bacterias vivas atenuadas modificadas genéticamente, actualmente no se utilizan de forma amplia como vacunas para humanos, aunque este enfoque se ha investigado especialmente en el caso de la vacuna BCG contra la tuberculosis (Zheng et al., 2015).

Las proteínas recombinantes son antígenos altamente purificados que requieren solo una parte del patógeno para generar una respuesta inmunitaria protectora. Estos antígenos han mejorado el desarrollo de las vacunas, ya que demostraron ser seguros por no presentar riesgo de reversión a una forma virulenta y por poderse fabricar y caracterizar en forma muy estandarizada. Sin embargo, estos antígenos muestran una potencia inmunogénica baja debido a que presentan una menor cantidad de PAMPs (del inglés *pathogen-associated molecular pattern*) en comparación con las vacunas inactivadas completas o atenuadas convencionales (Coffman et al., 2010). Por otra parte, muchas de las vacunas mencionadas dentro de la clasificación, incluso las de ADN y VLP (partículas similares a virus) requieren el uso de

adyuvante para mejorar su desempeño (Fontana et al., 2020; Ghaffarifar, 2018; Karlsson et al., 2017). Este inconveniente, ha hecho necesario el uso de adyuvantes en este tipo de vacunas.

El término adyuvante proviene del latín “adjuvare”, que significa ayudar. Los adyuvantes pueden ser definidos como sustancias que aumentan o modulan la inmunogenicidad de una vacuna cuando son agregados a una formulación (Apostólico et al., 2016). Pueden ser incorporados para aumentar la inmunogenicidad de los antígenos, usar menores dosis de vacuna, aumentar la estabilidad de las vacunas al hacerlas menos susceptibles a la degradación durante el almacenamiento o la inyección. También influyen en el inicio, la fuerza y la duración de las respuestas inmunes. Puede decirse que actúan de varias formas, entre sus mecanismos de acción se encuentran la formación de depósito, el reclutamiento de células inmunitarias, la activación del inflammasoma, la mejora de la presentación de antígenos por las moléculas del MHC y la inmunomodulación (Bastola et al., 2017). De esta manera, actúan mediante la activación del sistema inmune innato y proporcionan señales clave que modulan la respuesta inmune adaptativa. La primera observación registrada de potenciación inmunológica por "adyuvantes" es probablemente la de Coley, quien en 1893 observó que la administración de bacterias muertas (toxinas de Coley) podría en algunos casos curar ciertas formas de cáncer. Fue solo en la década de 1990 que se determinó que este efecto se debía a la estimulación inmunológica mediada por el ADN bacteriano. A partir de ahí, se descubrieron las secuencias de oligonucleótidos específicas que podrían estimular la respuesta inmune y potenciarla ante un antígeno coadministrado (Garçon et al., 2013). A pesar de la descripción de Coley, debieron transcurrir otras dos décadas para reconocer la utilidad de los adyuvantes para mejorar la inmunidad humoral. Fue hacia 1925, cuando el veterinario francés, Gastón Ramón, observó que caballos inmunizados con toxina diftérica que presentaban inflamación en el sitio de la infección respondían con mayores niveles de anticuerpos que los no la presentaban. Por tanto, ensayó producir la inflamación por la adición de diferentes sustancias, como cloruro de calcio, saponinas, almidón, aceite vegetal y bacterias a la vacuna “anatoxina diftérica”. Observando los resultados, concluyó que con la adición de estos compuestos lograba promover una reacción inflamatoria en el sitio de inoculación que era la responsable de la producción mejorada de anticuerpos contra la toxina. Desde entonces, los adyuvantes juegan un papel muy importante en la tecnología de vacunas tanto para animales como para humanos (Burakova et al., 2018). A lo largo de los años se han identificado y / o sintetizado innumerables nuevas moléculas que exhiben potentes propiedades inmunoestimuladoras con efectos adversos mínimos (Bonam et al., 2017). Estos desarrollos se han intensificado en las últimas décadas debido a que la comunidad científica ha adquirido una mejor comprensión de cómo funcionan y a que se han descrito los beneficios de usar múltiples adyuvantes, como así también sus combinaciones, que derivan en efectos aditivos o sinérgicos de sus diferentes mecanismos de acción (Burakova

et al., 2018). Para entender el rol de estos componentes, es necesario conocer cómo se monta una respuesta inmune que protege contra los agentes patógenos ya que la vacuna emula los eventos que tienen lugar en un proceso infeccioso y genera memoria inmunológica que permite la protección a largo plazo. Se describen a continuación las etapas que son críticas para el armado de la respuesta inmune que genera una vacuna.

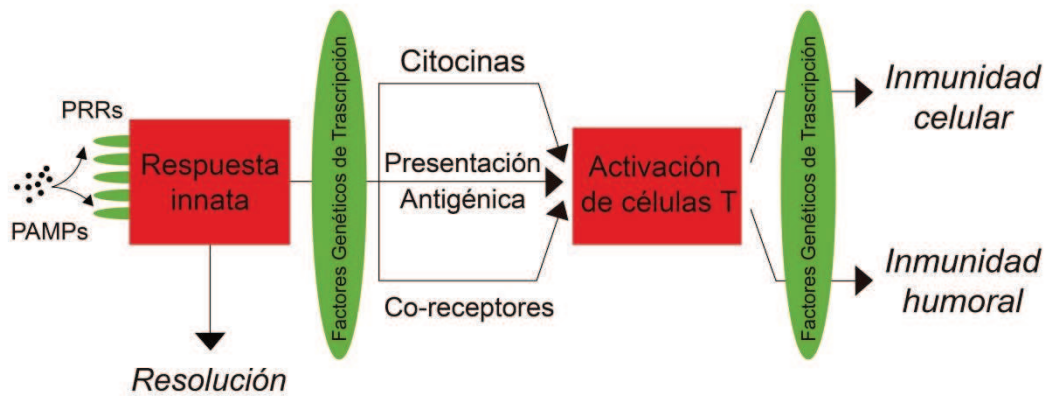
### **1.1.1. El reconocimiento del patógeno y la activación de la respuesta inmune**

Tras la inmunización, tiene lugar la activación del sistema inmune. El mismo se activa en un primer momento en forma innata para desencadenar luego una respuesta adaptativa (ver figura 1).

El sistema inmune innato de, respuesta rápida (horas), actúa como la primera línea de defensa dirigido a un número limitado de moléculas de patógenos o células anómalas denominados PAMP. Estas son moléculas compartidas por grupos de microbios relacionados que son esenciales para la supervivencia de esos organismos y no están presentes en células de mamíferos (Stern, 2020). El sistema del complemento y las células fagocíticas están involucradas en este tipo de inmunidad (Pashine et al., 2005). El sistema del complemento tiene tres actividades fisiológicas generales, la defensa contra la infección bacteriana piógena, actuar como puente entre la inmunidad innata y adaptativa, y eliminar inmunocomplejos y los productos de lesión inflamatoria (Walport, 2001). Además, dentro del conjunto de células que participan en la respuesta inmunitaria innata, se encuentran también las células asesinas naturales (NK *del inglés natural-killer*), miembros de la familia de células linfoides innatas que actúan como potentes efectoras que forman la primera línea de defensa contra enfermedades, incluidas las neoplasias malignas. El ataque citotóxico de las células NK es inmediato, no requiere preparación antigénica previa (Becker et al., 2016). Las respuestas inducidas a partir de la estimulación del sistema inmune innato disminuyen rápidamente. Esto se produce como resultado de múltiples mecanismos de regulación por retroalimentación que tienen como objetivo limitar el daño tisular que puede resultar de estos potentes mecanismos efectoras. A diferencia de las respuestas de las células T y B, las respuestas innatas normalmente no conducen a la memoria específica del patógeno, lo que significa que un encuentro posterior con un antígeno no produce una respuesta más rápida o más intensa que la inicial (Coffman et al., 2010).

El sistema inmune adaptativo, en cambio, actúa lentamente (días) y proporciona respuestas inmunes duraderas y memoria inmunológica contra patógenos específicos. Las respuestas inmunes adaptativas se inician a través de la estimulación mediada por antígeno de Linfocitos T que median una respuesta celular y/o Linfocitos B, productores de anticuerpos (Bastola et al., 2017). Las principales poblaciones de Linfocitos T que intervienen en la

respuesta adaptativa son los Linfocitos Th (T colaboradores o *helper del inglés*, también llamadas T CD4+ porque poseen dicho correceptor en su membrana) y los LTc (T citotóxicos, también llamados T CD8+ porque poseen dicho correceptor en su membrana). Los primeros tienen como rol principal dirigir la respuesta inmune activando a los macrófagos, LTc y otras células inmunes, mientras que los LTc son principalmente efectores y tienen como función eliminar a las células infectadas.



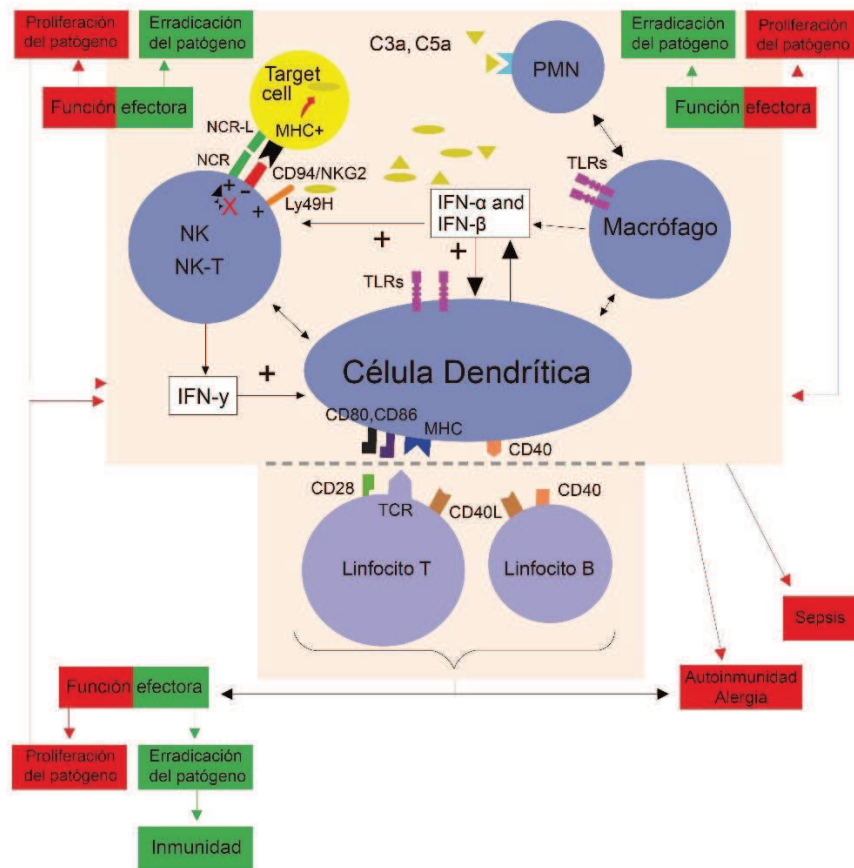
**Figura 1:** Representación esquemática de los niveles de regulación que afectan a las respuestas inmunitarias adquiridas. Como un telescopio, una lente compuesta de las respuestas innatas y los factores genéticos centran las respuestas inmunitarias adquiridas apropiadas en objetivos específicos de agentes infecciosos. Figura modificada de: Dempsey et al., 2003 (Dempsey et al., 2003).

Generar la respuesta inmune específica y adecuada para combatir al agente patógeno requiere de la participación de los sistemas inmunes innato y adaptativo de forma conjunta (ver figura 2). En este proceso, resultan de fundamental importancia las células dendríticas (CD). Estas son células presentadoras de antígenos profesionales (CPA) que decodifican e integran señales obtenidas del sistema inmune innato, y transfieren esta información a las células inmunes adaptativas, es decir, las células T y B (Banchereau et al., 2009). (A las CD se les llama CPA profesionales ya que si bien otras células como macrófagos y linfocitos B son capaces de presentar el antígeno, las mismas no montan una respuesta inmune completa como las CPA sino que lo hacen en el contexto de la respuesta efectora). Las CD son una población heterogénea de leucocitos que se originan a partir de células madre hematopoyéticas. Actúan como enlace entre la inmunidad innata y la adaptativa y desempeñan un papel crítico en la iniciación y regulación de la respuesta inmunitaria específica de antígeno (Balan et al., 2019). Las CDs inmaduras residen en la periferia donde sirven de centinelas. Capturan antígenos constantemente por diferentes vías como pinocitosis y / o fagocitosis mediante el reconocimiento de motivos conservados a través de receptores específicos. La activación de estos receptores resulta fundamental para la activación de la CD y el inicio de la respuesta inmune. Este proceso de activación se produce cuando los PAMP son identificados mediante

PRRs (del inglés *pathogen-recognition receptor*), especialmente los TLR (del inglés *Toll like-receptors*), ubicados en la membrana celular o en los endosomas o los NLR (del inglés *NOD-like receptors*), ubicados en el citosol de las CPAs (Batista Duharte et al., 2016; Batista-Duharte et al., 2014). Además, la activación puede desencadenarse por un conjunto de moléculas endógenas conocidas como DAMP (del inglés *danger-associated molecular pattern*) que son capaces de interactuar con los TLR o con los NLR al igual que los PAMP (Batista Duharte et al., 2016; Batista-Duharte et al., 2014). Los DAMP son moléculas únicas que se muestran en células estresadas, lesionadas, infectadas o transformadas, que también pueden reconocerse como parte de la inmunidad innata. Algunos ejemplos de DAMPS conocidos incluyen, entre otros, proteínas de choque térmico y fosfolípidos de membrana (Stern, 2020). Posteriormente a la estimulación de los PRRs se pone en marcha, como parte de la respuesta inmune innata, una cadena de señalización intracelular en la CD que termina en la liberación de mediadores solubles, como citoquinas y quimiocinas inflamatorias. En forma concomitante, los antígenos endocitados, son procesados y presentados en las moléculas de histocompatibilidad de tipo I (MHC-I) y/o tipo II (MHC-II) por la CPA (Coria, 2014). Los péptidos antigénicos de origen exógeno, son “cargados” en moléculas de MHC de clase II y así, son capaces de activar las células Th y provocar la estimulación de la inmunidad humoral y/o celular con respuestas efectoras que dependen de células B para la producción de anticuerpos y de LTc así como de otras células del sistema inmune para la respuesta celular. En cambio, los péptidos antigénicos de origen endógeno, se asocian con moléculas de MHC de clase I y pueden estimular directamente los LTc que conducen a respuestas de tipo celular (Bastola et al., 2017; Karch & Burkhard, 2016; Stern, 2020). La presentación mediante moléculas MHC-I es activa en todos los tipos celulares de organismos, constituyendo un mecanismo para monitorear la expresión de proteínas intracelulares. Así los LTc vigilan el proteoma celular y poseen la habilidad de destruir aquellas células que expresen proteínas virales o tumorales. La vía de presentación mediante moléculas MHC-II, en cambio, es solo constitutivamente activa en las CPAs y en las células epiteliales tímicas (Coria, 2014). Alternativamente, un proceso denominado presentación cruzada, permite a las CDs (y específicamente a las que poseen en su superficie moléculas CD8+) la presentación de antígenos exógenos por la vía del MHC-I promoviendo una respuesta de LTc. Se han descrito al menos dos vías principales para la presentación cruzada: la vía citosólica, en la que se produce el procesamiento del antígeno en el citosol, y la vía vacuolar, en la que el procesamiento del antígeno se produce dentro de los compartimentos endocíticos (Gros & Amigorena, 2019; Joffre et al., 2012; Lindembergh & Stoorvogel, 2018). Este encuentro de la CD residente con el PAMP de un patógeno, o con un adyuvante empleado en vacunas, da inicio a un proceso de maduración de la CD que induce su migración hacia los ganglios linfáticos; donde presentará los antígenos captados a células T y B (Coria, 2014). El



reconocimiento del péptido presentado en el MHC-I y II por parte de los LT ha sido denominado por muchos autores como la señal 1 de activación de los linfocitos. Durante la activación y migración de la CD esta aumenta la expresión en membrana de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CD40) y de moléculas MHC-II que le permiten interactuar con las células T CD4+ y T CD8+ vírgenes induciendo su activación. La interacción entre las moléculas coestimuladoras y sus ligandos constituye la llamada Señal 2 de activación de los linfocitos T (Batista Duharte et al., 2016; Batista-Duharte et al., 2014) .



**Figura 2:** La interfaz entre la inmunidad innata y adaptativa y las consecuencias del éxito o fracaso. Para la eliminación exitosa de los agentes patógenos es esencial el reconocimiento temprano de los microbios por parte de los componentes del sistema inmunitario innato. Estos involucran el sistema del complemento, receptores especializados expresados en células NK y la familia de TLR y otros receptores de patrones que se expresan en células mieloides y linfoides y que reconocen estructuras moleculares específicas derivadas de microbios. El compromiso exitoso de algunas de estas vías conduce a una respuesta inflamatoria con destrucción del patógeno junto con el alistamiento de CD y las interacciones de células T y/o células B. Una respuesta inmune innata y adaptativa bien orquestada conducirá a la erradicación de patógenos y la inmunidad del huésped. El hecho de no discriminar de manera eficiente lo propio de lo ajeno en la inmunidad innata y adaptativa puede conducir a la proliferación de patógenos y, en última instancia, a la sepsis y también puede ser la causa del desarrollo y mantenimiento de enfermedades autoinmunes y alergias. CD40L, ligando de CD40; IFN, interferón; MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; PMN, células polimorfonucleares; TCR, receptor de células T; NCR, receptor de citotoxicidad natural; NCR-L, ligando-receptor de citotoxicidad natural. Figura modificada de: Hoebe et al., 2004. (Hoebe et al., 2004).

La estimulación de la célula presentadora es fundamental para una apropiada inducción de respuestas celulares que involucran a las células T y B. La ausencia de la señal 2 de estimulación en la CPA puede llevar a la tolerancia inmunológica o la anergia. Las CD<sub>s</sub> son las únicas CPAs capaces de activar a las células T vírgenes e iniciar su activación (Coria, 2014), polarizando la respuesta inmune hacia un patrón de respuesta específico que se caracteriza por el perfil de citocinas que cada uno de ellos libera (ver figura 3). Esta polarización está condicionada por numerosos factores como el tipo de antígeno, la vía de inoculación y especialmente el adyuvante empleado (Batista-Duarte et al., 2014).

### **1.1.2. Los perfiles de la respuesta inmune adaptativa**

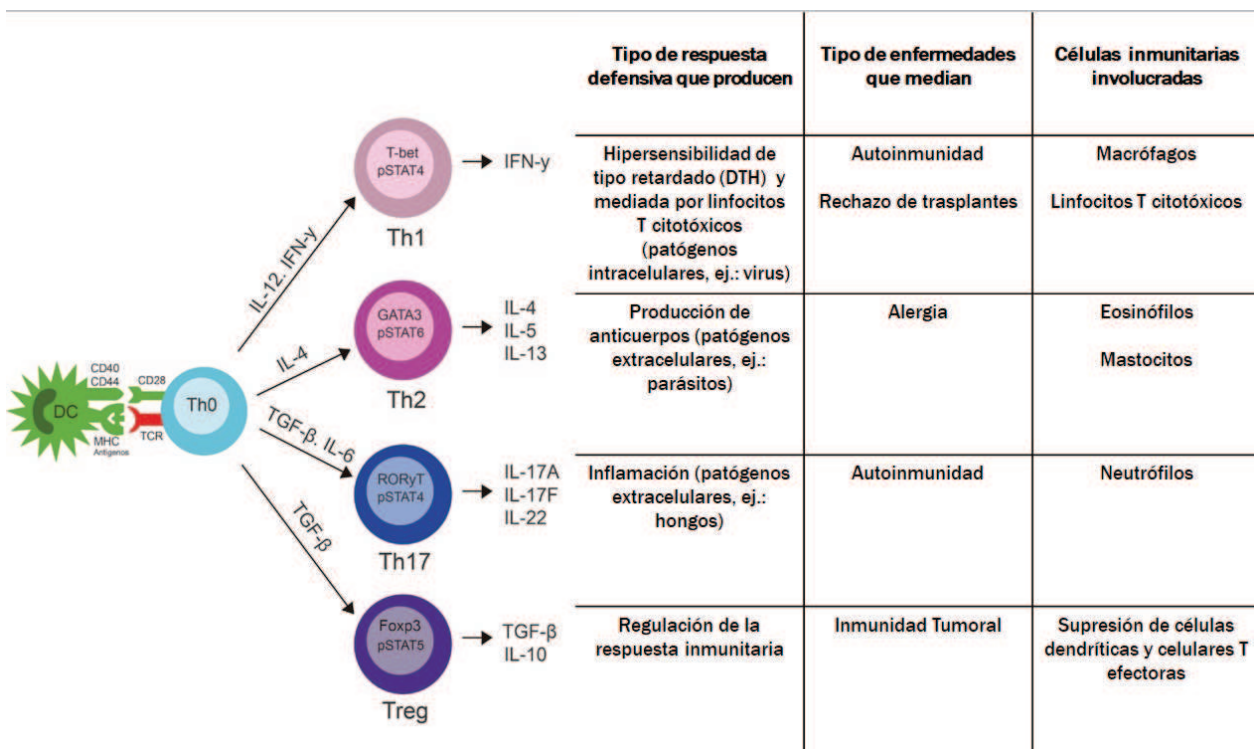
Inicialmente se describieron dos patrones T helper, Th1 y Th2, que definía dos perfiles de células Th basada en la secreción de IFN- $\gamma$  (Th1) e IL-4 (Th2) (Mosmann et al., 1986).

Las respuestas inmunes de tipo Th1 están principalmente mediadas por células T que secretan IFN- $\gamma$ , siendo una de las acciones más importantes de dicha citoquina la activación de los macrófagos para eliminar patógenos fagocitados (Pulendran & Ahmed, 2011) (ver figura 3). Además, las células Th1, mediante la secreción de IL2 e IFN- $\gamma$  junto con las moléculas coestimuladoras favorecen respuestas inmunes celulares del tipo LTCs y la generación de anticuerpos de tipo IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3 en ratones (Coria, 2014).

La respuesta de tipo Th2 se caracteriza por la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13 y la inducción de anticuerpos IgG de isotipo IgG1, IgE e IgA en ratones. Este tipo de células T promueven la producción, reclutamiento y activación de eosinófilos, la producción de anticuerpos y la activación de mastocitos (ver figura 3). Las células Th2 son importantes para la eliminación de parásitos extracelulares, esencialmente helmintos pero también son responsables de reacciones alérgicas y una modulación regulatoria de la respuesta inmune (Coria, 2014; Raphael et al., 2015; Wang et al., 2020).

Más recientemente, datos experimentales mostraron que este modelo, basado en 2 tipos de células Th era insuficiente para explicar los múltiples aspectos de la iniciación, regulación y coordinación de las respuestas inmunes (ver figura 3). Por lo tanto, se han caracterizado nuevos perfiles de células Th que han sido designados como: Th17, Th9 y Th22 de acuerdo a su secreción de citoquinas reguladas por factores maestros de transcripción (Coria, 2014; Raphael et al., 2015; Wang et al., 2020). Las células Th17 inducen el reclutamiento y activación de neutrófilos y son importantes para la protección contra varios patógenos extracelulares (Wang et al., 2020). Las células Th22 se encuentran en la piel y parecen participar en la inmunidad antibacteriana y antifúngica mientras que las células Th9 podrían participar de la inmunidad frente a los parásitos helmintos y también en el desarrollo del asma (Coria, 2014; Raphael et al., 2015). Adicionalmente, se describieron las células Th<sub>f</sub> (Th foliculares que anteriormente eran

confundidas con células Th2) especializadas en proporcionar ayuda a las células B y mediar el desarrollo de la inmunidad humoral de larga duración (Song & Craft, 2019; Wang et al., 2020). Finalmente, se han caracterizado diversas poblaciones de células T con capacidad de suprimir respuestas inmunes. Hasta la fecha, las células T regulatorias Foxp3+ (Treg) son las mejor caracterizadas, tanto en humano como en ratón. Las mismas desempeñan un papel regulatorio, estableciendo un balance entre la respuesta inflamatoria necesaria para la activación de las células inmunes y la prevención del daño tisular asociado con reacciones exacerbadas (Akkaya et al., 2019; Bayry, 2014a; Shevach, 2018; Wang et al., 2020).



**Figura 3:** Subconjuntos de Th CD4 +. Las células Th se clasifican en función de sus perfiles de citoquinas como: Th1, Th2, Th17, Treg entre otras. Las células Th vírgenes (TH0) se diferencian en varios subconjuntos en función de las condiciones estimulantes que influyen en la expresión del factor de transcripción. Una vez diferenciado, el patrón de citoquinas que caracterizó al subconjunto individual dicta sus funciones efectoras.

Figura modificada de: Reyes & Saban, 2014 (Reyes & Saban, 2014).

De acuerdo a lo mencionado, mediante la vacunación se logra la estimulación de distintos efectores del sistema inmunitario tanto innato como adaptativo. A través de las inmunizaciones se busca lograr una memoria inmunitaria protectora de larga duración que sea capaz de responder rápidamente a futuras infecciones induciendo una respuesta protectora del organismo que enfrente a un patógeno en una forma rápida, controlada y poco agresiva. La protección a largo plazo está asegurada por el mantenimiento de células efectoras específicas de antígeno y/o por la inducción de células de memoria inmunitarias que pueden reactivarse rápidamente en efectores inmunitarios siempre que el organismo se enfrente de nuevo al mismo patógeno en el

futuro. Los efectores inmunitarios inducidos por vacunas son esencialmente anticuerpos específicos de antígeno producidos por células plasmáticas que son capaces de unirse específicamente a una toxina o un patógeno. Otros efectores son las células T CD8+ citotóxicas que pueden limitar la propagación de microorganismos infecciosos al matar las células infectadas o secretar citoquinas antivirales específicas. La generación y el mantenimiento de las respuestas de los linfocitos B y T CD8+ están respaldados por factores de crecimiento y señales proporcionadas por los linfocitos Th CD4+ (Zepp, 2016). A su vez, la magnitud, la calidad y la duración de las respuestas adaptativas están muy influenciadas por el brazo innato del sistema inmunológico, que como se mencionó anteriormente, se caracteriza por una especificidad limitada y la ausencia de memoria inmunológica. Lo importante de la respuesta innata en el montado de las respuestas inmunológicas que despiertan las vacunas es que la activación de los receptores innatos modula el “ambiente inmunogénico” en el que las células presentadoras de antígenos y las células T CD4+ imprimen la respuesta adaptativa (Castellino et al., 2009). A partir de lo expuesto, resulta de vital importancia, comprender el funcionamiento de diversas sustancias existentes o por desarrollarse, que sean capaces de modular de una manera óptima el proceso de estimulación del sistema inmune innato, para dar lugar a una alta población de células de memoria capaces de responder de forma eficiente a largo plazo.

## 1.2. EL USO DE ADYUVANTES EN EL DISEÑO DE VACUNAS

En base a los mecanismos antes mencionados que permiten el armado adecuado de una respuesta inmune protectora se desprende que los factores más importantes a tener en cuenta en el diseño de vacunas son: los antígenos capaces de participar en una respuesta protectora específica frente a un agente patógeno en particular, los sistemas y las vías de administración óptimos para inducir la respuesta deseada y los potenciadores inmunes (adyuvantes) adecuados para generar una respuesta eficaz (ver fig. 4) (Coria, 2014). Se describen a continuación las principales características que deben presentar dichos componentes.



**Figura 4:** Esquema representativo de los componentes más importantes en el diseño de vacunas y su interacción.

### 1.2.1. Diseño y Selección de antígenos

La selección del antígeno y su optimización son fundamentales en el diseño de vacunas. Durante mucho tiempo se seleccionaron antígenos en base a sus niveles de expresión, su capacidad de actuar como factores de virulencia y/o si se encuentran conservados en el microorganismo (Coria, 2014). En los últimos años, los avances desarrollados se han caracterizado por un impresionante progreso en los campos de la inmunología y la biología de los microorganismos patógenos. Sobre la base del conocimiento mejorado de los principios de las interacciones huésped-patógeno, la respuesta inmunitaria del huésped actual puede analizarse para identificar las estructuras antigénicas individuales que son más relevantes para iniciar la inmunidad protectora. Luego los antígenos apropiados pueden aislarse como

subcomponentes de patógenos y posteriormente producirse en grandes cantidades ya sea por purificación o por construcción *in vitro* utilizando tecnologías genéticas moleculares (Zepp, 2016). Por lo tanto, existen actualmente las condiciones para seleccionar y obtener antígenos en forma racional, para poder elegir de forma idónea aquellas fracciones capaces de inducir una respuesta óptima del sistema inmune. Es decir, si los datos inmunológicos indican que una enfermedad puede prevenirse mediante una respuesta de anticuerpos, es importante seleccionar un antígeno inductor de anticuerpos adecuado. La inducción de respuestas robustas de anticuerpos mediante vacunas requiere la inclusión de epítomos antigénicos relevantes para las células B, así como epítomos peptídicos de las células T para provocar la activación adecuada de las células Th y su colaboración a las células B. Por el contrario, si la respuesta humoral no es suficiente o adecuada para combatir la infección, se necesitará de una respuesta celular. Sin embargo, un desafío considerable en vacunología es el diseño de vacunas contra patógenos para los cuales las respuestas inmunitarias de anticuerpos no son protectoras. Para desarrollar vacunas de células T, es importante tener un antígeno que provoque respuestas inmunitarias celulares potentes, así como una metodología sencilla para probar la validación del diseño de la vacuna *in vivo* e *in vitro*. En este sentido, los enfoques proteómicos con factores de virulencia de patógenos que inducen potentes respuestas de células T CD4+ y CD8+ son métodos valiosos para diseñar vacunas utilizando enfoques de vacunología inversa (Schijns et al., 2021).

### **1.2.2. Estrategias de entrega y vías de administración**

La vía de administración, las dosis y la estrategia de entrega (*delivery*) se engloban dentro del sistema de administración. Las estrategias de entrega pueden favorecer que los antígenos sean eficientemente transportados a los sitios inductivos y presentados luego de su administración. Un inconveniente que permiten superar estas estrategias es, por ejemplo, evitar una rápida degradación del antígeno que puede resultar en una respuesta débil o ausente contra el mismo. Para superar esta deficiencia se han estudiado distintas plataformas que mejoran la llegada del antígeno a la CPA, como ser, el uso de vectores virales recombinantes que pueden infectar directamente a las CPAs, o bien el transporte de antígenos acoplados con anticuerpos específicos contra moléculas de la membrana, lo cual induce la captura y activación de células B y T (Coria, 2014). Los adyuvantes, como se detalla en el apartado siguiente, se pueden clasificar de una forma amplia, una de estas clasificaciones incluye a los sistemas de administración. La función de los sistemas de *delivery* es entregar de manera efectiva los componentes de la vacuna a la CPA diana y por lo tanto aumentan la cantidad de antígeno que llega a las células o tejidos responsables de la inducción de respuestas inmunitarias. Los sistemas de entrega a menudo son particulados e imitan la naturaleza de los microorganismos en términos de tamaño y forma, lo que da como resultado un sistema de entrega con dimensiones similares a las de los patógenos,

lo que facilita la captación por la CPA. La combinación de sistemas de administración e inmunopotenciadores tiene un gran potencial debido a la mejora concomitante de la administración de antígenos y la potente estimulación de la inmunidad innata (Kallerup & Foged, 2015). En relación a la ruta de administración de vacunas, esta es un área muy poco desarrollada en el ámbito científico. De hecho, los ensayos de vacunas carecen de una comparación estandarizada del sitio de inyección, la longitud de la aguja o las técnicas de inyección (Mohsen et al., 2020). Por otra parte, se han descrito rutas de administración aceptable o recomendada para adyuvantes de forma específica como así también los volúmenes de inyección máximos totales y en un solo sitio recomendado para diferentes vías de administración de adyuvantes. Estas recomendaciones generalmente se aplican a los adyuvantes de emulsión de agua en aceite, aunque tampoco se establece de forma sistemática (Stils, 2005).

### **1.2.3. Adyuvantes Inmunológicos**

En los últimos años, se han hecho muchos esfuerzos para investigar cómo y por qué funcionan los adyuvantes. Se ha demostrado que pueden modular el proceso de activación de la respuesta que se monta post-vacunación reorientando el perfil de células que serán activadas según sea necesario. Las sales minerales, las emulsiones, las micropartículas, las saponinas, las citoquinas, los componentes/productos microbianos y los liposomas se han evaluado con esta finalidad (Apostólico et al., 2016). El hecho de que solo unos pocos adyuvantes hayan sido aprobados para su uso en vacunas humanas hasta hace unos años puede atribuirse, al menos en parte, a la falta de conocimiento sobre el mecanismo de acción de los adyuvantes. Sin embargo, actualmente seis adyuvantes (Aluminio, AS04, MF59, AS03, AS01 y CpG ODN) están aprobados para uso en vacunas humanas (Sarkar et al., 2019). Esto fue posible porque la caracterización estructural de varios adyuvantes y la identificación de varios PRR y receptores de ligandos coestimuladores han permitido comprender mejor el modo de acción de los adyuvantes a nivel molecular. Comprender el modo de acción de los adyuvantes es fundamental para diseñar vacunas que provoquen un efector específico del patógeno y respuestas de memoria a largo plazo y para evaluar la seguridad del adyuvante en las etapas de desarrollo y regulación (Sarkar et al., 2019). Sin embargo, en el campo de la vacunología veterinaria, muchos de estos componentes implican un costo adicional al desarrollo de la vacuna que condiciona su uso independientemente de presentar buenos resultados a nivel inmunogénico. En los humanos, la salud y el bienestar del individuo son priorizados más allá de los costos, mientras que en las medidas de control de enfermedades para los animales de granja se busca la rentabilidad (Burakova et al., 2018). Sumado a esto, hay que destacar que hay menos recursos financieros disponibles para la investigación y el desarrollo de vacunas animales en comparación con las vacunas humanas (Brun, 2016). Además, en ambos casos, la transición de vacunas

experimentales exitosas a la producción y fabricación industrial puede convertirse en un cuello de botella en vacunología, ya que las vacunas deben cumplir varios requisitos importantes, entre ellos cuestiones ambientales y de seguridad, costos de fabricación y perspectivas de comercialización (Brun, 2016; Mao & Chao, 2019). No obstante, la investigación de vacunas en animales es un campo de estudios muy atractivo con numerosas ventajas sobre el campo de la vacunología humana (Brun, 2016) dado que la tecnología de vacunas para ganado tiene menos restricciones regulatorias en comparación con el desarrollo de vacunas humanas. Por ejemplo, algunos compuestos están prohibidos para su uso en vacunas humanas (Quil-A®, emulsiones a base de aceite mineral), pero se emplean con éxito en vacunas animales (Burakova et al., 2018).

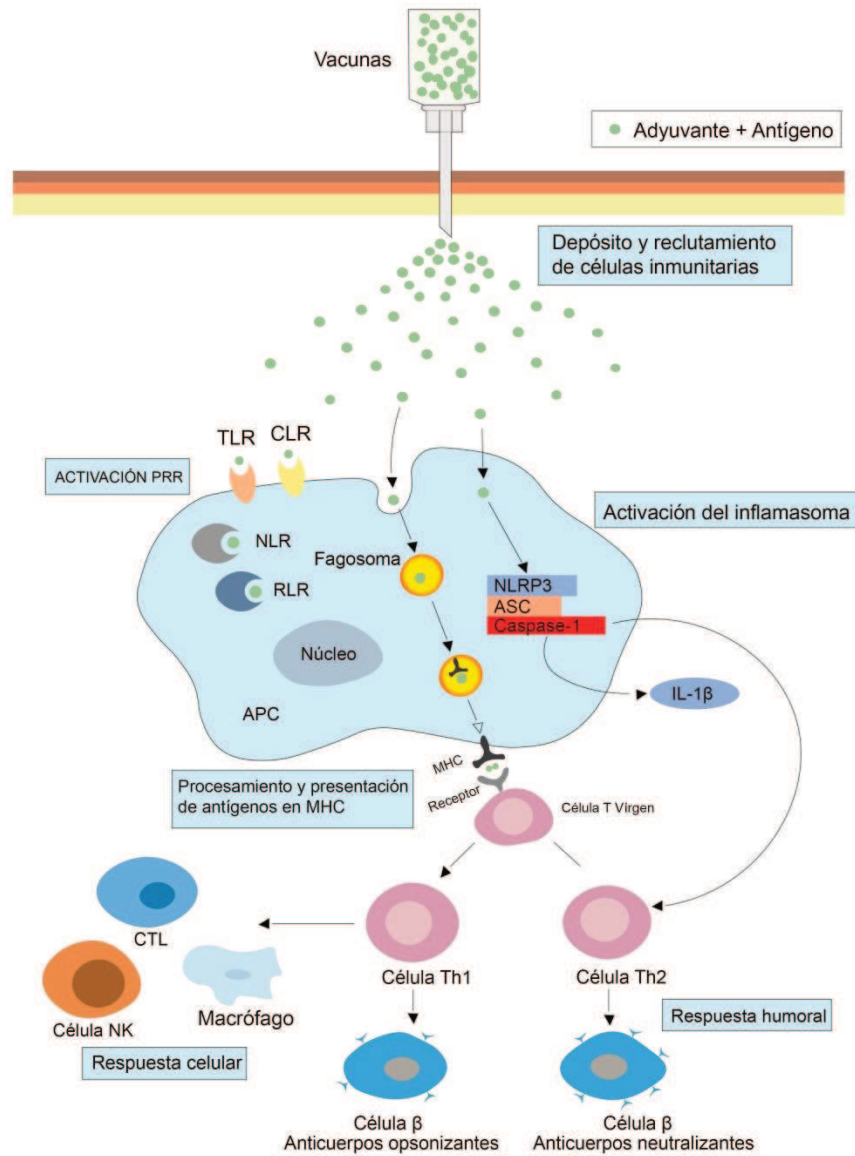
### **1.2.3.1. Clasificación de los adyuvantes**

Existen diversos criterios de clasificación dada la amplia variedad de sustancias capaces de comportarse como adyuvantes. Algunos autores por ejemplo los subdividen en tres categorías según su funcionalidad (V. E. J. C. Schijns, 2017) en: estimuladores de la señal 1 o Sistemas de entrega o delivery, estimuladores de la señal 2 o Co-estimuladores e Inmunopolarizantes (Th1/Th2), según el punto específico del proceso de activación de la respuesta inmune sobre el cual actúan. Sin embargo, los mecanismos de acción de algunos de ellos muchas veces convergen, por lo que este tipo de clasificaciones resultan confusas.

Entre estos posibles modos de acción encontramos por ejemplo a los adyuvantes que actúan mediante sistemas de administración en las vacunas de subunidades como los liposomas, los complejos inmunoestimulantes (ISCOM) y las nanopartículas, que evitan la degradación rápida de proteínas y péptidos in vivo, mejorando así la eficacia de la dosis del antígeno de la vacuna (Sarkar et al., 2019). Otro ejemplo, son los sistemas adyuvantes como AS04 de GlaxoSmithKline (GSK), compuesto por monofosforil lípido A (MPLA) adsorbido a una sal de aluminio. MPL® (nombre comercial de MPLA), es un componente purificado del lipopolisacárido R595 de *Salmonella minnesota*, un fuerte estimulador de los anticuerpos y la inmunidad celular que a menudo se conoce únicamente como un agonista de TLR4, pero también puede activar respuestas celulares independientes de TLR4 mediante autofagia, endocitosis, fagocitosis, reacciones oxidativas y generación de inflammasomas dependientes de caspasas. Por lo tanto, la adición de MPL® a la sal de aluminio en teoría podría introducir muchos mecanismos adicionales que mejoran los de las partículas de aluminio y los otros componentes para proporcionar efectos adyuvantes más potentes (Alving et al., 2014; Christensen, 2016). De esta forma, podemos ver, como el uso de diferentes moléculas con capacidad adyuvante puede inducir mecanismos de acción diferentes aunque sinérgicos, con la finalidad de la estimulación de la respuesta inmune (ver fig. 5). En este apartado, detallaremos



aquellos adyuvantes mejor caracterizados describiendo brevemente sus modos de acción conocidos a la fecha:

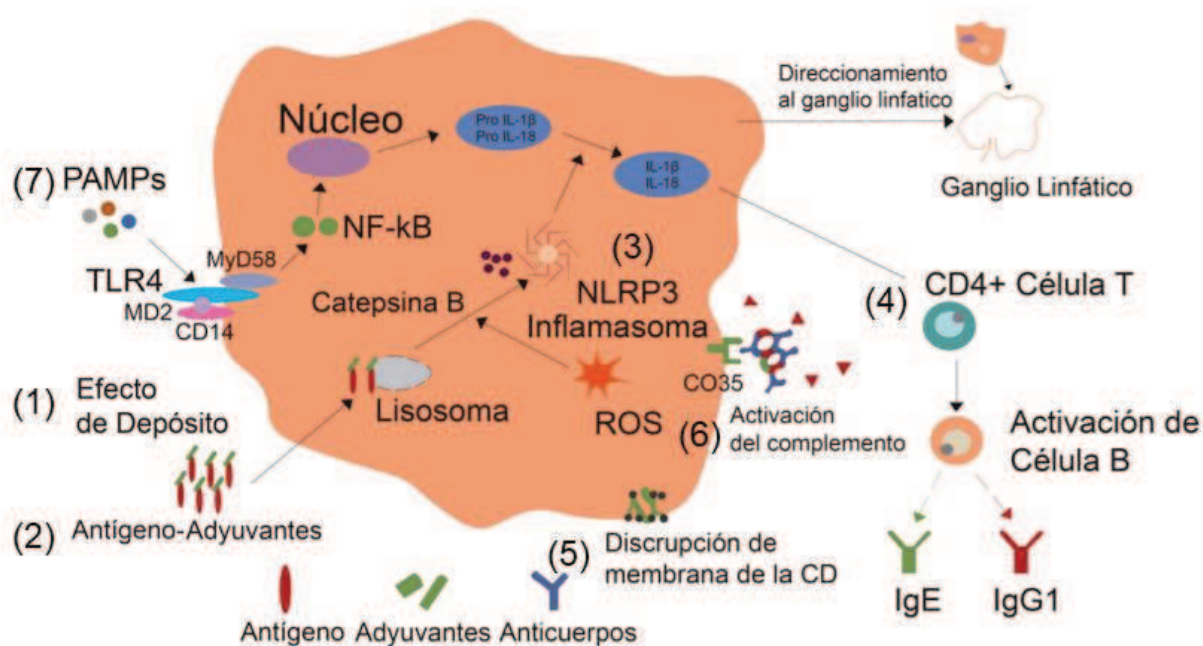


**Figura 5:** Modos de acción de los adyuvantes Los adyuvantes forman un depósito de antígenos y reclutan células inmunitarias en el lugar de la inyección. Pueden activar los PRR de las CPA reclutadas antes o durante la endocitosis de antígenos, después de lo cual los antígenos se procesan y se presentan a las células T, lo que da como resultado respuestas celulares y/o humorales (redibujado y modificado de InvivoGen 2011). (Bastola et al., 2017) (Bastola et al., 2017).

### 1.2.3.1.1. SALES MINERALES

Las sales de aluminio, también denominadas "alumbre", son las más utilizadas y abarcan el sulfato de aluminio y potasio, el hidróxido de aluminio, el fosfato de aluminio y el sulfato de hidroxifosfato de aluminio amorfo (Carter & Reed, 2010). Se han utilizado diferentes sales de

aluminio insolubles como adyuvantes de vacunas desde 1926 (Glenny et al., 1926). El sulfato de aluminio y potasio fue el primero que se utilizó. Sin embargo, debido a su escasa reproducibilidad, ha sido reemplazado casi por completo por el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio, ya que pueden prepararse de una manera más estandarizada y capturar antígenos por adsorción directa (Djurisic et al., 2018). Las sales de aluminio están presentes en al menos 146 vacunas autorizadas para prevenir enfermedades únicas o múltiples en diferentes países del mundo (Alving et al., 2014). Se utilizaron por primera vez como adyuvantes en vacunas humanas contra la difteria, la tos ferina y el tétanos. Ahora también se encuentran en las vacunas contra la hepatitis A y B, *Haemophilus influenzae* tipo B, neumococo y virus del papiloma humano (HPV) (Christensen, 2016). El aluminio se une a los antígenos con gran afinidad mediante adsorción por lo que originalmente se pensó que ejercía su función formando un depósito, lo que permitiría establecer una alta concentración de antígenos en el sitio de inyección y una continua desorción y dispersión de antígenos a partir de las partículas de aluminio. Informes recientes sugieren que el aluminio ejerce sus efectos adyuvantes al estimular las respuestas de tipo Th2 y la producción de anticuerpos a través de la activación de las células B. También activa el sistema del complemento lo que permite reclutar células inmunitarias en el lugar de la inyección (Djurisic et al., 2018). Además, se ha demostrado que las sales de aluminio son capaces de inducir la activación del inflammasoma NLRP3 y estimular la producción de IL-1b e IL-18, lo que puede explicar su capacidad para inducir la inflamación local, el reclutamiento de células presentadoras de antígenos y la maduración de células dendríticas, aumento de la captación de antígenos y estimulación y diferenciación de células T. Por otra parte, pueden mediar la activación de TLR4, cuando se usan de forma conjunta con otros adyuvantes como MPLA (MPL®), estrategia que ha sido utilizada por GSK para la formulación del adyuvante AS04 (ver figura 6) (Shi et al., 2019).



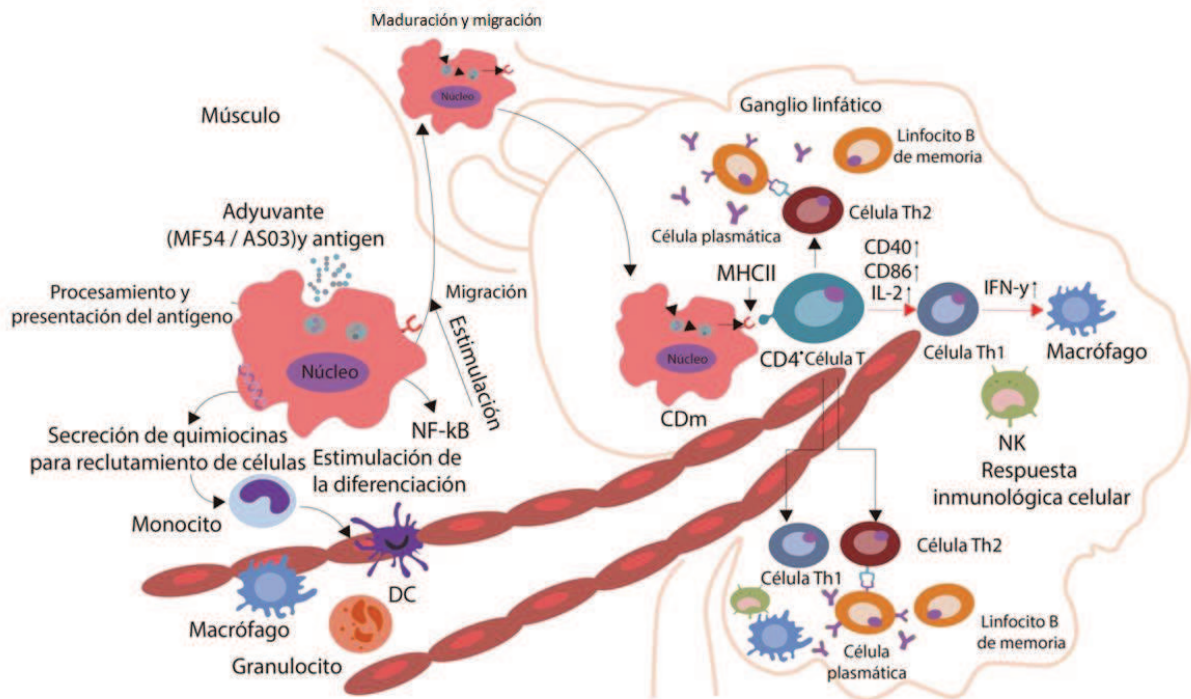
**Figura.6:** Mecanismos de actuación de adyuvantes a base de sales de aluminio. Numerosos estudios demuestran que los adyuvantes basados en sales de aluminio estimulan las respuestas inmunitarias Th2 a través de (1) efecto de depósito; (2) aumento de la captación de antígenos por parte de las células presentadoras de antígenos ; (3) la activación del inflamasoma NLRP3; (4) estimulación y diferenciación de células T CD4+; (5) disrupción de la membrana celular de las CD; (6) activación del complemento; (7) activación de TLR4 en uso combinado con LPS como MPL® en el adyuvante AS04. Figura modificada de: Shi et al., 2019 (Shi et al., 2019).

### 1.2.3.1.2. EMULSIONES

En este grupo se incluyen por ejemplo el adyuvante Completo de Freund (ACF), una emulsión de agua en aceite que contiene micobacterias muertas por calor y es un representante clásico de este grupo. En general, el ACF se utiliza para evaluar la inmunogenicidad de los antígenos en ratones y en la inducción de enfermedades autoinmunes como la uveítis y la encefalomiелitis autoinmune experimental. La evidencia sugiere que los componentes de las micobacterias dirigen a los linfocitos T a adquirir un patrón Th1. Uno de sus principales inconvenientes es la inducción de una fuerte inflamación local de larga duración que puede ser dolorosa y que a menudo conduce a una úlcera en el lugar de la inyección. La misma emulsión de agua en aceite (W/O), pero sin micobacterias, a la que se denomina adyuvante incompleto de Freund (AIF) también es ampliamente usada para potenciar las respuestas inmunológicas. Su actividad adyuvante es el resultado de una liberación continua del antígeno del depósito oleoso, una mayor vida útil del antígeno y la estimulación de la inmunidad innata local, ya que mejora la fagocitosis, la infiltración de leucocitos y la producción de citoquinas (Apostólico et al., 2016).

Otros ejemplos son las emulsiones MF59 (Novartis), AS03 (GSK) y AF03 (Sanofi-

Pasteur) que están presentes como adyuvantes en las vacunas contra la influenza estacional en Europa (MF59), la influenza pandémica en España (AF03) y los Estados Unidos (AS03). Cada emulsión contiene escualeno junto con un emulsionante que consiste en Tween y  $\alpha$ -tocoferol (AS03), o un Span y polioxietileno y cetostearyl éter (AF03), o ambos un Tween y un Span (MF59) (ver figura 7). El principal efecto adyuvante de los mismos es la estimulación de respuestas mediadas por anticuerpos (Alving et al., 2014).

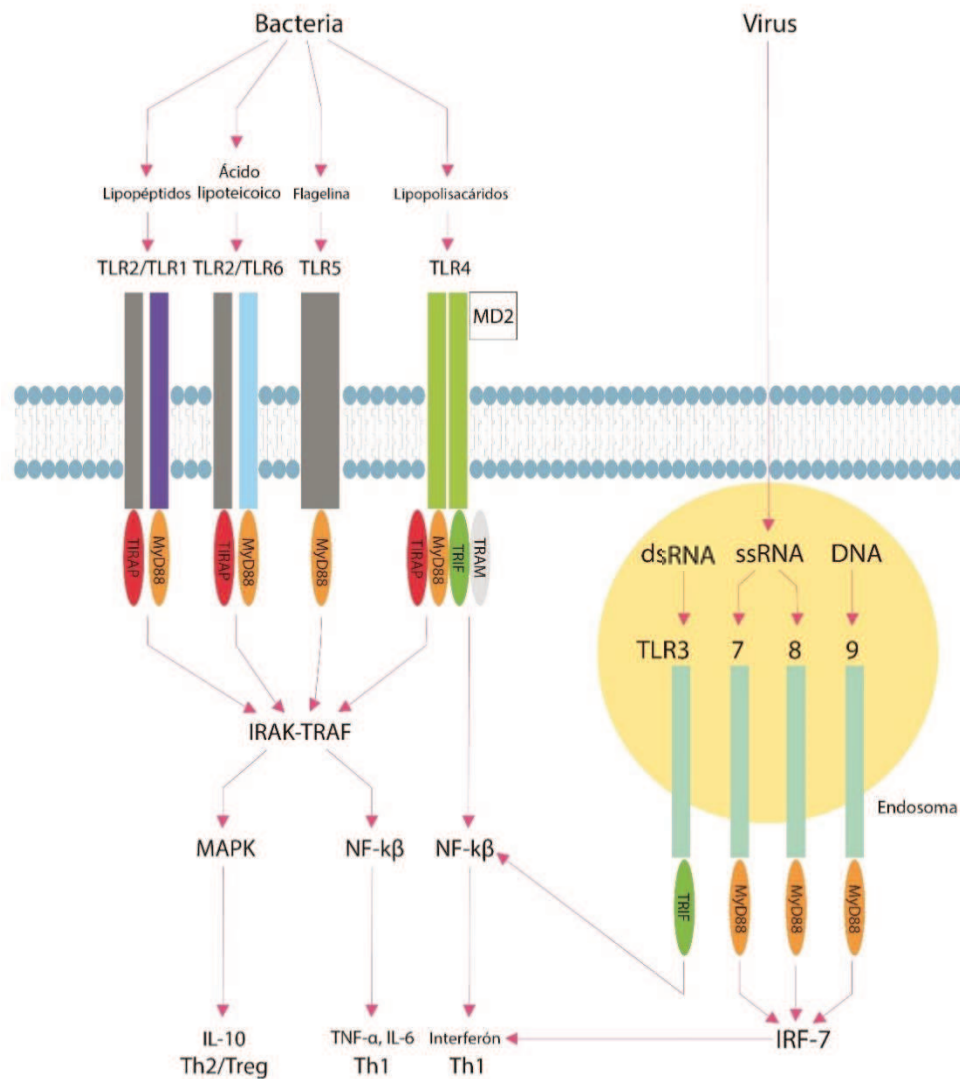


**Figura 7:** Modelos para el mecanismo de activación de MF59 y AS03: Tanto MF59 como AS03 crean un entorno inmunocompetente transitorio después de la inyección sin la generación de un efecto depósito. De esta forma activan localmente monocitos y granulocitos e inducen la producción de citoquinas que aumentan el reclutamiento de células inmunitarias desde la sangre hacia tejidos periféricos. Son responsables de una mayor captación del antígeno por parte de los monocitos en el lugar de inyección y mayor diferenciación de monocitos hacia células dendríticas. Las CPA cargadas de antígeno activadas migran a los ganglios linfáticos de drenaje donde las podrían cebar las células T CD4 + vírgenes. El reclutamiento de células inmunes impulsado por quimiocinas es la característica clave del mecanismo tanto para MF59 como para AS03. Figura modificada de: Shi et al., 2019 (Shi et al., 2019).

### 1.2.3.1.3. AGONISTAS DE TLR

Los TLR, son un conjunto de proteínas de transmembrana que actúan como sensores de reconocimiento evolutivamente conservados. Estos receptores se unen a varios ligandos de patógenos (por ejemplo, componentes de la membrana celular y la pared celular bacteriana, entre otros) para desencadenar diferentes tipos de respuestas inmunitarias y, si se combinan con un antígeno, pueden iniciar y potenciar brazos específicos de las respuestas inmunitarias frente a ese antígeno. Se han descrito a la fecha distintos TLR, cada uno de los cuales responde a diferentes agonistas. Así los patrones moleculares que activan los diferentes TLR son:

lipopéptidos presentes en membranas bacterianas para TLR1; lipopéptidos, glicolípidos y beta-glucanos de pared bacteriana para TLR2; ARN de doble cadena para TLR3; componentes como lipopolisacáridos de membranas bacterianas para TLR4; flagelina para TLR5; lipopéptidos para TLR6; ARN monocatenario para TLR7 y TLR8 o ADN bacteriano así como secuencias de ADN CpG no metiladas para TLR9 (Garçon et al., 2013). Aunque los TLR y su papel en el desencadenamiento de la respuesta inmunitaria innata se entendieron mucho después de que sus ligandos se identificaron como adyuvantes, es útil clasificar estos adyuvantes a través de su receptor específico (Garçon et al., 2013). Entre los agonistas de TLR podemos encontrar, por ejemplo LPS (ver figura 8). Se sabe desde hace tiempo que el LPS, un componente principal de la membrana externa de las bacterias gramnegativas, es un potente estimulador del sistema inmunitario actuando como agonista de TLR4, aunque su uso en adyuvantes se ha visto restringido por sus efectos tóxicos. Sin embargo, GSK desarrolló una combinación de adyuvantes, AS04, en la que se formula MPL® con una sal de aluminio. El sistema adyuvante AS04 se utiliza actualmente en dos vacunas aprobadas (Cervarix® y Fendrix®). Por otro lado, el ADN bacteriano es reconocido por mamíferos como un PAMP y sirve como un potente activador en el sistema inmunitario innato a través de la interacción con TLR9. También se ha demostrado que los fragmentos de ADN bacteriano y los oligodesoxinucleótidos monocatenarios sintéticos que contienen motivos CpG no metilados (ODN CpG) -que se encuentran en el ADN bacteriano- son poderosos adyuvantes.



**Figura 8:** Activación del sistema inmunitario innato a través de la interacción de componentes bacterianos o virales con receptores tipo Toll (TLR) específicos, mensajes a través de la vía MyD88 o TRIF y la posterior secreción de interleucina (IL)-10, factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  e IL-6, o interferón tipo 1. dsDNA, ADN de doble cadena; IRAK, quinasa asociada al receptor de interleucina; IRF, factor regulador del interferón; LPS, lipopolisacárido; MAPK, proteína quinasa activada por mitógeno; NF- $\kappa$ B y factor nuclear  $\kappa$ B; ssRNA, ARN monocatenario; Th, célula T Colaboradora; TRAF, factor asociado al receptor de TNF; Treg, célula T reguladora. Figura modificada de: Garçon et al., 2013 (Garçon et al., 2013).

#### 1.2.3.1.4. SAPONINAS DERIVADAS DE *Quillaja saponaria*

Uno de los adyuvantes que están en desarrollo clínico avanzado pero que no pueden clasificarse entre los antes mencionados son las saponinas, cuyo mecanismo de acción no se conoce por completo. Las saponinas son moléculas triterpenoides con una cadena principal de azúcar compleja extraída de una gran variedad de plantas. El más utilizado de estos extractos es el extracto de saponina del árbol sudamericano *Quillaja saponaria*, conocido como Quil-A®. Se ha utilizado como adyuvante en vacunas veterinarias desde la década de 1970. Sin embargo, se encontró que esta mezcla de saponinas, con actividad adyuvante y toxicidad variable, era demasiado reactogénica para uso en seres humanos (Garçon et al., 2013). Kensil y sus colegas

trabajaron sobre distintas técnicas para reducir la toxicidad de las saponinas Quil-A® (Kensil et al., 1996), aislando un componente puro, denominado QS-21, de la mezcla de saponinas que demostró ser menos tóxico pero que conservaba la actividad adyuvante. QS-21, sin embargo, tenía dos inconvenientes, es químicamente inestable incluso en condiciones levemente alcalinas y, aunque es menos tóxico que la mezcla original, sigue siendo reactogénica. Posteriormente, se determinó que al combinar QS-21 con liposomas que contenían colesterol, la estabilidad de la molécula mejoraba significativamente y se anulaba la reactogenicidad (Garçon et al., 2007). Las saponinas Quil-A® tienen una afinidad muy elevada por el colesterol, y al entrar en contacto con membranas que contienen colesterol, forman un complejo creando poros en la membrana, lo que da como resultado una reactogenicidad considerable en el sitio de la inyección. Sin embargo, esta afinidad por el colesterol también ha permitido el desarrollo de dos adyuvantes de uso humano basados en las saponinas Quil-A®: ISCOMs y AS01, ya que las saponinas capturadas por el colesterol presentan baja reactogenicidad (Garçon et al., 2013).

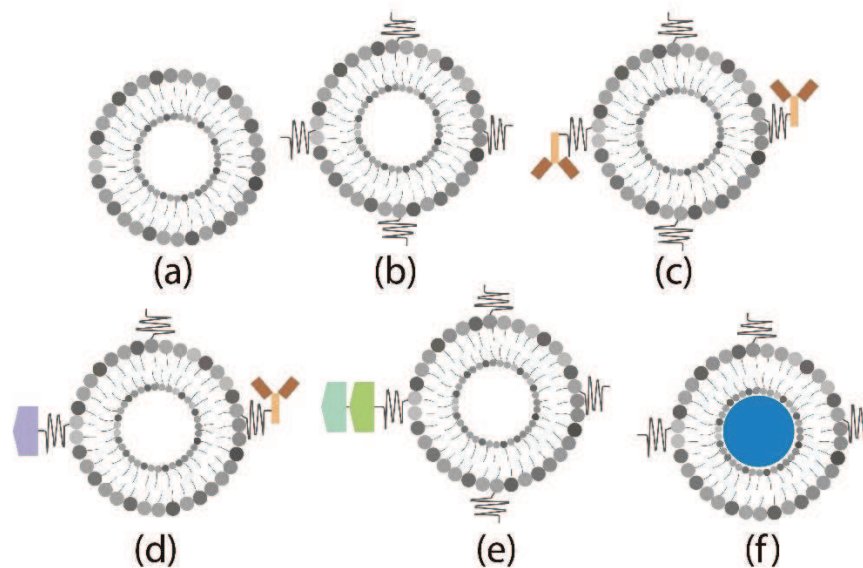
#### **1.2.3.1.5. SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS**

##### **1.2.3.1.5.1. LIPOSOMAS**

Los liposomas son esferas formadas por bicapas de fosfolípidos que encierran un espacio acuoso central. Fueron descritos por Bangham y sus colaboradores en 1965 (Bangham et al., 1965) y se forman por autoensamblaje en agua a través de interacciones hidrofóbicas. Estos se pueden producir fácilmente, son biodegradables e intrínsecamente seguros. Desde un punto de vista inmunológico, estos son capaces de activar respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas y además pueden reducir la toxicidad y las posibles respuestas alérgicas que presentan algunos antígenos. Se sabe que las modificaciones de los liposomas influyen en las interacciones con las células efectoras inmunitarias. El tamaño de los liposomas, la lamelaridad y la fluidez de la bicapa, la carga superficial y la carga de antígenos son factores que pueden influir en la forma en que los antígenos de las vacunas interactúan con las CPA (Christodoulides et al., 2021). En el contexto del desarrollo de vacunas, el uso de liposomas como vehículo de administración de antígenos con propiedades adyuvantes intrínsecas se debe en gran medida a los estudios pioneros de Gregoriadis y colegas a mediados de la década de 1970 (Allison & Gregoriadis, 1974). Las combinaciones de liposomas con compuestos como PEG, MPLA, anticuerpos, entre otros, así como la funcionalización de los mismos (ver figura 9) han demostrado una gran potencia y seguridad en humanos, por ejemplo, las vacunas en evaluación contra la malaria o el VIH (Alving et al., 2014). Los distintos tipos de liposomas se han utilizado en el desarrollo de muchas vacunas experimentales prometedoras para prevenir infecciones virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias de animales y humanos. Sin embargo, solo 4 vacunas liposomales humanas están autorizadas actualmente, a saber, la vacuna contra la



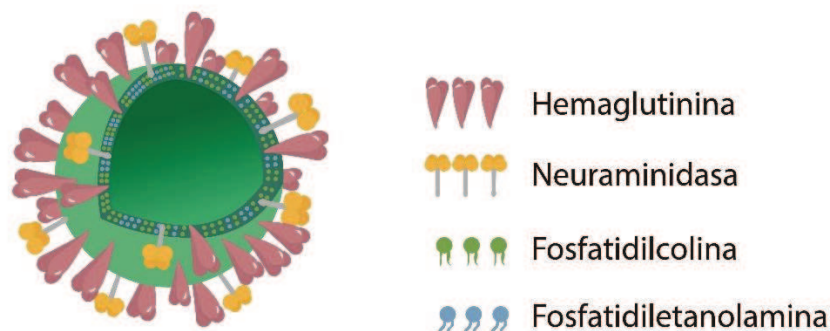
hepatitis A Epaxal®, la vacuna contra la influenza Inflexal®, la vacuna contra la malaria Mosquirix® y la vacuna contra el herpes zóster Shingrix® (Christodoulides et al., 2021).



**Figura 9:** Representaciones esquemáticas de sistemas basados en liposomas: (a) Liposomas convencionales. (b) Liposoma recubierto con un conjugado polimérico tal como PEG. (c) Liposoma acoplado con un ligando funcionalizado. (d) Liposoma con un solo ligando y anticuerpo. (e) Ligando duplicado con secuencia peptídica repetida. (f) Liposoma cargado con gas perfluorocarbonado. Figura modificada de: Mufamadi et al., 2011 (Mufamadi et al., 2011).

### 1.2.3.1.5.2. VIROSOMAS

Los virosomas son liposomas reconstituidos que contienen proteínas virales (típicamente virus de la influenza) en la membrana liposomal y, opcionalmente, antígenos adicionales incorporados en la membrana liposomal o unidos a la membrana (ver figura 10). Los virosomas se han utilizado para las vacunas contra la influenza (con licencia en Europa como Inflexal® y como adyuvantes para la vacuna contra la hepatitis A con licencia en Europa como Epaxal® (Garçon et al., 2013).

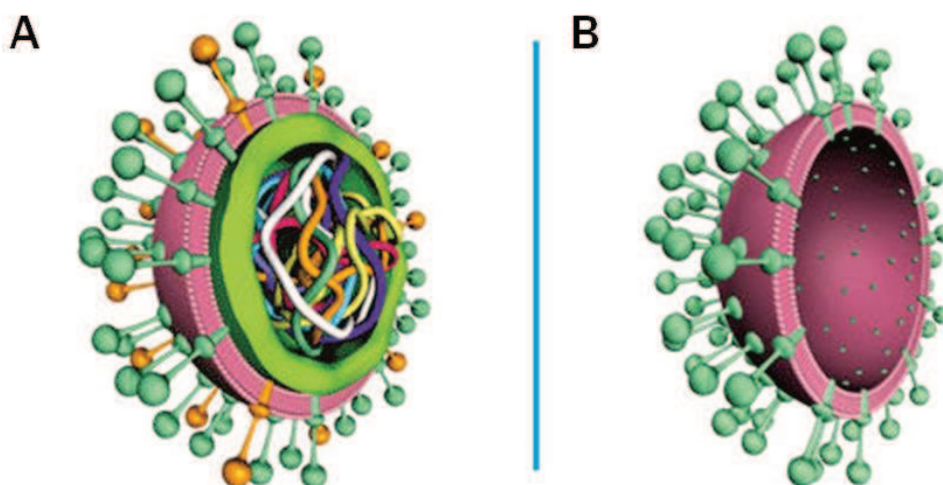


**Figura 10:** Representación esquemática de la estructura de un virosoma. Figura modificada de: Mufamadi et al., 2011 (Mufamadi et al., 2011).



### 1.2.3.1.5.3. NANOPARTÍCULAS SIMILARES A VIRUS (VLP)

Las partículas similares a virus (VLP) son nanoestructuras que exponen subunidades repetitivas en su superficie, lo que induce fuertes respuestas inmunitarias, pero carecen de material genético, lo que proporciona seguridad. Estas nanopartículas se pueden obtener de subunidades naturales a partir de células infectadas con virus o alternativamente mediante tecnologías recombinantes. Las mismas conservan características antigénicas similares a las cápsides virales (esqueleto del vector viral) con el potencial de ser polivalentes (tienen estructuras repetitivas que pueden proporcionar matrices de antígenos inmunogénicos) (ver figura 11). Estos virus / partículas virales de diseño formados espontáneamente por interacciones entre proteínas estructurales virales, pueden imitar la infección al ingresar a las células huésped e inducir una presentación antigénica y respuesta inmune similar a la provocada por los virus. Por eso, las VLP son más inmunogénicas / antigénicas que las proteínas no asociadas cuando se usan en formulaciones vacunales. Estas pueden ser procesadas tanto en MHC de clase I como II y brindan varios beneficios, incluida la actividad inmunoestimuladora. La formulación de VLP con otros adyuvantes, inmunomoduladores y excipientes / conservantes pueden incluso optimizar sus propiedades, estimulando respuestas inmunes innatas y adaptativas. Todo esto hace que las VLP sean inmunógenos potenciales para vacunas veterinarias. Las VLP se pueden producir en mamíferos, plantas, insectos, bacterias, cultivos celulares y sistemas libres de células, aunque implican algunos límites e inconvenientes, como transportar proteínas y ADN de la plataforma de la cual derivan (Celis-Giraldo et al., 2021).



**Figura 11:** Representación esquemática de la estructura de (A) partículas virales del virus de la influenza, con sus antígenos de superficie, lípidos de membrana, proteínas internas y material genético vs (B) partícula VLP. Figura modificada de: Landry et al., 2010 (Landry et al., 2010).

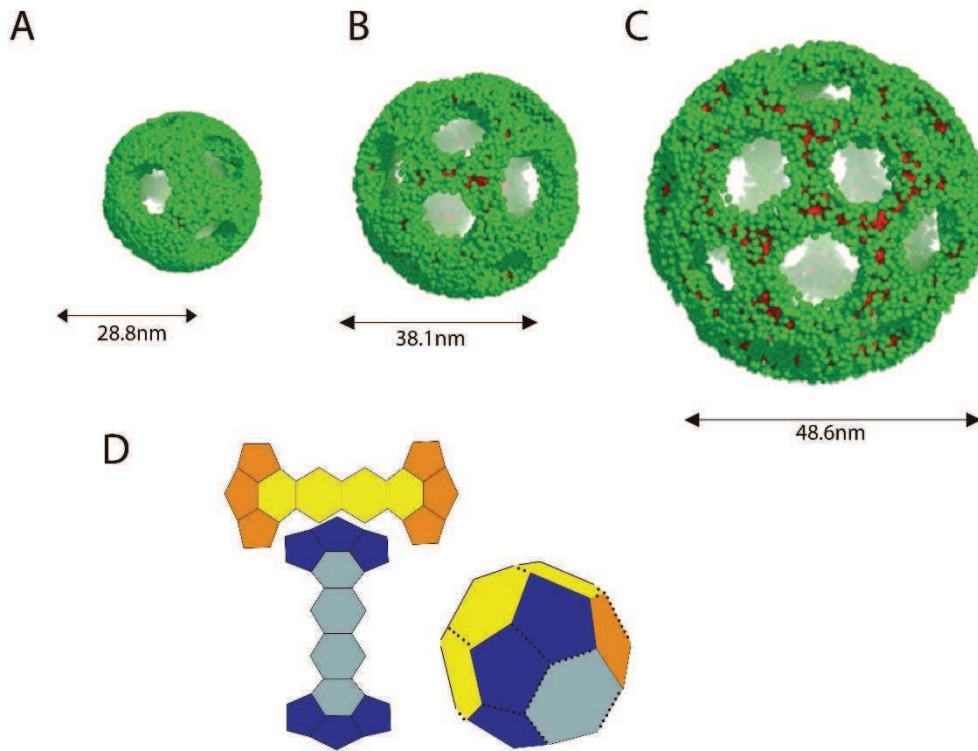
#### 1.2.3.1.6. ISCOMATRIX

Los complejos inmunoestimuladores o ISCOM son también sistemas de nanopartículas pero, por sus características representan un grupo diferente de adyuvantes (ver figura 12). Los mismos están compuestos por nanopartículas similares a jaulas formadas a partir de saponinas purificadas de la corteza del árbol *Quillaja saponaria*, formuladas con colesterol, fosfolípidos y antígeno/s. Los antígenos vacunales no requieren necesariamente incorporarse a las partículas de este tipo, y la mayoría de las aplicaciones usan una mezcla de antígenos solubles y partículas libres de antígenos, como ISCOMATRIX™ (Coffman et al., 2010).

En 1984, Morein y sus colaboradores desarrollaron por primera vez el adyuvante ISCOM basado en una partícula en forma de jaula lipídica compuesta por saponinas, fosfolípidos, colesterol y antígenos hidrofóbicos asociados en una sola nanoestructura (Morein et al., 1984). A través de los años se ha demostrado que estas partículas se encuentran entre los adyuvantes de nueva generación más prometedores (Sun et al., 2009). Efectivamente, en los estudios sucesivos se pudo demostrar que estas partículas desencadenan una equilibrada respuesta Th1 y Th2 y estimulan una respuesta celular citotóxica que difícilmente se obtiene con otros coadyuvantes (Morein et al., 1984; Sun et al., 2009). Por otra parte, recientemente su seguridad y tolerabilidad en humanos se ha confirmado en un metaanálisis (Bigaeva et al., 2016).

Los ISCOM no actúan a través de ningún PRR identificado; sin embargo, mejoran la captación de antígeno y prolongan la retención por parte de las células dendríticas, inducen la activación de las mismas y conducen a fuertes respuestas de anticuerpos y células T (Coffman et al., 2010). Aunque los ISCOM son potenciadores potentes de las células Th, no imponen un sesgo a la respuesta de las células Th1 o Th2, dando lugar a respuestas humorales y celulares balanceadas. A diferencia de la mayoría de los adyuvantes, los ISCOM permiten una presentación sustancial de MHC de clase I e inducen respuestas de células T CD8+ y CD4+ a una variedad de antígenos proteicos solubles en el hombre y animales experimentales (Morein et al., 1984; Sun et al., 2009). Aunque no se conoce con exactitud, un posible mecanismo de acción de los ISCOM sería desestabilizar la membrana endosómica y permitir un mayor acceso citoplasmático para los antígenos administrados en comparación con otras formas de administración de antígenos.

Una fracción heterogénea de saponinas, Quil-A®, se usa ampliamente para vacunas veterinarias constituidas por ISCOMS, y una especie altamente purificada, QS-21 se está evaluando en estudios en humanos con varias vacunas candidatas, estando ya aprobada para al menos tres vacunas de uso en humanos (Bigaeva et al., 2016; Coffman et al., 2010).



**Figura 12:** Estructura de matriz ISCOM a partir del análisis de datos SAXS. (A) Estructura icosaédrica. (B) Estructura de pelota de tenis. (C) Estructura de fútbol. El modelo de estructura de pelota de tenis tiene 12 pentágonos y ocho hexágonos dispuestos como se muestra en el panel D. Figura modificada de: Pedersen et al., 2012 (Pedersen et al., 2012).

### 1.3. EL ADYUVANTE ISPA DE DESARROLLO LOCAL Y SUS ANTECEDENTES

Luego de la descripción inicial de las partículas en forma de jaula, se reportó que también son funcionales cuando se mezclan simplemente con el antígeno antes de la inoculación (Bengtsson et al., 2011; Sun et al., 2009). Esta observación contribuyó a la expansión del número y el tipo de formulaciones de antígeno con estas partículas. Sin embargo, un inconveniente teórico de este enfoque es que los grupos de ácido glucurónico de los glucósidos Quil-A® confieren alta densidad de carga negativa sobre las partículas, limitando el número de antígenos que pueden asociarse con las mismas (G. F. A. Kersten et al., 1991). Muchos estudios indican que la asociación entre el adyuvante y el antígeno que se produce en las partículas tipo jaula, permiten una acción sinérgica entre el efecto inmunoestimulante de la saponinas y una más eficiente captación de patógenos por las CPA (Maraskovsky et al., 2009; Reed et al., 2009; Wilson et al., 2014). De hecho, se ha demostrado ampliamente la importancia de la asociación entre antígeno y adyuvante para potenciar la acción de diferentes tipos de antígenos y adyuvantes (Brito et al., 2013). En consecuencia, algunos autores han propuesto el aumento de la carga superficial de las partículas en forma de jaula con el fin de mejorar la adsorción de antígenos (Lendemans et al., 2007). Para modificar la carga de estas partículas, se han utilizado fosfolípidos positivos o derivados catiónicos del colesterol. Se han obtenido partículas de baja densidad de cargas o positivas usando estos enfoques. Sólo en uno de dichos trabajos se han realizado estudios inmunológicos y se ha demostrado que igualaba, pero no mejoraba la eficacia de las partículas tipo jaula clásicas (McBurney et al., 2008). Además, dichos autores no tuvieron en cuenta el costo de los reactivos utilizados para la preparación de las partículas, la factibilidad de escalar los procesos de preparación o la estabilidad de las mismas.

En el Laboratorio de Tecnología Inmunológica, en colaboración con el INTA Rafaela y la empresa LIPOMIZE, se desarrolló un adyuvante basado en jaulas lipídicas que presenta la particularidad de poseer baja carga en su superficie lograda mediante el agregado de esterilamina. Este componente no había sido usado previamente para dicho fin y cuenta con la ventaja de ser de menor costo que las alternativas antes descriptas. Por otro lado, el proceso de preparación desarrollada por el grupo introdujo modificaciones en relación a las técnicas, componentes y proporciones previamente descriptas. Ya a principios del siglo XXI se habían reportado varios enfoques para obtener estructuras tipo jaula aniónicas como las descriptas originalmente por Morein, en forma simple, y sin utilizar detergentes, que son caros y difíciles de eliminar (Friede & Garcon, 2003; Lendemans et al., 2005a). Aunque estos trabajos hicieron importantes aportes, en ellos no se consideraron muchos aspectos relevantes para la producción de vacunas, tales como el costo de los reactivos y procesos, la estabilidad física y la inmunogenicidad con respecto al tiempo de almacenamiento. Por lo tanto, en el grupo del LTI

se propuso obtener jaulas lipídicas de baja densidad de carga en superficie que además pudieran prepararse usando un método estandarizado, económico y escalable. Como resultado, se desarrolló un nuevo método para obtener dichas partículas que poseen una estructura similar a las clásicas pero que presentan baja carga sobre la superficie (Bertona et al., 2017).

Mediante esta propiedad se buscó aumentar el número de antígenos que pueden interactuar con las partículas cuando están cargados negativamente, que es el caso de la mayoría de las proteínas en situaciones fisiológicas. El método desarrollado también tuvo en cuenta la escalabilidad de las etapas de preparación, evitando el uso del film lipídico o la diálisis, y el costo de los reactivos evitando los costosos detergentes. Además, en dicha formulación se introdujo  $\alpha$ -tocoferol, que no había sido previamente utilizado para la preparación de estas partículas. Este lípido había sido agregado con la doble finalidad de prevenir la oxidación y a la vez de favorecer la respuesta inmune ya que esta propiedad fue previamente descrita para dicha vitamina (Tengerdy & Lacetera, 1991).

Las partículas obtenidas se analizaron por sus características fisicoquímicas luego de su preparación y a distintos tiempos de su conservación. Se encontró que el tamaño y forma es coincidente con los obtenidos por otros autores y se conservan en el tiempo. Hay que destacar que en la dispersión obtenida mediante el método optimizado no se observan partículas mixtas tipo gusanos, en forma de anillo o cristales de colesterol, que se obtienen con frecuencia mediante otros métodos (Myschik et al., 2006). Si bien los criterios seleccionados para el desarrollo tuvieron en cuenta el potencial escalado del método, los ensayos realizados hasta entonces fueron en base a la preparación de pequeñas partidas del adyuvante. Por eso una continuación clave de este trabajo era el escalado de la producción y la evaluación de la reproducibilidad de la producción.

Las propiedades inmunoestimulantes fueron evaluadas desde distintos ángulos. En primer lugar, se comparó la eficacia del adyuvante para la generación de anticuerpos con las de una partícula en forma de jaula vacía comercial (ISCOMATRIX™, Isconova) y tres adyuvantes convencionales, utilizando albúmina bovina como antígeno modelo. Se evaluó el nivel, la cinética, la homogeneidad de respuesta y el perfil de las respuestas inmunes humorales obteniéndose en todos los casos un resultado superador en relación a los otros adyuvantes. Además, se evaluó la estabilidad con el tiempo y se determinó que su eficacia persiste luego del año de su preparación.

#### 1.4. NUEVAS METAS A ALCANZAR EN EL DESARROLLO DEL ADYUVANTE ISPA

Un aspecto crítico para el uso de adyuvantes en vacunas es su costo ya que el mismo constituye solo una fracción del precio de la formulación. Por eso, lograr adyuvante de bajo valor económico es crítico, principalmente para formulaciones veterinarias. Cabe destacar que si bien el adyuvante ISPA no incluía procesos ni detergentes de alto costo, el mismo fue formulado con reactivos comerciales que implican precios elevados para su preparación. Por eso, un siguiente paso en el desarrollo de este adyuvante es la obtención de componentes que sustituyan a los comerciales. En ese sentido es necesario obtener saponinas de bajo valor económico pero que sean efectivas para el armado de las partículas y la estimulación inmunológica. Así mismo se requiere de la obtención de lípidos de bajo costo que permitan el mismo fin.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el desarrollo del adyuvante ISPA demostraron que el mismo presenta el desempeño deseado, ya que se comprobó que aumenta la respuesta inmune contra antígenos específicos, que permite la reducción del número de dosis, que homogeneizan la respuesta entre individuos y que alcanzan una respuesta Th1 / Th2 equilibrada. Ninguno de los otros adyuvantes con los que se comparó al adyuvante ISPA tiene todos estos beneficios juntos. También, se evaluó la eficacia del adyuvante en una formulación usada para proteger contra la infección por *Trypanosoma cruzi*, una infección intracelular que requiere una fuerte respuesta celular. En dicho estudio se observó una respuesta del adyuvante similar a la obtenida con ISCOMATRIX™, siendo el perfil de respuesta celular obtenido con la formulación de la vacuna contra *Trypanosoma cruzi*, compatible con una respuesta Th1 con un importante componente de LTc específicos. Todos estos parámetros fueron estudiados luego de 15 días posteriores de la aplicación del inmunógeno. Sin embargo, no se realizaron ensayos que permitan determinar la activación inmunológica a largo plazo que promueve el adyuvante. Dicha información es muy importante para conocer el comportamiento que puede presentar el mismo en futuras formulaciones. También es importante conocer si tal como ocurre con todos los parámetros de eficacia evaluados, dicha activación es también superior a la de otros adyuvantes. Esta información agregaría una ventaja comparativa a ISPA. En ese sentido, también resulta de gran interés analizar si el agregado de nuevos componentes inmunoestimulantes permite complementar la formulación aumentando su capacidad inmunoestimulante.

## 2. OBJETIVOS

## **2.1. OBJETIVO GENERAL**

1. Lograr escalar, estandarizar y reducir el costo de la producción del adyuvante ISPA desarrollado por el grupo UNL-INTA-LIPOMIZE, así como complementar la formulación para lograr variantes que incrementen las propiedades inmunoestimulantes del mismo.

## **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Desarrollar un proceso que permita la obtención de Quil-A® con alta actividad adyuvante y baja toxicidad a partir de extractos crudos de *Quillaja saponaria* que estén disponibles en el mercado y que sean de bajo costo.
2. Evaluar lípidos de diferentes fuentes tales como fosfolípidos comerciales, naturales o de residuos industriales que permitan la obtención de jaulas lipídicas y reduzcan el costo de su preparación.
3. Obtener variantes potenciadas del adyuvante que permitan mayores respuestas inmunológicas en el caso de ser necesario para el desarrollo de vacunas con inmunógenos que no respondan a ISPA o en poblaciones no respondedoras.

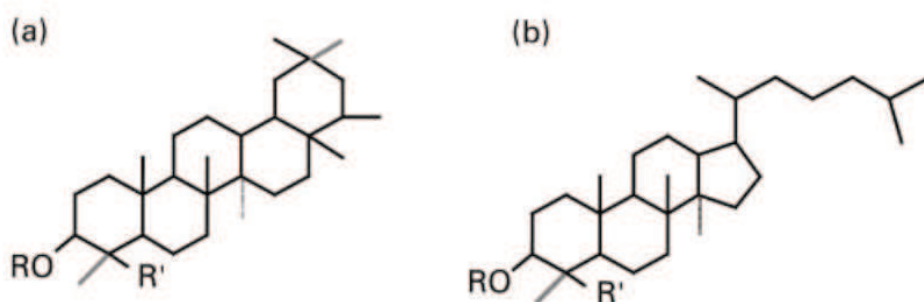


### 3. CAPÍTULO 1

**Desarrollo de un proceso de obtención  
de saponinas con alta actividad  
adyuvante y baja toxicidad a partir de  
extractos crudos de *Quillaja saponaria***

### 3.1. INTRODUCCIÓN

Las saponinas derivan del metabolismo de las plantas caracterizándose por ser compuestos anfipáticos. En ese sentido, su nombre proviene de la palabra latina *sapo*, que se traduce como jabón, y se refiere a la actividad interfacial observada para esta clase de moléculas (Reichert et al., 2019). Esta característica debe a su naturaleza química, derivada de su aglicona central hidrofóbica asociada con varios residuos de azúcar hidrofílicos (Magedans et al., 2019). Se encuentran constitutivamente en muchas especies de plantas, tanto de forma silvestre como en forma de cultivos. En los cultivos, predominan generalmente las saponinas triterpenoides, mientras que las saponinas esteroides son comunes en las plantas utilizadas como hierbas medicinales (ver figura 13) (Francis et al., 2002). Un grupo extensamente estudiado de saponinas triterpenoides se produce a partir del árbol de *Quillaja saponaria*. El género *Quillaja* consta de dos especies de árboles de hoja perenne templados. *Quillaja saponaria*, que se encuentra principalmente en Chile central y *Quillaja brasiliensis*, un típico representante de los bosques de Araucaria que se encuentra en el sur de Brasil, norte de Uruguay, noreste de Argentina y Paraguay oriental, siendo la madera de *Q. saponaria* y las hojas de *Q. brasiliensis* las principales fuentes de saponinas (Magedans et al., 2019).



**Figura 13:** Estructura básica de saponinas: a) saponinas triterpenoides y b) saponinas esteroides. Extraído de: (Francis et al., 2002) (Francis et al., 2002).

Toda la madera de *Q. saponaria* contiene alrededor del 8% de compuestos solubles en agua de las cuales alrededor del 20% son saponinas (San Martín & Briones, 2000). Originalmente, los pueblos indígenas la utilizaban como agente de lavado y como agente curativo general extrayéndola con agua a partir de la corteza de los árboles de *Quillaja* (Francis et al., 2002). Los procesos de extracción industrial siguieron basándose en la extracción con agua, lo que no elimina taninos ni polifenoles (San Martín & Briones, 2000). Sin embargo, a principios de la década de 1970, estas preparaciones fueron refinadas para excluir estos últimos. Se utilizaron entonces procesos como diálisis, intercambio aniónico y cromatografía de exclusión por tamaño para producir una fracción que contiene predominantemente saponinas, la

cual se ha denominado Quil-A® (Dalsgaard, 1974). Las técnicas de separación acuosa utilizadas fueron útiles para purificar la fracción de saponina total, pero fallaron en separar las saponinas individuales debido a la formación de micelas mixtas. Para demostrar que este producto todavía constaba de una matriz heterogénea de saponinas relacionadas entre sí, pero estructuralmente únicas se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Kensil et al., 1991; G. F. Kersten et al., 1988; van Setten et al., 1995). Esta técnica demostró que la fracción de saponina purificada como Quil-A®, a partir de *Q. saponaria*, constaba de más de 20 saponinas diferentes del tipo glucósido triterpénico. Otro estudio ha estimado la presencia de hasta 50 saponinas diferentes en *Q. saponaria* (van Setten et al., 1995). Se observó que Quil-A® contiene componentes tóxicos (Kensil et al., 1991; G. F. Kersten et al., 1988), por lo tanto, se hizo un esfuerzo adicional para separar los componentes individuales y determinar si los componentes activos con características adyuvantes podrían separarse de los componentes tóxicos. Las saponinas individuales se separaron con HPLC, lo que permitió una mayor caracterización de las moléculas purificadas (Kensil et al., 1991) identificándose de esta forma más de 20 fracciones. Las fracciones predominantes se designaron con los nombres: QS-7, QS-17, QS-18 y QS-21 y se caracterizaron con más detalle. La evaluación de la toxicidad y la función adyuvante en ratones demostró que la toxicidad y la función adyuvante podrían separarse, lo que permitió calificar a cada fracción de forma individual. QS-7, que eluye temprano en HPLC de fase reversa (RP), y QS-21, uno de los picos que eluyen más tarde, resultaron ser adyuvantes activos y considerablemente menos tóxicos que el Quil-A® inicial mientras que QS-18, un pico de elución intermedia, fue más tóxico que Quil-A®, aunque tenía una actividad adyuvante considerable. QS-18 es la saponina predominante en los extractos de *Q. saponaria*, lo que sugiere que puede ser la principal fuente de toxicidad en Quil-A®. Rönnerberg et al., hicieron una observación similar cuando separaron la saponina de *Q. saponaria* en tres fracciones, una fracción de elución temprana de RP-HPLC (QH-A), una fracción intermedia (QH-B) y una fracción de elución posterior (QH-C) (Rönnerberg et al., 1995). La fracción QH-B fue tóxica para los ratones (es la fracción que contiene QS-18), mientras que las fracciones QH-A y QH-C (que contienen QS-7 y QS-21 respectivamente) no fueron tóxicas (en dosis de hasta 400 µg).

Una de las saponinas encontradas en Quil-A®, QS-21, ha sido la saponina más estudiada y además ha mostrado ser segura y efectiva para uso humano. La misma ha sido utilizada en muchos ensayos clínicos recientes en los que se evaluaron vacunas para proteger contra distintos cánceres (Gin & Slovin, 2011), así como enfermedades infecciosas y neurodegenerativas. A título de ejemplo de ensayos clínicos que utilizan formulaciones con saponinas, pueden mencionarse los realizados para vacunas contra el virus de inmunodeficiencia adquirida (Ahmed et al., 2012), hepatitis B (Vandepapelière et al., 2008) o para el control de la enfermedad de Alzheimer (Cribbs et al., 2003). Muy recientemente Novavax, Inc. ha

desarrollado NanoFlu™, una vacuna tetravalente de nanopartículas contra la influenza, que ha cumplido con todos los objetivos principales en su ensayo clínico de Fase 3 en adultos mayores. Entre las formulaciones ya aprobadas por agencias regulatorias que utilizan esta saponina, pueden mencionarse una vacuna destinada a Malaria (RTS,S/AS01 Mosquirix™ de GSK) (Arora et al., 2021) y las vacunas para la protección frente a COVID-19 Nuvaxovid® (NVX-CoV2373) y Covovax® (NVX-CoV2373) (Organización Mundial de la Salud, 2022). Las demás fracciones de saponina de *Quillaja* -diferentes a QS-21-, son consideradas tóxicas para su uso en humanos. Estas producen reacciones locales y pueden provocar lisis de los eritrocitos y otras células. Sin embargo, el extracto Quil-A® que contiene más de 22 fracciones de HPLC, se ha utilizado con éxito en medicina veterinaria (Çokçalışkan et al., 2016), habiéndose centrado los ensayos preclínicos en vacunas contra el virus de la fiebre aftosa, del herpes bovino-5 y el virus de la diarrea viral bovina (Cibulski et al., 2017, 2018; Dalsgaard, 1978; Fleck et al., 2019; Silveira et al., 2011). Estas saponinas, solas o incorporadas en complejos inmunoestimulantes (ISCOM), pueden modular la inmunidad al aumentar la captación de antígeno, estimulando la producción de linfocitos T citotóxicos y diferentes citocinas. Muestran efectos inmunitarios estimulantes tanto específicos como no específicos, como la inflamación. El mecanismo exacto de este efecto inmunoestimulante no se comprende claramente (Adams et al., 2010), pero se sabe que la saponina induce la producción de citocinas, incluidas las interleucinas y los interferones, que inducen a otros elementos del sistema inmunológico (Kensil et al., 1991). En cuanto a la respuesta humoral, las saponinas pueden suprimir la secreción de IL-4, disminuyendo así los niveles de IgE y redireccionar una respuesta Th2 a una respuesta Th1, induciendo la secreción de IgG2a en lugar de IgG1. Este fenómeno se correlaciona con la capacidad de estas moléculas de generar una respuesta Th1 más pronunciada que la respuesta Th2 a través de cambios en la secreción de citocinas. Se ha sugerido que este cambio de perfil de respuesta inmune puede ocurrir de dos maneras diferentes: primero, a través del aldehído desacetilado que se une a los receptores de la superficie de las células T (principalmente CD2), lo que lleva a la célula a la inmunidad Th1; y segundo, a través de la endocitosis de la saponina con un antígeno, alterando la membrana endosómica del antígeno procesado y facilitando el proceso de presentación cruzada (Fleck et al., 2019).

En el Laboratorio de Tecnología Inmunológica de la FBCB-UNL, hemos reportado numerosos trabajos usando las partículas preparadas con saponinas Quil-A®, denominadas ISPA, previamente descritas en el capítulo 1. Dichos trabajos describen el uso de dicho adyuvante con diferentes antígenos (Bertona et al., 2017; Bidart et al., 2020, 2021; Bontempi et al., 2015; Gamba et al., 2021; Moran et al., 2022; Pacini et al., 2022; Prochetto et al., 2017). Los resultados obtenidos a nivel experimental han demostrado notable capacidad adyuvante comparable con vacunas comerciales (Bidart et al., 2020, 2021). Sin embargo, uno de los

principales inconvenientes en su formulación es el costo de obtención de Quil-A®, por tanto, se propuso como primer objetivo de esta tesis obtener de forma económica, saponinas purificadas a partir de extractos de *Quillaja saponaria* disponibles en el mercado local, que sean de bajo costo, pero que al mismo tiempo presenten características físicas, químicas e inmunológicas semejantes a Quil-A®.

### 3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- ❖ Desarrollar un proceso que permita la obtención de saponina similar a Quil-A® con alta actividad adyuvante y baja toxicidad a partir de extractos crudos de *Quillaja saponaria* que estén disponibles en el mercado y que sean de bajo costo.

### **3.3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.3.1. Obtención y caracterización fisicoquímica de saponinas derivadas de *Quillaja saponaria***

##### **3.3.1.1. Refinado de saponinas a partir de extracto de *Quillaja saponaria* Kerry®**

Se utilizó un extracto de polvo seco por aspersión no refinado de *Quillaja saponaria* comercializado por Kerry® como complemento alimenticio. El polvo se solubilizó en agua destilada 1:10 en vol. y fue dializado frente a agua destilada en una proporción de 1: 10000 durante 48 horas. El extracto dializado se recuperó y liofilizó. Este extracto semirrefinado se utilizó para el análisis.

##### **3.3.1.2. Análisis cualitativo de los extractos obtenidos**

###### **3.3.1.2.1. Cromatografía en capa fina (TLC)**

Se usaron placas de sílica gel con base de aluminio, (TLC Sílica gel 60 F254 20 x 20 cm) marca Merck® como fase estacionaria donde se sembraron diferentes lotes de purificación. Se depositaron tres puntos de siembra por pocillo de 1 µl cada uno en una concentración de saponina de 25 mg / ml. Se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se desarrolló la placa con N-butanol: etanol: amoníaco: agua (30: 60: 21: 29 en vol.) como fase móvil (Kensil & Marciani, 1991). Después de la corrida cromatográfica, para visualizar las manchas, las placas de TLC se expusieron a vapores de yodo.

###### **3.3.1.2.2. MALDI-TOF**

Se utilizó Quil-A® como saponina estándar. Las muestras se analizaron con un equipo Maldi TOF-TOF de marca Shimadzu AXIMA ID Plus. Se utilizó DHB (ácido 2,5-dihidrohbenzoico) como matriz y se aplicó modo reflectron con las siguientes características de adquisición: Power 90; Perfiles 500 por muestra; Disparos 10 acumulados por perfil; Extracción pulsada optimizada a (Da) 2300; Ion Gate (Da) 400. Las muestras se prepararon a una concentración de 10 mg / ml en agua de calidad miliQ. Luego se sembraron 0,5 µl de cada muestra en una placa MALDI, se incubaron a temperatura ambiente hasta que cristalizó y luego fueron analizadas.

##### **3.3.1.3. Análisis Cuantitativo de los extractos obtenidos**

###### **3.3.1.3.1. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)**

En este trabajo las muestras se analizaron mediante HPLC adaptando los protocolos desarrollados por Brunner et al., 2017 y Pham et al., 2009 (Brunner et al., 2017; Pham et al., 2009). Se utilizó una columna C18 de 21,2 x 250 mm con un tamaño de partícula de 10 µm y un tamaño de poro de 100 Å. Se utilizó como eluyente ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 % en acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) de calidad HPLC-S. Brevemente, se pesaron 0,5 mg de producto liofilizado en un tubo de polipropileno, se disolvieron con 0,5 ml de CH<sub>3</sub>CN: H<sub>2</sub>O (30: 70 en

volumen) y se agitó durante unos segundos para obtener una solución transparente y espumosa. Luego se inyectaron 20 µl de la solución y se eluyeron con TFA al 0,1% en acetonitrilo en un gradiente de 30-55% durante 15 minutos. El caudal fue de 1 ml / minuto y la detección de UV a 210 o 220 nm con una temperatura de columna de 20-22 °C.

### **3.3.2. Formulación de partículas adyuvantes tipo ISPA**

#### **3.3.2.1. Obtención de nanopartículas**

Quil-A® como polvo liofilizado se adquirió de Brenntag Biosector (Frederikssund - Dinamarca), fosfatidilcolina / di-palmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) derivada de huevo se adquirió de Lipoid GmbH, colesterol se adquirió de Fluka, esterilamina se adquirió de Sigma-Aldrich® y el  $\alpha$ -tocoferol se adquirió de Sigma-Aldrich® (Missouri, EE. UU.). El tampón utilizado fue acetato de sodio 50 mM (Merck®, Darmstadt, Alemania) pH 5,5. El etanol se adquirió en Merck®, Darmstadt, Alemania. Los extractos de saponinas optimizados en este trabajo fueron liofilizados y utilizados en la formulación de nanopartículas. Las partículas de ISPA se formularon tal como se describe en Bertona et al., 2017 (Bertona et al., 2017). Brevemente, para preparar 20 ml, el método fue el siguiente: (i) 61 mg de DPPC y 29 mg de colesterol se disolvieron en 2,3 ml de etanol; (ii) se disolvieron 30 mg de Esterilamina en 1 ml de etanol y se añadieron 144 µl de esta solución madre a la solución madre de DPPC y colesterol; (iii) luego, se agregaron 80 µl de solución madre etanólica al 1% de  $\alpha$ -tocoferol como antioxidante; y (iv) la solución resultante se inyectó en tampón acetato pH 5,5 a 65 °C. Las proporciones finales de componentes en los liposomas formados fueron las siguientes DPPC: 0,320 % (4,35 mM), Colesterol: 0,143 % (3,70 mM), Estearilamina: 0,0216 % (0,8 mM) y  $\alpha$ -tocoferol: 0,00074 % (0,017 mM). La suspensión se extruyó con un poro de membrana de 100 nm y luego de 50 nm. Luego, se añadió solución de saponina Quil-A® en tampón de acetato a los liposomas (6,5 mg / 300 µl por 1 ml de liposomas). La suspensión se extruyó cinco veces con un poro de membrana de 100 nm. La solución final se esterilizó con un filtro de 200 nm (Bertona et al., 2017).

#### **3.3.2.2. Caracterización de las nanopartículas obtenidas**

##### **3.3.2.2.1. Caracterización estructural**

Los tamaños de las partículas obtenidas se determinaron mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) en un solo ángulo (90°), a 30 °C, utilizando un fotómetro Brookhaven BI-2000. La viscosidad del medio disperso a 30 °C se fijó en 0.798 cp. (Correspondiente al agua) (Bertona et al., 2017).

##### **3.3.2.2.2. Caracterización funcional**

Se analizó la actividad hemolítica de extractos de saponinas de diferentes lotes y de



partículas en forma de jaula utilizando glóbulos rojos humanos. El índice hemolítico se obtuvo adaptando el protocolo utilizado por Mac Donald et al., 2017 (Mac Donald et al., 2017). Para esta determinación se utilizó una solución al 0,4 % de hematíes en solución fisiológica (NaCl al 0,9 % p / v). Las titulaciones de las muestras se realizaron partiendo de una concentración de saponina de 250 µg / ml. Para ello, se dispusieron 15 tubos con 980 µl de solución fisiológica en una gradilla y se agregaron 20 µl de muestra de prueba al tubo N° 1. Luego se realizaron diluciones en serie al 1/2. Posteriormente, se añadió a cada tubo 1 ml de la solución de glóbulos rojos al 0,4 %. Se prepararon tres tubos de control, cada uno con 1 ml de solución de glóbulos rojos al 0,4 % y 1 ml de solución salina al 0,9 % cada uno. El tubo de control negativo no recibió adición de sustancias hemolíticas. En el tubo de control positivo A; Se añadieron 20 µl de solución de Saponina Quil-A® a una concentración de 25 mg / ml. En el tubo B; Se añadió 1 ml de solución de Tritón al 1 %. En el tubo C; Se añadieron 20 µl de la solución de extracto de Kerry® refinado a una concentración de 25 mg / ml. Para las partículas tipo jaula se calculó la concentración añadida al tubo 1 para comenzar en este tubo con una concentración de extracto de saponina cargado en las partículas de 25 mg / ml. Teniendo en cuenta que se añadió 1 ml de solución de células sanguíneas a todos los tubos, la concentración final de saponina en cada tubo del 1 al 15, fue de 250 - 125 - 62,5 - 31,25 - 15,62 - 7,81 - 3,90 - 1,95 - 0,97 - 0,48 - 0,24 - 0,12 - 0,061 - 0,030 - 0,015 µg / ml . Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 ° C.

### **3.3.3. Evaluación del desempeño inmunológico**

#### **3.3.3.1. Animales de experimentación y protocolos de inmunización**

Se utilizaron ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, adquiridos en el Centro de Medicina Comparada de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL (CMC - IciVet, UNL - CONICET). Los animales se inmunizaron cada 14 días con 3 dosis subcutáneas de cada formulación en estudio y utilizando ovoalbúmina (OVA) de Sigma-Aldrich® como antígeno modelo. Se utilizaron cinco ratones por grupo de acuerdo con el siguiente esquema:

- GRUPO 1: ISPA CON SAPONINAS Kerry® - (10 µg de OVA + 6 µl de ISPA formulado con saponina extraída del producto Kerry® en 100 µl de PBS)
- GRUPO 2: ISPA ORIGINAL - (10 µg de OVA + 3 µl de ISPA en 100 µl de PBS)
- GRUPO 3: CONTROL - (100 µl PBS)

#### **3.3.3.2. Determinación de la Respuesta Inmunológica**

**ELISA:** A los 15, 30 y 45 días después de la primera inmunización (DPI), se obtuvieron muestras de plasma para determinar la respuesta inmune humoral. Los anticuerpos desarrollados en los diferentes momentos se evaluaron mediante ELISA indirecto determinando niveles

específicos de IgG1 e IgG2a anti-OVA. Brevemente, se recubrieron placas de microtitulación (Greiner Bio One) con OVA (0,05  $\mu\text{g}$  / pocillo) en tampón carbonato-bicarbonato (0,05 M; pH 9,6), luego se bloquearon con PBS / leche (5 %). Las muestras de plasma de ratones inmunizados, diluidas 1: 1000 en PBS / leche (1 %), se incubaron por duplicado durante una hora a 37 °C. Después del lavado, se incubaron respectivamente con anti-IgG1 y anti-IgG2a de ratón hecho en cabra, ambos conjugados con peroxidasa (dilución para ambos 1: 20000). Después del lavado, se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de trimetilbencidina lista para usar (TMB, Invitrogen, EE. UU.) Y después de 10 minutos de incubación, se detuvo la reacción colorimétrica con ácido sulfúrico 2N. Las placas se leyeron a 450 nm en un lector ELISA (Bio-Tek Instruments) (Bertona et al., 2017).

**DTH:** La prueba de hipersensibilidad retardada (DTH) se realizó 30 días después de completar el plan de inmunización mediante la inoculación intradérmica de 5  $\mu\text{g}$  de OVA disuelta en 20  $\mu\text{l}$  de PBS en la almohadilla plantar del miembro posterior izquierdo. Las medidas se tomaron con calibre. Los resultados se expresaron como diferencia en el grosor de las almohadillas antes y después de la inoculación ( $\Delta\text{mm}$ ) (Bertona et al., 2017).

#### **3.3.4. Análisis de datos**

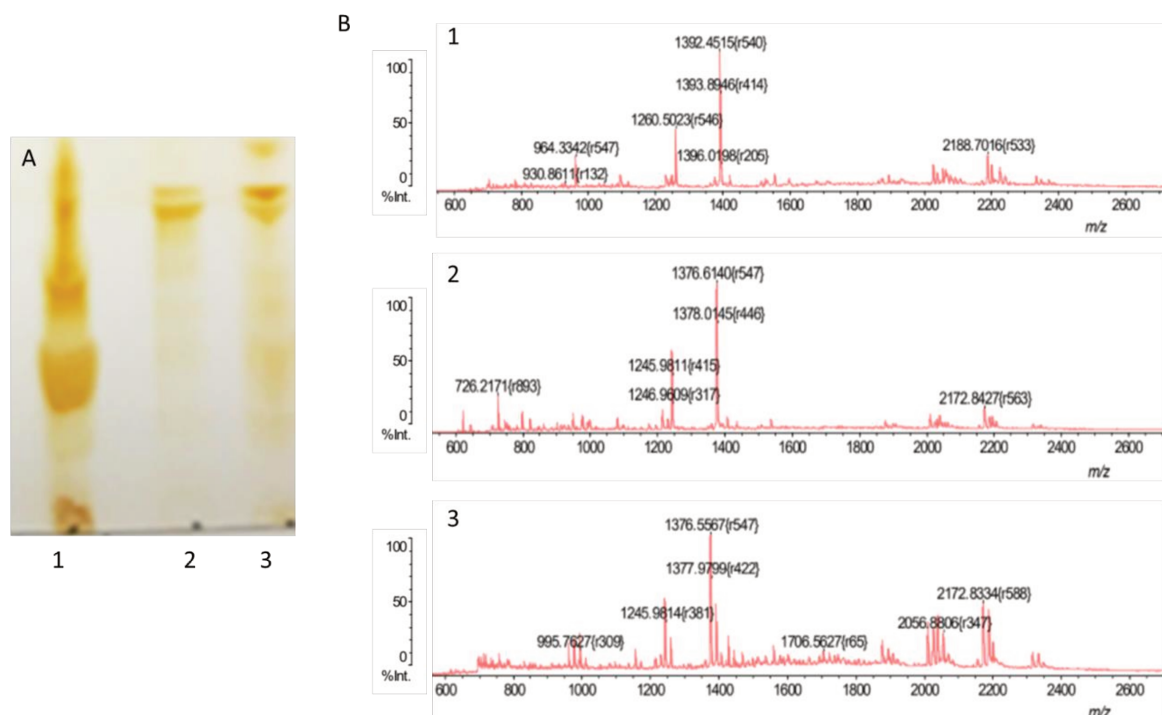
Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism Software 8.0.1 (GraphPad, California, EE. UU.). Las diferencias entre grupos se analizaron aplicando los estadísticos no paramétricos prueba U de Mann Whitney y prueba de Kruskal – Wallis.

### 3.4. RESULTADOS

Como se describe con anterioridad, en la literatura han sido descritos numerosos sistemas de extracción de saponinas como materia prima destinada a usos múltiples (Iglesias & Michaud, 2017; Kensil et al., 1991). También ha sido descritos procesos para la separación de fracciones de saponinas mediante métodos sofisticados que permitieron la caracterización de las mismas con fines inmunológicos (Brunner et al., 2017; Kensil et al., 1996). Sin embargo, los avances no han conducido a procesos de obtención rápidos y económicos que son necesarios para la industria de la vacunología veterinaria. Para dicho fin, en este trabajo hemos evaluado de forma preliminar el uso de metanol como solvente extractivo, como así también procesos de secado mediante evaporación rotatoria (datos no mostrados). Estos procesos no han aportado una mejora en los patrones cromatográficos de los extractos obtenidos. Sin embargo, en forma paralela, evaluamos la utilización de un proceso de diálisis, que nos permitió obtener fracciones de saponinas semirrefinadas en forma rápida. El extracto se obtuvo de forma reproducible, y pudo ser preparado en gran escala de forma económica. A su vez el método utiliza un recurso aprobado en el mercado para la separación de fracciones de interés inmunológico.

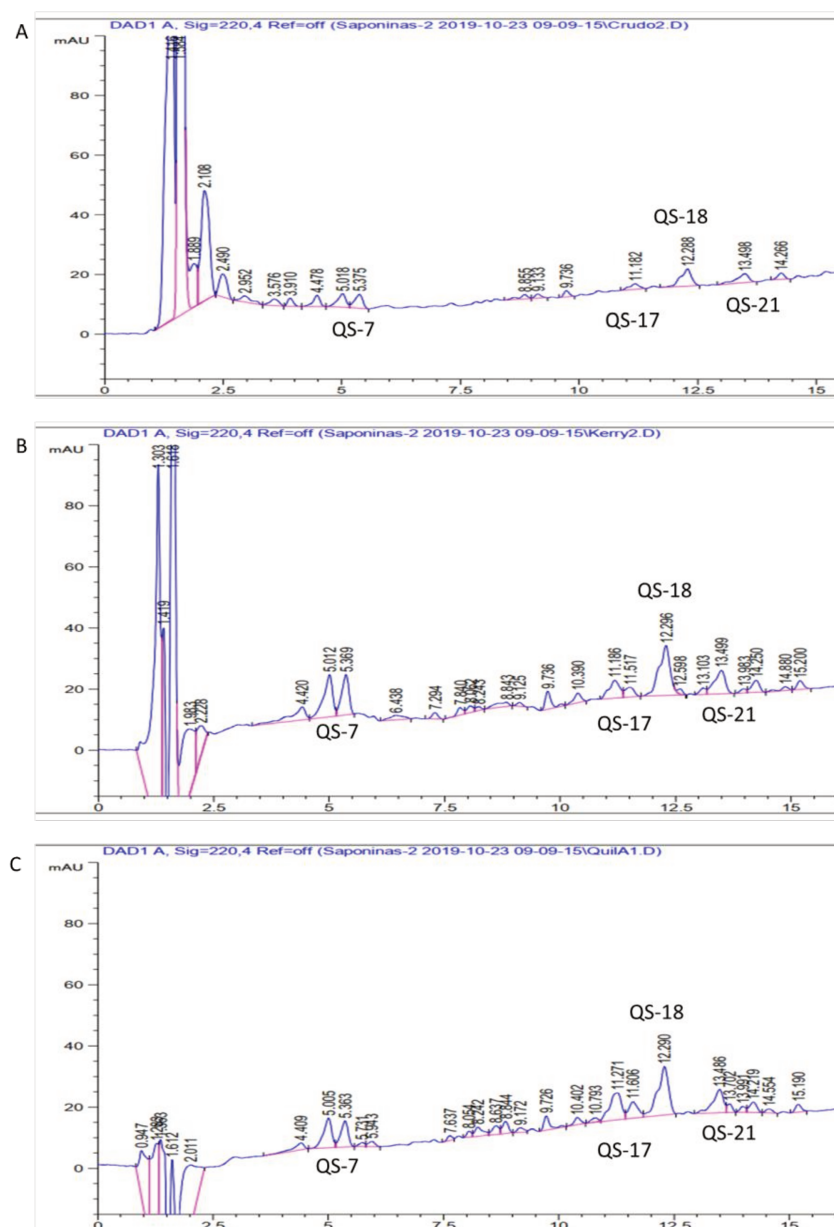
#### 3.4.1. Obtención y caracterización fisicoquímica de saponinas derivadas de *Quillaja saponaria*

El producto comercial Kerry® se utilizó para obtener un extracto semirrefinado de saponinas de *Quillaja saponaria* mediante diálisis. El rendimiento para la obtención de saponina tras la diálisis correspondió a más del 20% del peso seco del extracto comercial no refinado. Se realizó TLC para determinar la identidad y pureza del extracto de saponina obtenido comparándolo con el extracto comercial Quil-A®. Se obtuvo un patrón cromatográfico de bandas muy similar en Quil-A® y el extracto semirrefinado de Kerry® (figura 14). La diferencia en el patrón de TLC antes y después de la diálisis muestra que este proceso permite la eliminación de muchas bandas del extracto no refinado (figura 14 - A). Además, la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF confirmó patrones similares de picos presentes en el extracto de Kerry® no refinado, el semirrefinado y Quil-A® (figura 14 - B). Estos patrones fueron concordantes con los reportados previamente para el análisis de Quil-A® por Cibulski y col. para las regiones espectrales de 750 - 2200 m / z (Cibulski et al., 2017). Cabe aclarar que en el caso de MALDI-TOF es importante la masa de los picos y no la altura ya que esta no tiene correlación con la concentración. La concentración puede estimarse por HPLC tal como se indica a continuación.



**Figura 14:** Análisis de TLC y MALDI-TOF del extracto de Kerry® no refinado, el extracto de saponina obtenido de Kerry® y el extracto comercial Quil-A®. A: Se muestran los carriles de siembra de TLC con N-butanol, etanol, amoníaco y agua como fase móvil, la placa está coloreada con yodo sublimado. El carril 1 corresponde al extracto no refinado, el carril 2 al extracto semirrefinado del producto de la marca Kerry® y el 3 corresponde a la saponina comercial Quil-A®. B, 1, 2, 3: análisis MALDI-TOF de B-1: el extracto de Kerry® no refinado; B-2: el extracto de saponina obtenido de Kerry® y B-3: el extracto comercial Quil-A®.

Mediante la técnica de HPLC obtuvimos un patrón similar al descrito por otros autores para saponinas derivadas de *Quillaja* reportadas (ver figura 15) (San Martín & Briones, 2000). Los picos correspondientes a las fracciones QS-7, QS-17, QS-18 y QS-21 reportados como los principales glucósidos con actividad adyuvante se identificaron de acuerdo con informes anteriores (Brunner et al., 2017; Pham et al., 2009; San Martín y Briones, 2000). El análisis de HPLC reveló que la concentración relativa de fracciones de saponina en el extracto semirrefinado de Kerry® era mayor que en el extracto no refinado (figura 15). Cuando se analizó el área bajo la curva (AUC) del espectro de absorbancia del frente de corrida correspondiente a polifenoles y taninos (San Martín & Briones, 2000), se determinó que el extracto no refinado presenta una gran absorción mientras que el extracto semirrefinado presenta un AUC menor, similar a los valores de AUC de Quil-A®.



**Figura 15:** HPLC analítica realizada para las diferentes saponinas: cromatogramas del extracto no refinado de Kerry® (A), el semirrefinado de Kerry® (B) y el producto comercial Quil-A®(C).

Además, para evaluar las concentraciones relativas de saponinas presentes en el extracto comercial no refinado, el extracto dializado y Quil-A®, se calcularon las áreas bajo la curva de los picos correspondiente al tiempo de retención comprendido entre los minutos 5 y 15 para cada uno de ellos (tabla 1). Se puede observar que la cantidad de saponinas se incrementó mucho en el extracto dializado en relación al extracto no refinado, y que esta cantidad fue similar a la obtenida con el extracto Quil-A®. Cuando se analizó el AUC correspondiente a QS-7, QS-17, QS-18 y QS-21 en el espectro UV, se determinó que los porcentajes de estas fracciones del extracto semirrefinado son similares en mayor medida a los presentados por el producto comercial Quil-A® que a los del extracto no refinado (tabla 2).

**Tabla 1:** Porcentaje de AUC del espectro de absorbancia de HPLC correspondiente al frente de corrida y a los picos de interés de saponinas en relación con el AUC total en cada extracto.

<i>Saponinas</i>	<b>AUC (%) total con el contenido de polifenoles</b>	<b>AUC (%) total de fracciones de interés</b>
<i>Kerry® no refinado</i>	96,99%	2,39%
<i>Kerry® semirrefinado</i>	75,72%	16,23%
<i>Quil-A®</i>	74,60%	22,45%

**Tabla 2:** Porcentaje de AUC del espectro de absorbancia de HPLC correspondiente a las fracciones QS-7, QS-17, QS-18 y QS21 en relación al AUC total determinado por HPLC en cada extracto.

<i>Saponinas</i>	<b>Fracción de Interés</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>AUC (%)</b>	<b>Concentración estimada (%) en relación a Quil-A®</b>
<i>Kerry® no refinada</i>	<b>QS-7</b>	5.01	0.9457	14,70%
<i>Kerry® semirrefinada</i>	<b>QS-7</b>	5.00	6.53	101,55%
<i>Quil-A®</i>	<b>QS-7</b>	5.00	6.43	100,00%
<i>Kerry® no refinada</i>	<b>QS-17</b>	12.28	0.74	9,67%
<i>Kerry® semirrefinada</i>	<b>QS-17</b>	11.18	1.84	38,81%
<i>Quil-A®</i>	<b>QS-17</b>	11.27	4.74	100,00%
<i>Kerry® no refinada</i>	<b>QS-18</b>	12.28	0.74	9,67%
<i>Kerry® semirrefinada</i>	<b>QS-18</b>	12.29	5.39	70,45%
<i>Quil-A®</i>	<b>QS-18</b>	12.29	7.65	100,00%
<i>Kerry® no refinada</i>	<b>QS-21</b>	13.49	0.46	12,74%
<i>Kerry® semirrefinada</i>	<b>QS-21</b>	13.49	2.45	38,82%
<i>Quil-A®</i>	<b>QS-21</b>	13.48	3.61	100,00%

### 3.4.2. Formulación de partículas adyuvantes tipo ISPA con saponinas refinadas a partir del extracto Kerry®

Con el extracto de saponina obtenido se prepararon jaulas lipídicas siguiendo el método descrito en Bertona y col. 2017 tal como se describió previamente (Bertona et al., 2017). Mediante la caracterización obtenida por la técnica DLS, se observó una distribución de tamaños con una población principal por debajo de 100 nm. El porcentaje estimado de nanopartículas con tamaños mayores a 100 nm resultó menor al 1.6%. La distribución exhibió

un tamaño medio en número:  $D_{1,0} = 57.2$  nm.

Tal como se menciona en la introducción, una de las características de las saponinas es su toxicidad. Para determinar las actividades hemolíticas de las saponinas libres y la toxicidad in vitro de las partículas obtenidas cargadas con saponina, se realizó una titulación de la actividad hemolítica obtenida con el extracto de Kerry® dializado, el producto comercial Quil-A® y las partículas ISPA formuladas con estas saponinas. La concentración mínima con la que Quil-A® presentó hemólisis fue de  $3,9 \mu\text{g} / \text{ml}$  (ver figura 16), mientras que el extracto de Kerry® presentó hemólisis con concentraciones de hasta  $7,8 \mu\text{g} / \text{ml}$ , siendo por lo tanto menos hemolítica. Las saponinas cargadas en nanopartículas disminuyeron sus niveles de hemólisis, requiriendo una concentración de  $125 \mu\text{g} / \text{ml}$  de extracto de Kerry® semirrefinado cargado en partículas ISPA y  $62,44 \mu\text{g} / \text{ml}$  de Quil-A® cargado en partículas ISPA original, respectivamente, para lograr la hemólisis. Esto está de acuerdo con estudios previos que indican que la incorporación de saponinas en partículas similares a jaulas reduce su toxicidad (Sun et al., 2009). Es interesante que el agregado de la misma cantidad en masa de extracto semirrefinado que de Quil-A® genera una menor hemólisis siendo esta al menos de un título menos. Este resultado permite ensayar mayores concentraciones de partículas para ser usadas como adyuvantes.



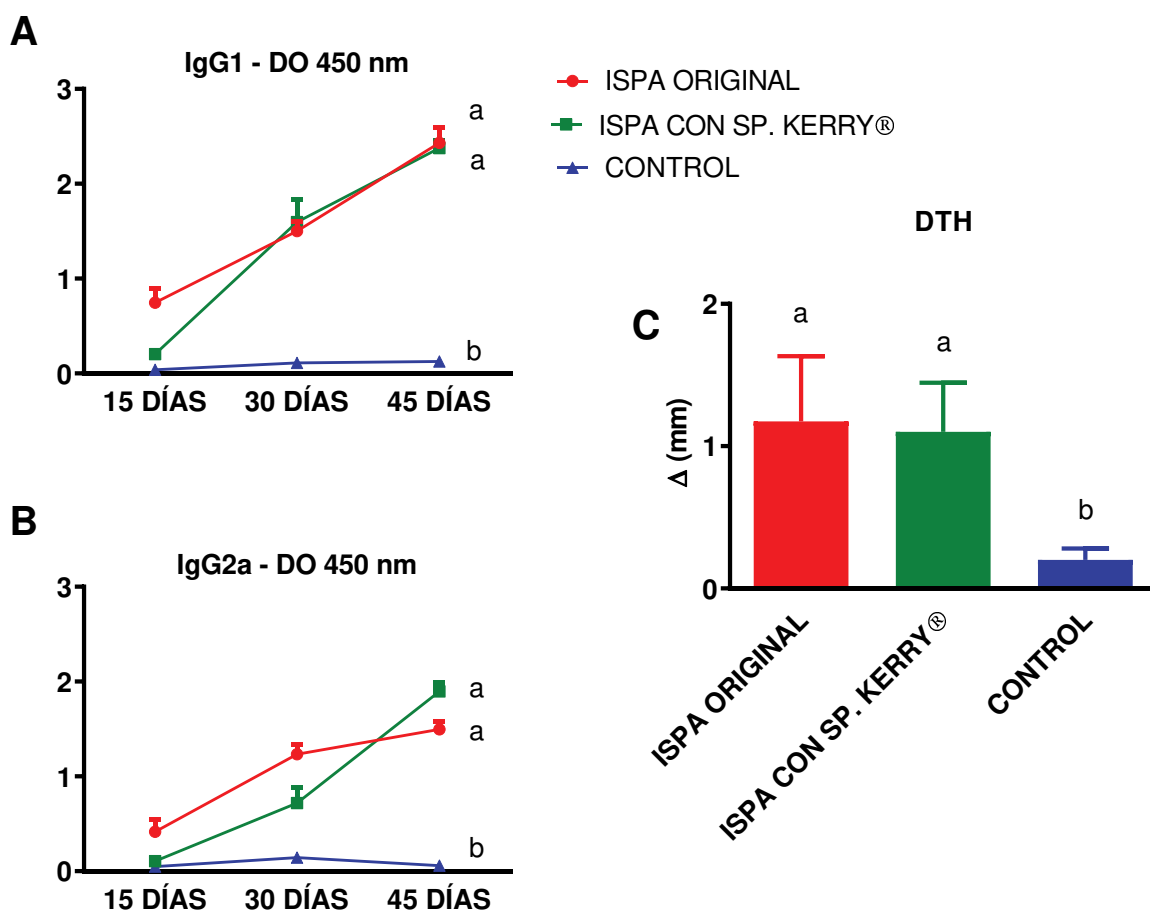
**Figura 16:** Titulación de hemólisis de Quil-A®: en la figura se observa una curva de titulación de lisis de glóbulos rojos humanos al 0,4 % en solución fisiológica que fueron confrontados con distintas diluciones de saponinas. Las concentraciones se encontraban en el rango de  $250 - 0,015 \mu\text{g}/\text{ml}$  desde el tubo 1 al tubo 15.

### 3.4.3. Evaluación del desempeño inmunológico

Para la determinación de respuesta inmunológica humoral, se inmunizaron ratones con los ISPA preparados con extracto semirrefinado Kerry® y Quil-A® formulados con OVA o PBS tal como se describe previamente. Se obtuvieron muestras de plasma dos semanas luego de cada inmunización y se analizaron mediante ELISA indirecto. Se analizó el desempeño de las distintas formulaciones y se observó, para ambos adyuvantes, niveles de IgG1 e IgG2a específicas que no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre ellos pero sí con el grupo control (la relación a-b indica  $p < 0,05$ ) (figura 17), posteriormente se realizó el análisis del

área bajo la curva (AUC) para ambos anticuerpos (ver tabla 3 y 4).

La prueba de DTH, permitió determinar la respuesta inmunológica celular. No se observó diferencia significativa entre las dos formulaciones adyuvantes (la relación a-a indica  $p > 0,05$ ), siendo la respuesta DTH de ambas formulaciones significativa en relación al grupo control (la relación a-b indica  $p < 0,05$ ) (figura 17).



**Figura 17:** Evaluación funcional del nuevo adyuvante obtenido: utilizando ovoalbúmina como antígeno modelo, se comparó el desempeño de ISPA original con ISPA preparado con extracto semirrefinado Kerry®. Sobre cada muestra se determinaron los niveles de A) IgG1 y B) IgG2a específicas anti-OVA en sueros mediante ELISA indirecto. Para ambos adyuvantes se observaron niveles de IgG1 e IgG2a específicas que no presentaron diferencia significativa entre ellos y sí con el grupo PBS (la relación a-b indica  $p < 0,05$ ); C: La respuesta inmunológica de tipo celular que generan ambos tipos de partículas se confirmó en los grupos de estudio, evidenciándose una respuesta inflamatoria significativa respecto del grupo CONTROL tratado con PBS (la relación a-b indica  $p < 0,05$ ).



**Tabla 3:** Estadística de las áreas bajo la curva (AUC) para IgG1.  
Se determinaron las AUC para la cinética de IgG1 obtenidos para cada adyuvante.

<i>AUC para IGg1</i>	<b>ISPA ORIGINAL</b>	<b>ISPA CON SP. KERRY®</b>	<b>CONTROL</b>
<i>Área Total</i>	3,091	2,886	0,1938
<i>Error Estándar</i>	0,2586	0,3847	0,05395
<i>Intervalo de confianza (95%)</i>	2,584 a 3,597	2,132 a 3,640	0,08807 a 0,2995

**Tabla 4:** Estadística de las áreas bajo la curva (AUC) para IgG2a.  
Se determinaron las AUC para la cinética de IgG2a obtenidos para cada adyuvante.

<i>AUC para IGg2a</i>	<b>ISPA ORIGINAL</b>	<b>ISPA CON SP. KERRY®</b>	<b>CONTROL</b>
<i>Área Total</i>	2,190	1,719	0,1966
<i>Error Estándar</i>	0,2128	0,2816	0,05305
<i>Intervalo de confianza (95%)</i>	1,773 a 2,607	1,167 a 2,271	0,09262 a 0,3006

### 3.5. DISCUSIÓN

Como parte de este trabajo, se propuso utilizar una fuente de bajo costo de saponinas de *Quillaja saponaria* que permitan reducir el precio final de la formulación adyuvante ISPA sin afectar su desempeño.

Las saponinas de *Quillaja saponaria* se han estudiado durante más de cuatro décadas para ser utilizadas en aplicaciones industriales. Sus características notables se basan en sus actividades biológicas, especialmente sus propiedades adyuvantes e inmunoestimulantes, que han llevado a importantes investigaciones en el campo del desarrollo de vacunas (Fleck et al., 2019). Estas saponinas extraídas de fuentes naturales presentan diferentes componentes, siendo los principales QS-7, QS-17, QS-18 y QS-21 (Kensil, 2001; Kensil et al., 1991, 1996; Kensil & Marciani, 1991). Quil-A® es un extracto comercial muy utilizado para la fabricación de vacunas por su buen desempeño como inmunoestimulante (Magedans et al., 2019). Este extracto se obtiene mediante procesos de purificación, como el intercambio iónico, que aseguran un excelente estándar de calidad pero encarecen su obtención (Dalsgaard, 1974, 1978).

En este trabajo, se utilizó como material de partida el extracto no refinado de Kerry® de *Quillaja saponaria* que se comercializa comúnmente para uso en la industria alimentaria y es de bajo costo. Para la purificación se buscó utilizar métodos de bajo costo y complejidad que no encarezcan el proceso de obtención. Originalmente se ensayaron métodos de purificación alcohólica, pero su rendimiento no fue óptimo (resultado no mostrado). Llamativamente, el método que resultó adecuado fue mediante una diálisis y liofilización de este extracto, con el cual hemos obtenido una fracción que contiene patrones cromatográficos y de MALDI-TOF muy similares a los que presenta el extracto comercial Quil-A® ampliamente usado en vacunas veterinarias y que presenta las saponinas de interés inmunológico. Los principales picos presentes en el extracto de Quil-A® corresponden a QS-7, QS-17, QS-18 y QS-21, los cuales fueron confirmados por HPLC y también cuantificados en forma relativa a la absorbancia total.

De esta forma, se logró semi-refinar y concentrar exitosamente estas saponinas del extracto de Kerry® usando un método de diálisis simple, recuperando niveles similares a los presentes en Quil-A®. El rendimiento obtenido fue superior al 20% de la masa seca inicial del extracto de Kerry®. La obtención de saponinas a partir del extracto de Kerry® no refinado reduce considerablemente los costos teniendo en cuenta que Quil-A® es 16 veces más caro que Kerry®.

Al analizar la respuesta humoral y DTH en ratones inmunizados con ovoalbúmina y el adyuvante, se determinó que las saponinas semirrefinadas extraídas de Kerry® eran capaces de generar una respuesta inmune similar a la obtenida con el componente comercial Quil-A®. Se pudo observar una respuesta de IgG2a ligeramente mayor para el adyuvante ISPA con saponina Kerry® que para ISPA original aunque no significativa. Teniendo en cuenta que la presencia de

este isotipo es indicativa de una respuesta de tipo Th1, que es importante para la resolución de muchos tipos de infecciones y en particular de microorganismos intracelulares (Lazarevic & Glimcher, 2011), este resultado es de interés. Además, la respuesta de hipersensibilidad retardada fue notable con ambas formulaciones, observándose una inflamación mensurable 48 horas después de la inoculación con ovoalbúmina. Este resultado indica una fuerte respuesta celular contra el antígeno inoculado promovida por el adyuvante. También es compatible con el perfil de respuesta Th1 indicado anteriormente en base a la respuesta del isotipo de anticuerpos IgG2a. Analizando los resultados en conjunto, podemos afirmar que el adyuvante ISPA original, previamente descrito en nuestro laboratorio y el mismo adyuvante ISPA, formulado con la saponina derivada de la diálisis presentan un desempeño similar, no observándose diferencias significativas entre grupos ( $p > 0,05$ ).

### **3.6. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 1**

- ❖ Los resultados descritos en este capítulo demuestran que podrían obtenerse vacunas que reproduzcan el perfil y magnitud de la respuesta inmune de las partículas tipo jaula si se reemplaza la saponina Quil-A® por una de bajo costo en la preparación de las mismas.
- ❖ El extracto de saponina obtenido constituye un insumo muy prometedor para la preparación de adyuvante ISPA y el consiguiente desarrollo de vacunas veterinarias contra una amplia variedad de patógenos a un valor competitivo en el mercado.

## **4. CAPÍTULO 2**

**Desarrollo de un proceso de obtención de lípidos y de la obtención de jaulas lipídicas para reducir los costos del adyuvante ISPA.**

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

Las jaulas lipídicas usadas como adyuvantes se basan en una partícula formulada a partir de saponinas, fosfolípidos, colesterol y antígenos hidrofóbicos asociados en una sola nanoestructura. Son partículas coloidales simétricas con una estructura similar a una jaula abierta en el rango de tamaño de 40 a 100 nm (G. F. A. Kersten et al., 1991; Özel et al., 1989) que normalmente tienen una carga neta negativa a pH fisiológico debido al componente de ácido glucurónico en Quil-A® (Pedersen et al., 2012). Las mismas se denominaron ISCOM cuando se describió su uso para adyuvante de vacunas por primera vez en 1984 (Morein et al., 1984).

Para su obtención se desarrollaron una amplia variedad de métodos, como la ultracentrifugación (Morein et al., 1984), la diálisis (Höglund et al., 1989), la hidratación de la película lipídica (Copland et al., 2000) y la inyección de etanol (Lendemans et al., 2005b). El método descrito originalmente para la preparación de ISCOM basado en la ultracentrifugación (Morein et al., 1984) se basó en la presencia de lípidos y antígenos que se extraían conjuntamente de organismos completos. Requiere esencialmente de cuatro pasos. En primer lugar, las proteínas solubilizadas y los lípidos extraídos se centrifugan a través de un gradiente de sacarosa que contiene saponinas derivadas de *Quillaja* y un detergente no iónico (por ejemplo, Tritón-X). En segundo lugar, las fracciones que contienen ISCOM se eliminan del gradiente de sacarosa y se agrupan. En tercer lugar, las saponinas libres se eliminan de la formulación mediante ultracentrifugación a través de un gradiente de sacarosa para sedimentar los ISCOM. Finalmente, la sacarosa se elimina mediante un paso de diálisis (Myschik et al., 2006). Posteriormente se desarrolló el método de diálisis, mediante el cual los componentes lipídicos se solubilizan con la ayuda de un tensioactivo no iónico adicional como octilglucósido o MEGA-10 que son dializables. Tras la adición de proteínas solubilizadas y saponinas de *Quillaja*, el tensioactivo se elimina mediante una diálisis extensa (Höglund et al., 1989). Otro método descrito fue el del film lipídico que se basa en una adaptación de la técnica de preparación de liposomas de Bangham (Bangham et al., 1965). La preparación se logra mediante evaporación por cloroformo de películas o films secos de colesterol y fosfatidilcolina que posteriormente se hidratan mediante la adición de una solución acuosa de Quil-A® (Copland et al., 2000). Similar a esta técnica ha sido un método para la preparación de las jaulas lipídicas a partir de lípidos en polvo obtenidos mediante mezcla física de una dispersión acuosa de los lípidos que luego se hidratan en presencia de saponina (Demana et al., 2005). Una técnica diferente de preparación ha sido disolver el colesterol y la fosfatidilcolina en etanol y luego inyectar la solución resultante rápidamente en una solución acuosa agitada de la mezcla de la saponina Quil-A®, siendo esta una adaptación de la técnica de inyección de etanol descrita para la preparación de liposomas unilamelares (Batzri & Korn, 1973; Pons et al., 1993). En forma

inversa a este método, también se ha descrito el agregado de la solución acuosa de Quil-A® a una solución de colesterol y fosfatidilcolina disuelta en etanol (Lendemans et al., 2005b). La técnica de dispersión de solventes, específicamente la inyección de éter, que se ha utilizado con éxito en la preparación de liposomas, se ha descrito como un método potencialmente escalable para la preparación de ISCOMs (Pham et al., 2006). Este método se basa de nuevo en un método análogo para la preparación de liposomas (Hope et al., 1986) y es una variación del método de inyección de etanol. Finalmente, podemos mencionar la técnica optimizada por este equipo de trabajo, a partir de precursores liposomales detallada por Bertona et.al., 2017 (Bertona et al., 2017), a partir de la cual se forman liposomas que luego se cargan con una solución acuosa de *Quillaja saponaria*.

Actualmente se sabe que los diferentes métodos dan como resultado una dispersión coloidal, pero con diferencias en la homogeneidad, la aparición de otras estructuras particuladas y el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio en el proceso. Además, las estructuras coloidales resultantes dependen no solo del método de preparación sino también de las proporciones de los diversos componentes que se debe ajustar para cada método en particular (Pedersen et al., 2012). A título de ejemplo, podemos mencionar distintos trabajos en donde se utilizan distintas técnicas de preparación con los mismos componentes pero en proporciones diferentes para obtener las partículas (Copland et al., 2000; Höglund et al., 1989; Lendemans et al., 2005b). En la tabla 5 se muestra una comparación bibliográfica que hemos realizado para esta tesis analizando la metodología descrita en los trabajos mencionados (tabla 5).

**Tabla 5:** Comparación de relación entre los componentes de las nanopartículas según el método de formulación expresados en mg/ml de partículas (Copland et al., 2000; Höglund et al., 1989; Lendemans et al., 2005b)

	ISPA		Inyección etanol		Diálisis		Film lipídico	
	mg/ml	Relación	mg/ml	relación	mg/ml	relación	mg/ml	Relación
<i>Quil-A®</i>	6,48	5,83	1,33	5,15	1	1	1,67	0,83
<i>Fosfolípidos</i>	2,22	2	0,507	2	1	1	4,7	2,35
<i>Colesterol</i>	1,11	1	0,258	1	1	1	2	1

Para algunas de estas técnicas, se han ensayado en forma exhaustiva la relación de cantidades necesarias para formar las jaulas lipídicas. En este sentido el trabajo de Demana et.al., 2005 (Demana et al., 2005), detalla claramente como la variabilidad de las proporciones, condiciona el tipo de nanopartículas formadas. En parte, por esta razón, la composición relativa de los componentes de las partículas ha sido modificada en distintos trabajos en función del tipo de lípidos y el método de preparación utilizado. Entre otros, se han utilizado fosfolípidos tales

como fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (Demana et al., 2004) di-oleoil-fosfatidilcolina y di-lauril-fosfatidilcolina (Friede & Garcon, 2003), el lípido catiónico dioleoil-trimetil-amonio-propano (Lendemans et al., 2007) y di-palmitoil-fosfatidilcolina (Bertona et al., 2017; Groot et al., 2019) como fosfolípidos alternativos. En este sentido, estudios recientes indican que los lípidos de origen natural (animales vs vegetales) difieren significativamente en su composición. Por ejemplo, la lecitina de yema de huevo contiene 73–74 % del fosfolípido fosfatidilcolina, mientras que la soja solo 21–22%. La lecitina de yema de huevo contiene significativamente menos fosfatidilinositol (0,4–1 %) en tanto que las de soja contiene más (12–20 %). Además, la lecitina de yema de huevo no contiene ácido fosfatídico, mientras que la soja contiene 5-6% (Bryła et al., 2015). Para el caso de los sistemas de administración basados en liposomas, que tienen características similares a las jaulas lipídicas, se ha descrito que la composición del tipo de lecitina influye en la formación, la estabilidad, las propiedades y el rendimiento funcional. Por ejemplo, el tipo de grupo de cabeza hidrofóbica determina las características eléctricas de los liposomas (es decir, carga frente a pH), mientras que el tipo de grupo de cola hidrofílica (longitud de cadena e insaturación) determina la reología, la permeabilidad y la solubilización de la membrana. El tipo y el nivel de esteroides (como el colesterol) presentes también influyen en la fluidez y permeabilidad de la membrana, lo que afecta su capacidad para encapsular, retener y liberar bioactivos hidrofílicos (McClements, 2015). Estas características son fundamentales a la hora de interpretar los resultados, dado que cantidades específicas de determinados fosfolípidos en las lecitinas, como así también su composición de ácidos grasos, darán lugar a características diferentes en las estructuras liposomales, y en nuestro caso a las nanopartículas que se formen a partir de ellos.

Los resultados obtenidos a partir de los antecedentes mencionados, dieron lugar a un amplio conocimiento de la versatilidad de estas nanopartículas y las diferentes alternativas de su obtención. Sin embargo, no se ha resuelto uno de los mayores inconvenientes de la formulación, y quizás el más importante para su llegada al mercado en términos de vacunología veterinaria, que son los costos de insumos y del proceso de producción. Por este motivo, hemos trabajado sobre obtención de reactivos de bajo costo y la optimización de los métodos que permiten obtener partículas tipo caja con los mismos. Para este fin, se ensayaron distintas fuentes de provisión de fosfolípidos, y se combinaron con las saponinas obtenidas y caracterizadas en el capítulo 1. Entre los fosfolípidos utilizados como alternativas a DPPC utilizado en Bertona y col. 2017 (Bertona et al., 2017), podemos mencionar HSPC (fosfatidilcolina de soja completamente hidrogenada) (Naziris et al., 2017). Este fosfolípido ha sido utilizado como alternativa en la formulación de liposomas de uso transdermal en estudios recientes (Liu et al., 2021; Naziris et al., 2017) y también se ha descrito su uso en patentes que lo utilizan como componente de vacunas (Geall & Settembre, 2018). Sin embargo, no se ha descrito su uso en



nanopartículas tipo ISCOM, por lo que resultó de gran interés para evaluar su desempeño dado que es un fosfolípido de menor costo que DPPC. Como alternativa al uso de lípidos comerciales, para reducir los costos del adyuvante en mayor medida, se consideró el uso de fosfatidilcolina de soja obtenida por procesos de extracción simples (Kondratowicz et al., 2018) a partir de residuos de la industria que pudieran aprovecharse, ya que además existen estudios de formulación de liposomas a partir de estas y su posterior caracterización (Bryła et al., 2015, 2017). Finalmente, los lípidos derivados de yema de huevo han supuesto una de las mejores alternativas, dado que otros autores han reportado estudios sobre métodos versátiles de purificación de lípidos y formulaciones liposomales a partir de ellos (Kondratowicz, Dopierała, et al., 2019; Kondratowicz et al., 2018; Kondratowicz, Weiss, et al., 2019). Sin embargo, tampoco estos han reportado su uso en nanopartículas inmunoestimulantes por lo que nos planteamos la hipótesis de que el uso de fosfolípidos y colesterol extraídos a partir de la yema de huevo podría ser una fuente económica y efectiva para la preparación del adyuvante. Por otra parte, hemos ensayado distintos métodos de producción de las mismas. Inicialmente, se utilizaron técnicas basadas en microfluídica, a fin de usar dispositivos de mezcla continua que nos permitiesen combinar proporciones conocidas de una fracción acuosa y otra lipídica en solución. Sin embargo, la puesta en marcha del sistema, como así también el control de las temperaturas, han supuesto dos variables de difícil control, lo que finalmente indicó una baja factibilidad del uso de dicha metodología. Por eso, como método alternativo al precursor liposomal descrito en (Bertona et al., 2017) para la obtención de jaulas lipídicas, hemos evaluado el método de inyección alcohólica (Lendemans et al., 2005b).

Como resultado de estos estudios, hemos obtenido una nueva formulación de partículas tipo jaula que hemos llamado ISPA YOLK, formuladas con un extracto de lípidos a base de yema huevo y saponina semirrefinada del extracto Kerry® que permite un desempeño similar al ISPA original y puede prepararse a un muy bajo costo.

#### **4.2. OBJETIVO ESPECÍFICO**

- ❖ Evaluar lípidos de diferentes fuentes tales como fosfolípidos comerciales, naturales o de residuos industriales que permitan la obtención de jaulas lipídicas y reduzcan el costo de su preparación.

### **4.3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.3.1. Obtención de nuevas fuentes de lípidos**

##### **4.3.1.1. Obtención y caracterización de lípidos derivados de soja**

Para obtener fracciones de fosfolípidos ricas en fosfatidilcolina (PC) para la fabricación del adyuvante se han ensayado extracciones sucesivas del residuo del desgomado de aceite de soja empleando como solventes extractores alcoholes y acetona. El residuo del cual se partió es el proveniente de la primera etapa de desgomado del aceite, el cual comúnmente se denomina “goma”, cuya composición promedio es de 40% agua, 38% de fosfolípidos, 20% de aceite y 2% de otras impurezas. Como primer paso, este residuo se secó para obtener una “lecitina” con una composición promedio de 68% fosfatidilcolina (PL), 31% de aceite y 1% de otras impurezas. La obtención de la fosfatidilcolina se basó en una extracción por solventes alcohólicos haciendo uso de la solubilidad selectiva de los fosfolípidos en distintos solventes. Como parámetros de estudio se varió el orden en que fueron empleados los solventes, la proporción de los mismos y además se comparó el poder extractor de los diferentes alcoholes entre sí (metanol (MeOH) etanol (EtOH) e isopropanol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O)). Se optimizaron finalmente dos protocolos en base a la extracción con etanol, que fue el alcohol que mejores resultados mostró. Brevemente, para iguales muestras de lecitina de soja se utilizó como alternativa 1; una relación etanol 96%: lecitina de 3:1 v/w. poniendo en agitación a 65°C por 60 minutos un volumen de EtOH de 80 ml y 26,9436 g de Lecitina. La fracción soluble en etanol se llevó luego a evaporación y posteriormente se la sometió a una segunda etapa de extracción con acetona (extracto 1) de forma de extraer cualquier presencia de lípidos neutros que pudieron ser extraídos con la primera etapa. Por otro lado, se utilizó el mismo protocolo antes descripto pero empleando etanol anhidro (extracto 2).

##### **4.3.1.2. Análisis cualitativo y cuantitativo de lípidos derivados de soja**

###### **4.3.1.2.1. Lípidos neutros**

Los extractos de lípidos se analizaron mediante métodos de TLC en gel de sílice publicados anteriormente (Furland et al., 2003). Se usaron placas de sílica gel con base de aluminio, (TLC Sílica gel 60 F254 20 x 20 cm) marca Merck® sobre las cuales se sembraron las muestras diluidas en hexano en una proporción 1:100. La fase móvil utilizada estuvo compuesta por Hexano: Éter Etilico: Ácido Acético (80:20:1 v/v/v). Las placas se revelaron con vapores de yodo. Con esta técnica solo se determinó en forma cualitativa los lípidos neutros presentes en las fracciones analizadas. El porcentaje en que estos estaban presentes se determinó por diferencia entre el 100% y el porcentaje de fosfolípidos totales.

#### 4.3.1.2.2. Determinación de fósforo lipídico

Se determinó el contenido de fósforo según Norma AOCS Ca 12-55, en donde el fósforo contenido en la muestra es transformado en un ion complejo (fosfo-molibdato) y cuantificado mediante medición de absorbancia (fotocolorimetría). El contenido de fósforo obtenido se afecta por un factor de 31,7; obteniéndose así el contenido de fosfolípidos, según G. R. List y colegas. (G .R. List et al., 1977).

#### 4.3.1.2.3. Fosfolípidos

Las muestras fueron analizadas según Norma AOCS Ja 7-86 (Phospholipids in Lecithin Concentrates by Thin-Layer Chromatography). Para ello se usaron placas de sílica gel con base de aluminio, (TLC Sílica gel 60 F254 20 x 20 cm) marca Merck®, sobre las cuales se sembraron las muestras diluidas en hexano en una proporción 1:100. Las corridas cromatográficas se realizaron en dos dimensiones utilizando las siguientes fases móviles, A: Cloroformo: Metanol: Hidróxido de amonio 7N (130:60:8 v/v/v); B: Cloroformo: Metanol: Ac. Acético: Agua (170:25:25:6 v/v/v/v). El revelado de las placas fue realizado con vapores de yodo.

Para la cuantificación de los fosfolípidos individuales se corrieron las muestras en una dimensión usando la Fase Móvil B: Cloroformo: Metanol: Ac. Acético: Agua (170:25:25:6 v/v/v/v). La cuantificación de los fosfolípidos individuales se realizó mediante la densitometría cromatográfica planar empleando un sistema de análisis de imágenes. El Software utilizado fue ImajeJ. Este software transforma en datos numéricos las intensidades obtenidas en la placa de TLC, los cuales luego pueden graficarse y realizar la identificación y cuantificación relativa de los picos presentes.

Específicamente, desde el software ImageJ, a partir de la placa de TLC, se obtiene una tabla de datos, en la cual se relacionan las intensidades detectadas, y la longitud de la placa. Luego dichos datos son trasladados a un Excel, para poder graficarlos y obtener así los valores de áreas de los picos. Se obtienen los valores de áreas de todos los picos, para poder luego hacer la relación de los picos correspondientes a compuestos de interés con respecto al total, según la Ecuación 1.

$$\% \text{ compuesto de interés} = \frac{\text{Área}_{\text{compuesto de interés}}}{\Sigma \text{Área}_{\text{compuestos}}} \quad (1)$$

#### 4.3.1.2.4. Perfil de Ácidos Grasos de los fosfolípidos totales del extracto obtenido

Para la realización de este estudio se le realizó una metanólisis alcalina para obtener los metilésteres de los ácidos grasos, de acuerdo a la norma IRAM 5652 (Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos de aceites y grasas vegetales y animales). La reacción consiste en poner los fosfolípidos en contacto con metanol y un catalizador básico a 60°C por 1 hora. Estos

se analizaron por cromatografía gaseosa según la norma IRAM 5651 (Determinación del perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa de sus ésteres metílicos).

#### **4.3.1.3. Obtención y caracterización de lípidos derivados de yema de huevo**

Se utilizaron yemas de huevo de gallina para obtener lípidos como se describe en Su et al. (Su et al., 2015) con algunas modificaciones. Brevemente, se añadió etanol de 96° a la yema de huevo (10 ml / 1 g de yema en base húmeda) y se agitó manualmente cada 10 minutos a 60-65 °C durante 90 minutos. La fracción insoluble se separó mediante centrifugación a 2800 x g durante 5 minutos en una centrífuga refrigerada a 4°C. Para precipitar triacilglicéridos (TAG), el extracto soluble en etanol se colocó en un congelador a -18 °C durante 12 horas y luego se centrifugó a 4 °C. La fracción soluble se sometió a evaporación rotatoria para eliminar los residuos de etanol, luego se liofilizó. Con fines comparativos, se extrajeron los lípidos totales de huevos de gallina utilizando un método clásico de Bligh y Dyer, 1959 (Bligh & Dyer, 1959).

#### **4.3.1.4. Análisis cualitativo y cuantitativo de lípidos**

Las muestras liofilizadas se disolvieron en cloroformo: metanol (2: 1, en vol.) y se tomaron alícuotas para análisis de lípidos y determinación de proteínas.

##### **4.3.1.4.1. Lípidos neutros**

Los extractos de lípidos se analizaron mediante métodos de TLC en gel de sílice como se describe con anterioridad (Furland et al., 2003). Se colocaron alícuotas de cada extracto de lípidos en placas de TLC de gel de sílice G y se corrieron con una mezcla de solventes; hexano: éter: ácido acético (80: 20: 1, en vol.) hasta la parte superior para resolver dialciliglicéridos (DAG), colesterol (Cho), ácidos grasos libres (AGL), triacilglicéridos (TAG) y ésteres de colesterol (EC). Después de la TLC, las zonas que contienen los lípidos de interés se localizaron con vapores de yodo o bajo luz ultravioleta después de pulverizar con 2', 7'-diclorofluoresceína en metanol y se rasparon en tubos para elución. Las bandas que contenían DAG, AGL, TAG, EC y las que contenían lípidos polares, principalmente glicerofosfolípidos en el origen de las placas, se recuperaron para análisis adicionales de composición de ácidos grasos. Esto se realizó mediante 3 extracciones sucesivas del soporte de sílice con cloroformo: metanol: agua (5: 5: 1, en vol.) centrifugando, recogiendo los disolventes y repartiendo con cuatro volúmenes de agua para recuperar los lípidos. El contenido de DAG, AGL, TAG se determinó mediante cromatografía de gases (GC) después de la conversión de los lípidos eluidos y secados en metilésteres de ácidos grasos (FAME). Estos se prepararon mediante trans-esterificación con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 N en metanol anhidro bajo N<sub>2</sub> (durante la noche a 45°C) en tubos con tapa de rosca revestidos con Teflon®. Alternativamente, el contenido de TAG se midió con un ensayo enzimático (Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina, 2020).

#### **4.3.1.4.2. Fosfolípidos**

La composición de la clase de fosfolípidos se determinó después de la separación en gel de sílice preparativo bidimensional H (Merck®, Alemania) con placas de TLC de acetato de magnesio al 3% (2D-TLC). Brevemente, se colocaron alícuotas de extractos de lípidos en placas de TLC bajo nitrógeno, luego las placas se desarrollaron en la primera dimensión con cloroformo: metanol: amoníaco acuoso (65: 25: 5, en vol.), luego se desarrollaron con cloroformo: acetona: metanol: ácido acético: agua (30: 40: 10: 10: 4, en vol.) en la segunda dimensión. Las placas de TLC se secaron en una cámara bajo nitrógeno y luego se revelaron. Después de localizar los fosfolípidos con vapores de yodo, la porción de gel de sílice que contenía cada clase de fosfolípido se transfirió a tubos y los lípidos se cuantificaron mediante análisis de fósforo (Rouser et al., 1970).

#### **4.3.1.4.3. Colesterol**

El colesterol se midió mediante un ensayo enzimático (Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina, 2020).

#### **4.3.1.4.4. Ácidos grasos de glicerofosfolípidos**

Para estudiar la composición de ácidos grasos de los glicerofosfolípidos mediante cromatografía de gases (GC), se tomaron alícuotas de la fracción de lípidos polares totales que permanecieron en el origen de las placas de TLC después de resolver los lípidos neutros. Después de la elución y secado de esta fracción, se realizó metanólisis alcalina (exposición a NaOH 0,5 N en metanol anhidro a 50 °C durante 10 min) para obtener, como metilésteres de ácidos grasos (FAME), los ésteres de ácidos grasos unidos a los glicerofosfolípidos presentes en la fracción de lípidos polares totales (excluyendo así los ácidos grasos unidos por amida a la esfingomielina). Antes de la GC, los FAME se purificaron de forma rutinaria mediante TLC en placas G de gel de sílice que se habían prelavado con metanol: éter etílico (75:25, en volumen) y se secaron. Se utilizó hexano: éter (95: 5, en vol.) Para separar los FAME, que se localizaron con 2', 7'-diclorofluoresceína. Para eluir FAME de la sílice, esta se transfirió a tubos y se agitó a fondo con agua: metanol: hexano (1: 1: 1, en vol.) seguido de centrifugación para recuperar la capa superior de hexano, repitiendo tres veces la extracción con hexano, combinando las fases superiores y secando bajo N<sub>2</sub>. Para los análisis de ácidos grasos, se utilizó un cromatógrafo de gases Varian 3700 equipado con dos columnas de vidrio (2m x 2m) empaquetadas con SP 2330 al 10% en Chromosorb WAW 100/120 (Supelco, Inc.). El gradiente de temperatura de la columna se programó de 150 °C a 230 °C a una velocidad de 5 °C / min. Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron en 220 y 230 °C, respectivamente, y el gas portador fue N<sub>2</sub> (30 ml / min). Los picos de ácidos grasos se detectaron con detectores de ionización de llama, se operaron en modo diferencial dual y se cuantificaron utilizando el software proporcionado por Varian Workstation.

#### **4.3.1.4.5. Determinación de proteínas**

Para detectar si los extractos lipídicos conservaban alguna proteína, se tomaron alícuotas de cada uno y se sometieron a sucesivas extracciones con solventes y precipitación para concentrar las proteínas. Brevemente, cada muestra se resuspendió en metanol: cloroformo: agua (4: 1: 3, en volumen) y se centrifugó a 16000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Después de la partición, se descartó la fase superior acuosa, mientras que se añadieron 3 volúmenes de metanol a la fase inferior remanente y en la interfase donde típicamente, si había, quedaba proteína. Después de la centrifugación a 16000 x g durante 2 minutos a temperatura ambiente, el sedimento que potencialmente contenía proteínas se suspendió en un tampón. Luego, la determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry (método de baja concentración de DC BioRad).

#### **4.3.2. Formulación de partículas adyuvantes ISPA**

##### **4.3.2.1. Obtención de nanopartículas**

Tomando como referencia métodos descritos con anterioridad, se formularon distintos tipos de partículas, a) mediante el método de inyección alcohólica (IA) (Lendemans et al., 2005b) y b) por el método de precursor liposomal (PL) (Bertona et al., 2017). Además de la formulación química detallada en la metodología del capítulo 1, se utilizaron de forma alternativa saponinas y fosfolípidos de diferentes orígenes, dando lugar a composiciones químicas diferenciales en cada caso. Se detalla en resultados las formulaciones optimizadas de manera cualitativa y cuantitativa.

##### **4.3.2.2. Caracterización de las nanopartículas obtenidas**

###### **4.3.2.2.1. Caracterización estructural**

La distribución del tamaño de partícula y la movilidad electroforética (transformada a valores de potencial  $\zeta$ ) en función del pH se analizaron con un analizador Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Reino Unido) utilizando cubetas de poliestireno descartables que contenían las partículas suspendidas en agua desionizada a 25 °C. La viscosidad del medio disperso a 25 °C se fijó en 0.8872 cp. (Correspondiente al agua) (Bertona et al., 2017; Gómez-Morales et al., 2019). La ultraestructura se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Libra 120 Plus de Carl Zeiss SMT). Esta técnica se llevó a cabo depositando 5  $\mu$ l de la suspensión adsorbida directamente sobre una rejilla de cobre recubierta con Formvar, teñido con acetato de uranilo al 1% y observado directamente bajo el microscopio (Gómez Samblás, 2017).

#### **4.3.2.2. Caracterización funcional**

Se calculó el índice hemolítico adaptando el protocolo utilizado por Mac Donald et al., 2017 (Mac Donald et al., 2017) como se describió en el apartado 3.3.2.2.2. del capítulo 1.

#### **4.3.3. Evaluación del desempeño inmunológico**

##### **4.3.3.1. Animales de experimentación y protocolos de inmunización**

Se utilizaron ratones como modelo animal con las mismas características que en capítulo anterior. Los protocolos de trabajo fueron iguales a los descritos en el capítulo 1, apartado 3.3.3.1. Se utilizaron cinco ratones por grupo de acuerdo con los siguientes ítems:

##### **4.3.3.1.1. Uso alternativo de lípidos sintéticos DPPC y HSPC en combinación con saponinas comerciales Quil-A® y saponina semirrefinada Kerry®**

Se evaluaron partículas obtenidas por combinación alternativa de diferentes saponinas con diferentes fosfolípidos utilizando el método del precursor liposomal (Bertona et al., 2017).

- GRUPO 1: DPPC - Quil-A® (10 µg de OVA + 3 µl de PARTÍCULAS en 100 µl de PBS).
- GRUPO 2: DPPC - Kerry® (10 µg de OVA + 6 µl de PARTÍCULAS en 100 µl de PBS).
- GRUPO 3: HSPC - Quil-A® (10 µg de OVA + 3 µl de PARTÍCULAS en 100µl de PBS).
- GRUPO 4: HSPC - Kerry® (10 µg de OVA + 6 µl de PARTÍCULAS en 100 µl de PBS).
- GRUPO 5: CONTROL - (100 µl de PBS)

##### **4.3.3.1.2. Uso alternativo de lípidos purificados a partir de yema de huevo en combinación con saponina semirrefinada Kerry® bajo distintas técnicas de formulación**

Se evaluaron partículas obtenidas por los métodos de inyección alcohólica (IA) (Lendemans et al., 2005b) y precursor liposomal (PL) (Bertona et al., 2017) formuladas a partir de extractos lipídicos obtenidos de yema de huevo y saponinas semirrefinadas derivadas del producto Kerry®, comparando en ambos casos dos partidas (P1 – P2) diferentes por cada tipo de formulación.

- GRUPO 1: IAP1 - (10 µg de OVA + 6 µl de PARTÍCULAS en 100 µl de PBS).
- GRUPO 2: IAP2 - (10 µg de OVA + 6 µl de PARTÍCULAS en 100 µl de PBS).



- GRUPO 3: PLP1 - (10 µg de OVA + 6 µl de PARTÍCULAS en 100 µl de PBS).
- GRUPO 4: PLP2 - (10 µg de OVA + 6 µl de PARTÍCULAS en 100 µl de PBS).
- GRUPO 5: ISPA ORIGINAL- (10 µg de OVA + 3 µl de ISPA en 100 µl de PBS).
- GRUPO 6: CONTROL - (100 µl de PBS)

#### **4.3.3.1.3. Comparación de la nueva formulación ISPA YOLK versus una formulación comercial:**

Se evaluaron las nuevas partículas optimizadas y se compararon con partículas de ISPA original y el adyuvante comercial Alhydrogel™ a base de Al (OH).

- GRUPO 1: ISPA YOLK - (10 µg de OVA + 6 µl de ISPA en 100 µl de PBS)
- GRUPO 2: ISPA ORIGINAL - (10 µg de OVA + 3 µl de ISPA en 100µl de PBS)
- GRUPO 3: Al(OH) – (10 µg de OVA + 15% Alhydrogel™ en 100 µl de PBS)
- GRUPO 4: CONTROL - (100µl PBS)

#### **4.3.3.2. Determinación de la Respuesta Inmunológica**

A los 15, 30 y 45 días posteriores a la primera inmunización (DPI) se obtuvieron muestras de plasma para la determinación de la respuesta inmune humoral. Los anticuerpos desarrollados en los diferentes tiempos se evaluaron mediante ELISA indirecto como se describió en el capítulo 1, ítem 3.3.3.2.

Con el objeto de determinar la respuesta celular que generan los distintos tipos de formulaciones, se procedió a realizar la prueba de hipersensibilidad retardada (DTH) detallada con anterioridad.

#### **4.3.4. Análisis de datos**

Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism Software 8.0.1 (GraphPad, California, EE. UU.). Las diferencias entre grupos se analizaron aplicando los estadísticos no paramétricos prueba U de Mann Whitney y prueba de Kruskal – Wallis.

## **4.4. RESULTADOS**

### **4.4.1. Obtención de nuevas fuentes de lípidos:**

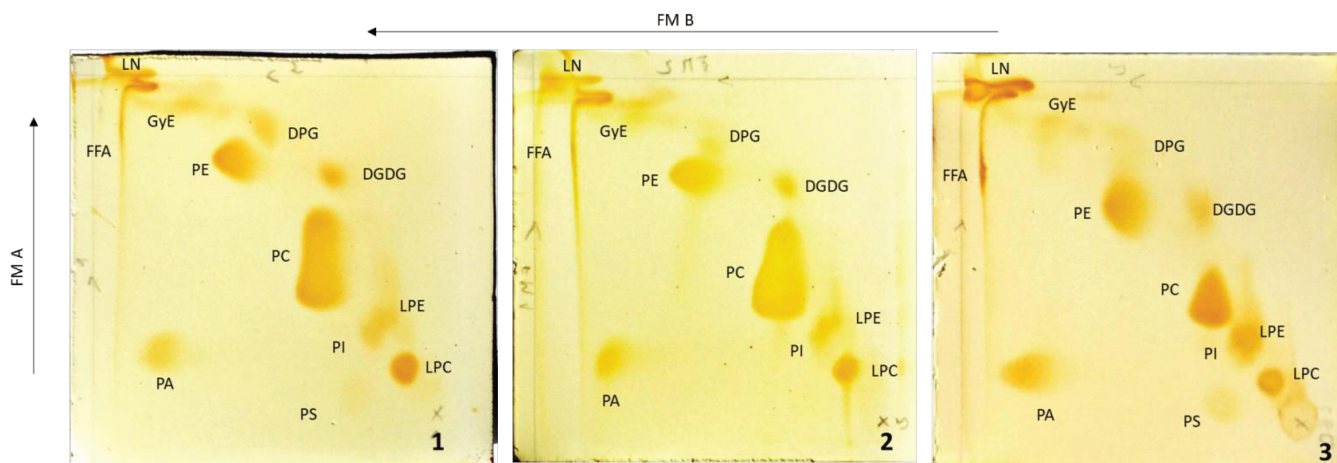
Para lograr la reducción de costos de la fórmula ISPA original se ensayaron tres estrategias: 1) la utilización del fosfolípido HSPC comercial que presenta menor costo que DPPC, 2) la obtención de un extracto de fosfolípidos mediante extracciones sucesivas del residuo o gomas de aceites de soja para obtener fracciones de fosfolípidos ricas en fosfatidilcolina y, finalmente 3) la obtención de un extracto de huevo que permita combinar en una sola extracción a los fosfolípidos y colesterol. Se describen a continuación los resultados de las distintas estrategias. En primer lugar, se describen las estrategias de obtención de lípidos a partir de fuentes naturales y luego la obtención de partículas tipo jaula con las distintas fuentes de lípidos. En última instancia se muestran los ensayos funcionales de los adyuvantes obtenidos.

#### **4.4.1.1. Obtención y caracterización de lípidos derivados de soja**

Para ello se han realizado distintas etapas de extracción empleando alcoholes (metanol; etanol 99,9%; etanol 96%; isopropanol) y acetona como solventes extractores. Por un lado, se realizaron experimentos empleando los alcoholes en la primera etapa de extracción, seguido por dos etapas de extracción con acetona. Por otro lado, se han ejecutado las dos primeras etapas de extracción con acetona y la tercera con los alcoholes. De esta manera se compararon los extractos obtenidos con las diferentes metodologías. Se observó que el empleo de los alcoholes en la primera etapa de extracción genera extractos con mayor concentración de fosfatidilcolina. En ese sentido, dentro de los alcoholes estudiados, el etanol es el que ha mostrado los mejores resultados (resultados no mostrados). Por tanto, se siguió trabajando con la extracción en ese orden de solventes.

Para la caracterización de las purificaciones obtenidas, se procedió al análisis cuantitativo de fósforo del extracto 1 (fracciones solubles en alcohol después del proceso de extracción con EtOH (96%) y del extracto 2 (fracciones solubles en alcohol después del proceso de extracción con EtOH (99,9%) observándose a partir del mismo que el extracto 1 (E1) tenía una cantidad final de 76.3 gramos de fosfolípidos por cada 100 gramos de muestra, en tanto que el extracto 2 (E2) presentó una cantidad de 80.6 gramos de lípidos por cada 100 gramos de extracto. Para la determinación de la composición cualitativa de los mismos, utilizando la técnica de TLC, se observó que, en ambas muestras de extracción, se recuperan el mismo tipo de composiciones cualitativas de lípidos. Sin embargo es notable una mayor concentración de PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina y PI: fosfatidilinositol cuando se utilizó el proceso de extracción con EtOH (99,9%) seguido de extracción con acetona (E2). Esta observación resulta importante dado que el objetivo principal era la obtención de estos como

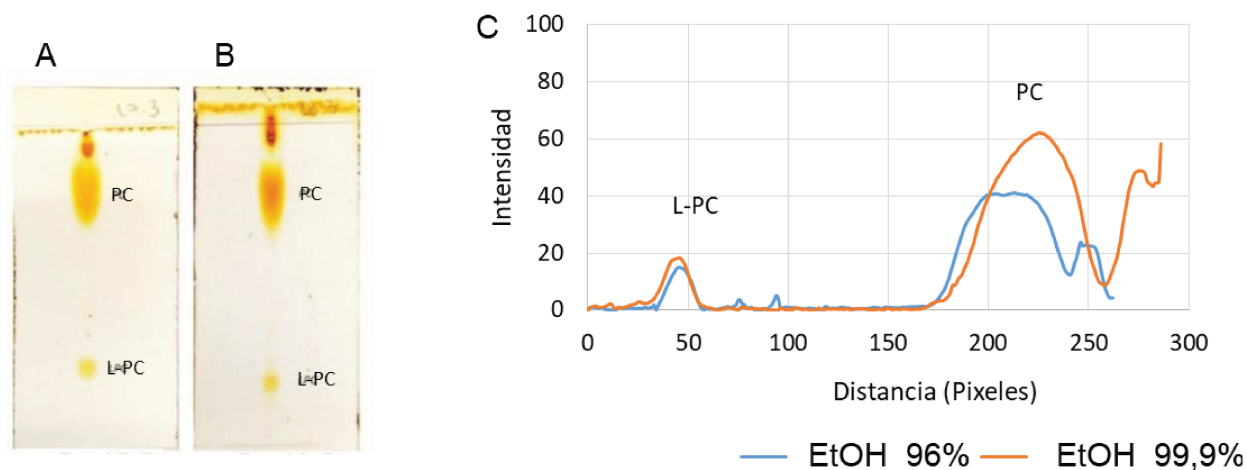
fosfolípidos mayoritarios. Cabe mencionar que en el extracto también se obtuvieron ácidos grasos libres (AGL); ácido fosfatídico (PA); liso-fosfatidilcolina (LPC); liso-fosfatidiletanolamina (LPE); lípidos neutros (LN); Digalactosil Glicéridos (DGDG); Difosfatidilglicerol (DPG); glucósidos y esteroides (GyE), aunque en concentraciones sensiblemente menores (figura 18).



**Figura 18:** Composición lipídica del extracto de lípidos obtenido a partir del derivado de soja analizado por TLC bidimensional desarrollada para separación cualitativa de fosfolípidos:

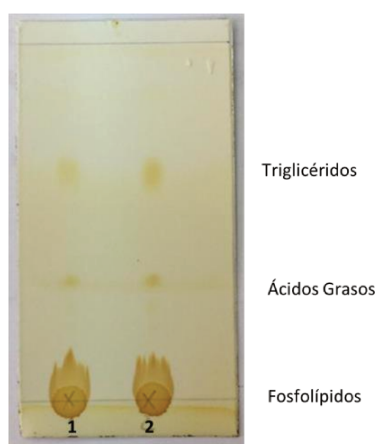
De izquierda a derecha se observan: Placa 1: E1 (derivada de extracción con EtOH 96% y acetona); Placa 2: E2 (derivada de extracción con EtOH 99% y acetona); Placa 3: Lecitina. Abreviaturas: AGL: ácidos grasos libres; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PS: fosfatidilserina; PI: fosfatidilinositol; PA: Acido fosfatídico; LPC: liso-fosfatidilcolina; LPE: liso- fosfatidiletanolamina; LN: lípidos neutros; DGDG: Di-galactosil-glicérido; DPG: Difosfatidilglicerol; GyE: glucósidos y esteroides.

En base a estos resultados, se procedió a la cuantificación de los fosfolípidos mayoritarios, lo que se realizó mediante la densitometría cromatográfica planar empleando un sistema de análisis de imágenes mediante software específico. Las concentraciones estimadas a partir de este análisis, indican que la concentración relativa de la PC fue de 78,26% cuando se usa EtOH 99,9% y 72,72% para el EtOH 96% (figura 19). El porcentaje restante corresponde a lípidos neutros principalmente.



**Figura 19:** Cuantificación de los fosfolípidos mayoritarios del extracto obtenido a partir del derivado de soja. TLC de las muestras extraídas para determinación cuantitativa de lípidos. De izquierda a derecha se observan: A: E1 (derivada de extracción con EtOH 96% y acetona); B: E2 (derivada de extracción con EtOH 99% y acetona) C: Se observa a modo de ejemplo la curva emitida por el sistema informático al analizar la TLC. Abreviaturas: PC: fosfatidilcolina; L-PC: liso-fosfatidilcolina

Se determinaron también, la presencia de lípidos neutros, observándose que los mismos se encuentran en cantidades muy minoritarias respecto de la concentración de fosfolípidos (figura 20).



**Figura 20:** Lípidos neutros presentes en el extracto obtenido a partir del derivado de soja: TLC de las muestras extraídas para determinar lípidos neutros. 1: calle de siembra de extracto 1 (extracto soluble en EtOH 96% y acetona), 2: calle de siembra de extracto 2 (extracto soluble en EtOH 99,9% y acetona).

Finalmente, se procedió a la determinación del perfil de ácidos grasos de los fosfolípidos totales del extracto obtenido. Los resultados de la cromatografía gaseosa arrojaron valores esperables para este tipo de aceites, observándose una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) para ambas muestras, ya que el ácido linoleico supera el 50% (tabla 6).

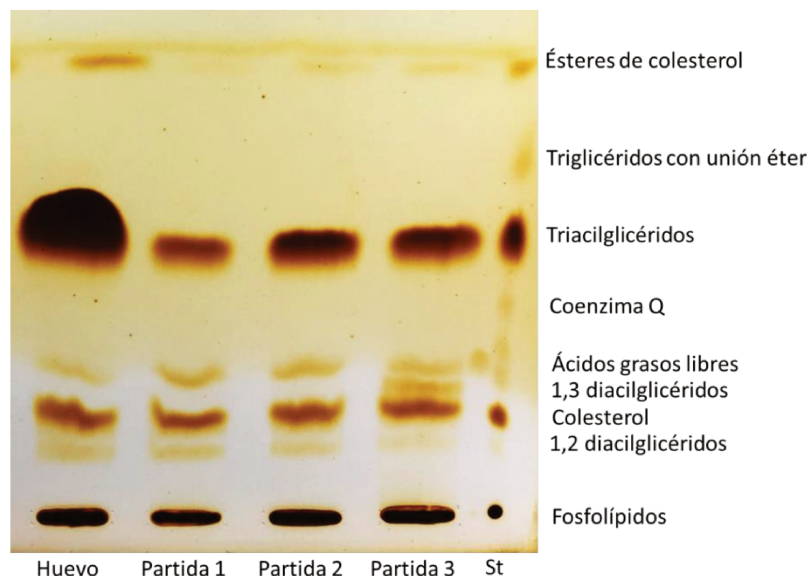
**Tabla 6:** Determinación cuantitativa de ácidos grasos de fosfolípidos totales de las muestras

Ácidos grasos		Extracto 1	Extracto 2
		(%)	
<i>Palmítico</i>	<i>16:0</i>	10,5	11,4
<i>Esteárico</i>	<i>18:0</i>	4,4	4,3
<i>Oleico</i>	<i>18:1n-9</i>	22,0	20,7
<i>Linoleico</i>	<i>18:2n-6</i>	53,0	56,6
<i>Linolénico</i>	<i>18:3n-3</i>	7,0	8,1

#### 4.4.1.2. Obtención y caracterización de lípidos derivados de yema de huevo

A diferencia del apartado anterior, en esta instancia se evaluó la obtención de lípidos de huevo para obtener un extracto que simultáneamente presente fosfolípidos y colesterol. Esta propuesta se realizó con la idea de remplazar una mayor cantidad de los componentes comerciales utilizados para la preparación de ISPA. Se evaluó una extracción etanólica de yema de huevo basada en reportes previos (Su et al., 2015). Se realizaron tres extracciones independientes con diferentes huevos comerciales para determinar la variabilidad de la composición lipídica en diferentes extracciones. Se obtuvo una media de 9,06 g de extracto liofilizado a partir de 100 g de yema de huevo húmeda. El porcentaje de lípidos reportado para la yema de huevo en base húmeda es aproximadamente del 36% (Quitral et al., 2009), por lo que la cantidad obtenida correspondió aproximadamente al 25% de los lípidos presentes en las yemas de huevo. Así, se estimó una eficiencia de extracción de lípidos de aproximadamente un 70%.

En primer lugar se determinó la composición cualitativa de lípidos neutros para cada lote de extracción independiente (figura 21). En la placa de TLC, se puede observar que en todos los extractos se recuperaron cantidades similares de fosfolípidos y colesterol. Esta observación fue importante porque, junto al colesterol, estos fosfolípidos son los componentes principales necesarios para obtener las partículas en forma de jaula. Observamos que en todas las muestras prevalecieron cantidades variables de triacilglicéridos (TAG) como principal lípido neutro, pero en una proporción notablemente menor que en la yema de huevo. En proporciones menores se determinó la presencia de colesterol (Col), ácidos grasos libres (AGL) y diacilglicéridos (DAG). Las especies moleculares de 1,2 DAG se detectaron claramente en los extractos 1 y 2, mientras que en el extracto 3 fueron bajas. En contraste, en este último observamos una banda con *rf* (relación de frentes) compatible con el isómero 1,3 DAG que no estaba en los otros extractos. Finalmente, el contenido de ésteres de colesterol (EC) fue insignificante en los tres lotes.



**Figura 21:** Perfil de lípidos neutros del extracto de yema de huevo. Placa de TLC que compara cualitativamente los perfiles de lípidos entre las tres partidas de extracto de yema de huevo. Con fines comparativos, se identificó una alícuota de extracto de lípidos totales de huevo obtenido con el método clásico de Bligh y Dyer (izquierda). Cada carril se preparó colocando alícuotas tomadas de extractos lipídicos que contenían una cantidad fija (30 µg) de fósforo lipídico total para comparar.

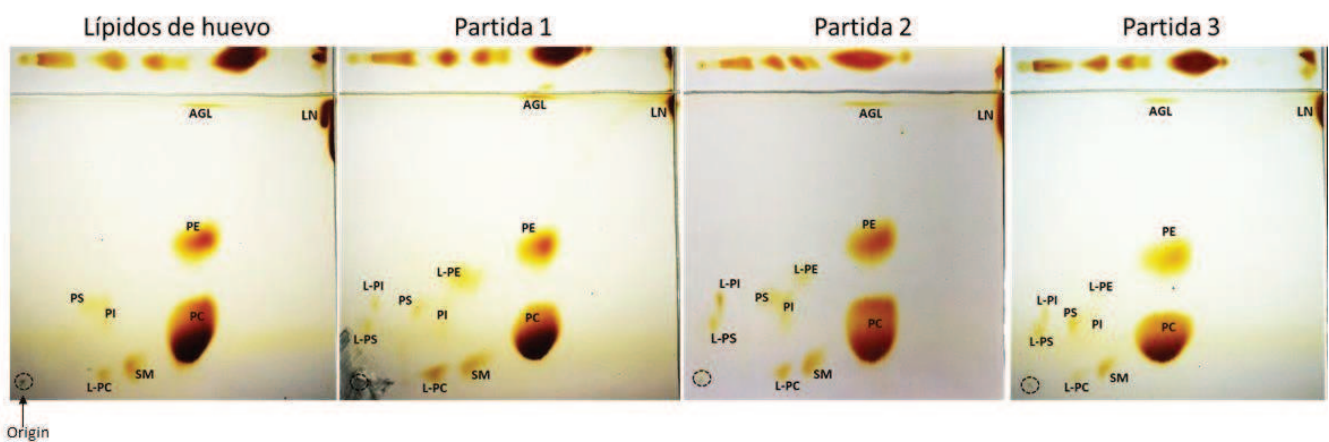
La composición cuantitativa de lípidos y proteínas de las diferentes partidas de extracto se resume en la Tabla 7. Encontramos que la concentración de PL y Col en los diferentes lotes de extracciones de yema de huevo fueron similares, con un promedio cercano a 673 µg y 100 µg por mg de extracto, respectivamente (tabla 7). La relación Col / PL (mol / mol) fue de 0,32, siendo menor que la de la yema de huevo que es 0,4. Además, en todos los lotes el contenido de proteína fue insignificante, arrojando un valor inferior a 0,5 µg de proteína por mg de extracto.

**Tabla 7:** Composición química en las diferentes partidas de extracto de yema de huevo

<i>Componentes Detectados</i>	<b>µg/mg de extracto (% de extracto total)</b>		
	<b>Partida 1</b>	<b>Partida 2</b>	<b>Partida 3</b>
<i>Fosfolípidos</i>	731 (75,2)	629,0 (64,9)	660 (67,6)
<i>Colesterol</i>	109,2 (11,2)	93,9 (9,7)	98,4 (10,1)
<i>Triacilglicéridos</i>	116,7 (12,0)	231,3 (23,9)	204,3 (20,9)
<i>Diacilglicéridos</i>	9,5 (1,0)	9,9 (1,0)	10,5 (1,1)
<i>Esteres de Colesterol</i>	0,5 (0,05)	0,8 (0,08)	0,5 (0,06)
<i>Ácidos grasos libres</i>	4,9 (0,5)	4,8 (0,5)	2,9 (0,3)
<i>Proteínas</i>	0,4 (0,04)	No detectables	0,2 (0,02)

Los tres lotes presentaron una composición de fosfolípidos similar (figura 22). Al igual

que en la yema de huevo, la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE) fueron las principales clases de lípidos (oscilaron entre el 67-70% y el 16-22% del PL totales, respectivamente). Además, en menor proporción esfingomielina (SM), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS) y lisofosfolípidos estaban presentes en los extractos de yema de huevo (tabla 7). La composición de ácidos grasos de los glicerofosfolípidos totales (GPL) que refleja la de PC y PE (que eran la mayor parte de GPL) se muestra en la Tabla 9. Encontramos que la composición de ácidos grasos GPL de todos los lotes era comparable a la de huevo-GPL, con 16: 0, 18: 0, 18: 1n-9 y 18: 2n-6 como ácidos grasos principales y con una proporción baja, pero no despreciable, de PUFA como 20: 4n-6 y 22: 6n-3 (tabla 9).



**Figura 22:** Análisis cualitativo de la composición de fosfolípidos (PL). Como se observó para el extracto de lípidos de huevo total (izquierda), la TLC bidimensional de cada partida de extractos de yema de huevo mostró fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) como las principales clases de PL (manchas más grandes). Las otras abreviaturas de lípidos corresponden a PL menores: PS, fosfatidilserina; PI, fosfatidilinositol; L-PC, liso-fosfatidilcolina; L-PE, liso-fosfatidiletanolamina; L-PS, liso-fosfatidilserina; L-PI, lisofosfatidilinositol; SM, esfingomielina; NL, lípidos neutros y; Origin: origen.

**Tabla 8:** Composición de fosfolípidos en las diferentes partidas de extractos de yema y en el huevo

<i>Fosfolípidos</i>	<b>Partida 1</b>	<b>Partida 2</b>	<b>Partida 3</b>	<b>Huevo</b>
	<i>(%)</i>			
<i>PC</i>	70,5	67,4	69,8	70,5
<i>PE</i>	16,2	22,1	20,1	21,3
<i>SM</i>	2,6	2,8	3,0	2,4
<i>PI</i>	1,6	1,0	0,5	2,0
<i>PS</i>	1,2	0,7	0,9	1,4
<i>L-PC</i>	4,1	3,5	1,7	2,4
<i>L-PE</i>	3,2	1,8	1,0	ND
<i>L-PS</i>	0,3	0,4	1,6	ND
<i>L-PI</i>	0,3	0,3	1,4	ND

\***Abreviaturas:** *PC*, fosfatidilcolina; *PE*, fosfatidiletanolamina; *SM*, esfingomielina; *PI*, fosfatidilinositol; *PS*, fosfatidilserina; *L-PC*, liso-fosfatidilcolina; *L-PE*, liso-fosfatidiletanolamina; *L-PS*, liso-fosfatidilserina; *L-PI*, lisofosfatidilinositol; *NL*, lípidos neutros. *ND*, no detectable



**Tabla 9:** Composición de ácidos grasos glicerofosfolípidos en las diferentes partidas de extractos de yema y en el huevo

Ácidos grasos		Partida 1	Partida 2	Partida 3	Huevo
		( <i>%</i> )			
<i>Palmítico</i>	<b>16:0</b>	17,5	16,8	23,0	17,8
<i>Palmitoleico</i>	<b>16:1</b>	0,6	0,2	0,6	0,4
<i>Estearico</i>	<b>18:0</b>	23,1	25,3	22,5	23,8
<i>Oleico</i>	<b>18:1n-9</b>	24,9	22,9	23,2	23,6
<i>Linoleico</i>	<b>18:2n-6</b>	21,2	22,4	19,7	21,0
<i>Linolénico</i>	<b>18:3n-3</b>	0,4	0,3	0,3	0,3
<i>Araquidónico</i>	<b>20:4n-6</b>	7,6	7,5	6,3	8,0
<i>Docosatetraenoico</i>	<b>22:4n-6</b>	0,5	0,3	0,4	0,3
<i>Docosapentaenoico</i>	<b>22:5n-6</b>	0,8	1,1	1,2	0,6
<i>Docosahexaenoico</i>	<b>22:6n-3</b>	3,5	3,2	2,8	4,1
<i>Saturados</i>	<b>SFA</b>	40,6	42,1	45,6	41,5
<i>Mono insaturados</i>	<b>MFA</b>	25,4	23,0	23,8	24,0
<i>Di insaturados</i>	<b>DFA</b>	21,2	22,4	19,7	21,0
<i>Poliinsaturados</i>	<b>PUFA</b>	12,7	12,5	10,9	13,4

#### 4.4.2. Formulación de partículas adyuvantes ISPA

Con el fosfolípido HSPC y los lípidos extraídos en los ítems anteriores se ensayó su utilidad para formar jaulas lipídicas. En esta instancia, se ensayó tanto la posibilidad de utilizar dichos extractos como su utilización en el contexto de distintas técnicas de obtención. Como se mencionó anteriormente, la composición relativa de componentes de las jaulas lipídicas depende del método de preparación. Por eso, en este trabajo se evaluaron los extractos pero también el método de preparación. La fórmula original, optimizada en Bertona et.al., 2017 puede observarse en la tabla 10.

**Tabla 10:** Composición química cualitativa y cuantitativa de las nanopartículas optimizadas, ISPA ORIGINAL.

ISPA ORIGINAL	
CONSTITUYENTES	CONCENTRACIÓN
LÍPIDOS SINTÉTICOS	3,28 mg/ml
DPPC	2,22 mg/ml
COLESTEROL	1,05 mg/ml
Esterilamina Sn. 3%	0,15 mg/ml
$\alpha$ -Tocoferol Sn. 1%	0,029 mg/ml
Saponina QuilA®	6,48 mg/ml
Agua calidad MiliQ	0,259 ml/ml
Buffer Acetato de Sodio 50mM - pH 5.5	0,656 ml/ml
Etanol 96°	0,03 ml/ml

##### 4.4.2.1. Formulación de partículas adyuvantes ISPA con el fosfolípido HSPC

Partiendo del desarrollo de Bertona y col. 2017, en el presente trabajo se estudiaron diferentes variables. Entre ellas, hemos optimizado una formulación mediante el método del precursor liposomal combinando los lípidos de diversos orígenes con las saponinas Quil-A® o alternativamente Kerry® semirrefinada (descrita en el capítulo 1). En un primer ensayo, el fosfolípido DPPC (di-palmitoil-fosfatidilcolina), fue reemplazado por HSPC comercial (fosfatidilcolina de soja completamente hidrogenada) que es de menor costo que el DPPC sintético utilizado en Bertona y col. 2017. En la tabla 11 se detalla la composición resultante de las nanopartículas optimizadas.

**Tabla 11:** Composición química cualitativa y cuantitativa de las nanopartículas optimizadas, ISPA HSPC.

<b>ISPA HSPC</b>	
<b>CONSTITUYENTES</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
<b>LÍPIDOS SINTÉTICOS</b>	<b>3,28 mg/ml</b>
<b>HSPC</b>	<b>2,23 mg/ml</b>
<b>COLESTEROL</b>	<b>1,05 mg/ml</b>
<b>Esterilamina Sn. 3%</b>	0,15 mg/ml
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol Sn. 1%</b>	0,029 mg/ml
<b>Saponina QuilA® o Saponina Semirrefinada Kerry®</b>	6,48 mg/ml
<b>Agua calidad MiliQ</b>	0,259 ml/ml
<b>Buffer Acetato de Sodio 50mM - pH 5.5</b>	0,656 ml/ml
<b>Etanol 96°</b>	0,08 ml/ml

Las temperaturas de trabajo en la optimización de Bertona y col. 2017 fueron de 50 – 55 °C. A esa temperatura, los lípidos se solubilizan en etanol y luego se mezclan con una solución acuosa para formar los liposomas. Luego, a 20°C, la solución lipídica se inyecta a una solución acuosa de saponina que da lugar a una mezcla heterogénea de partículas. Posteriormente las partículas se extruden a la temperatura en que los lípidos son solubles para facilitar el proceso de formación de partículas tipo jaula. El trabajo a 50-55°C no altera la funcionalidad de las saponinas. Sin embargo, el fosfolípido HSPC, presenta mayor cantidad de instauraciones que el fosfolípido DPPC, lo que conlleva una necesidad específica de mayores temperaturas de trabajo para el primero, es decir, 65 - 70° para HSPC vs 50 – 55 °C para DPPC. Si bien, se han logrado formulaciones a temperaturas inferiores, cercanas a las utilizadas al fosfolípido DPPC, estas no han resultado siempre reproducibles, presentaron dificultad de conservación o han mostrado precipitados en cortos periodos de tiempo. Además, una vez formados los liposomas, el tamaño obtenido resultaba variable, lo que dificultaba el proceso de extrusión a través de las membranas de 100 nanómetros, dando lugar a largos tiempos de formulación, o resultados de bajos rendimiento. Los inconvenientes encontrados mediante el uso de estos fosfolípidos sumado a que, a pesar de ser de menor costo que DPPC es un insumo comercial, llevaron a evaluar otras fuentes de lípidos.

#### 4.4.2.2. Formulación de partículas adyuvantes ISPA con los fosfolípidos extraídos de soja

En este caso, se utilizaron fosfolípidos correspondientes al extracto 2 (E2) descrito en el ítem 4.4.1.1. derivados del residuo del desgomado de la soja proveniente de la industria aceitera extraída con etanol 99%. Mediante estos lípidos, se optimizó una nueva fórmula (ISPAs), también mediante el método del precursor liposomal (Bertona et al., 2017), que resulta en una composición cualitativa y cuantitativa diferente a la original (Se detalla la misma en la tabla 12).

**Tabla 12:** Composición química cualitativa y cuantitativa de las nanopartículas optimizadas, ISPAs

ISPAs	
CONSTITUYENTES	CONCENTRACIÓN
<b>EXTRACTO DE RESIDUO ACEITERO DE SOJA</b>	<b>2,36 mg/ml</b>
<b>Fosfolípidos totales</b>	<b>2,23 mg/ml</b>
<b>Fosfatidilcolina</b>	0,6021 mg/ml
<b>Fosfatidilinositol</b>	0,5352 mg/ml
<b>Fosfatidiletanolamina</b>	0,446 mg/ml
<b>Ácido Fosfatídico</b>	0,20 mg/ml
<b>COLESTEROL</b>	<b>0,13 mg/ml</b>
<b>Esterilamina Sn. 3%</b>	0,15 mg/ml
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol Sn. 1%</b>	0,029 mg/ml
<b>Saponina QuilA®</b>	6,48 mg/ml
<b>Agua calidad MiliQ</b>	0,259 ml/ml
<b>Buffer Acetato de Sodio 50mM - pH 5.5</b>	0,656 ml/ml
<b>Etanol 96°</b>	0,08 ml/ml

A diferencia de la formulación inicial ISPA, las formulaciones alternativas a partir de extractos, presentan la particularidad de poseer otros componentes lipídicos de los cuales se desconoce su comportamiento en el proceso de formación de partículas tipo jaula. En este caso particular, a partir de extracto proveniente de soja, rico en fosfatidilcolina, pero también conteniendo otros componentes, pudimos observar un comportamiento particular. Como se detalla en la fórmula de la tabla 12, es notablemente menor la concentración que se debió utilizar de colesterol en esta fórmula respecto de ISPA original dado que el agregado del mismo en concentraciones mayores daba lugar a inestabilidad del preparado y precipitaciones en las

mezclas. Las nanopartículas obtenidas a partir de esta metodología, presentaron tamaños esperables dentro de un rango de 40 – 60 nm mediante la técnica de DLS. La evaluación de estas partículas quedó pendiente ya que no pudo ser completada en el tiempo de esta tesis.

#### **4.4.2.3. Formulación de partículas adyuvantes ISPA con lípidos extraídos de yema de huevo.**

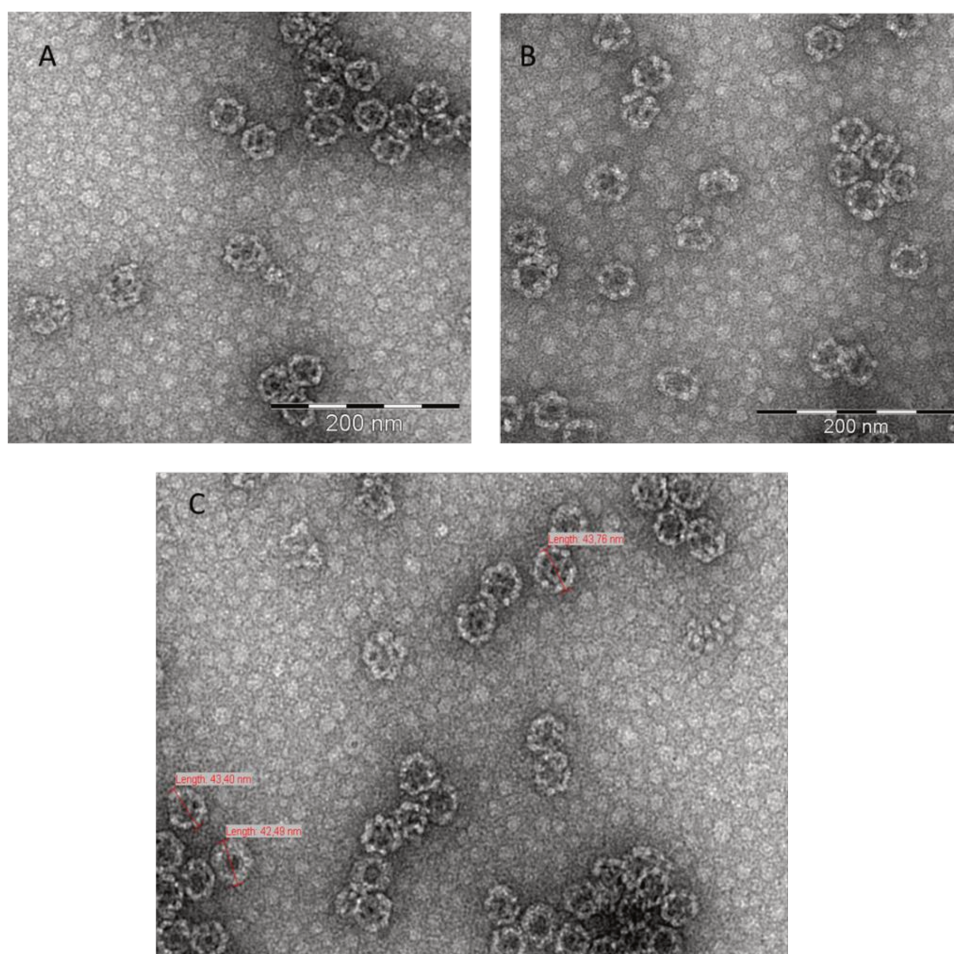
A partir del extracto de huevo que comprende fosfolípidos y colesterol como sustitutos de los insumos comerciales del ISPA original, se optimizó una nueva formulación que hemos llamado ISPA YOLK (la composición final se muestra en la Tabla 13). Las nanopartículas, en este caso fueron obtenidas mediante dos metodologías de formulación descriptas con anterioridad como precursor liposomal (Bertona et al., 2017) e inyección alcohólica (Lendemans et al., 2005b) . En este caso las partículas fueron formuladas de forma exclusiva con la saponina semirrefinada Kerry® para obtener una composición con mínimos insumos comerciales, por lo que su preparación resulta de muy bajo costo.

**Tabla 13:** Composición química cualitativa y cuantitativa de las nanopartículas optimizadas, ISPA YOLK

<b>ISPA YOLK</b>	
<b>CONSTITUYENTES</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
<b>EXTRACTO DE YEMA DE HUEVO</b>	<b>2,18 mg/ml</b>
<b>Fosfolípidos totales</b>	<b>1,59 mg/ml</b>
<b>Fosfatidilcolina</b>	1,12 mg/ml
<b>Fosfatidiletanolamina</b>	0,26 mg/ml
<b>Esfingomielinea</b>	0,04 mg/ml
<b>Fosfatidilinositol</b>	0,02 mg/ml
<b>Fosfatidilserina</b>	0,02 mg/ml
<b>Liso-fosfatidilcolina</b>	0,06 mg/ml
<b>Liso-fosfatidiletanolamina</b>	0,05 mg/ml
<b>Liso-fosfatidilserina</b>	0,005 mg/ml
<b>Liso-fosfatidilinositol</b>	0,005 mg/ml
<b>COLESTEROL</b>	<b>0,24mg/ml</b>
<b>Esterilamina Sn. 3%</b>	0,15 mg/ml
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol Sn. 1%</b>	0,029 mg/ml
<b>Saponina Semirrefinada Kerry®</b>	6,48 mg/ml
<b>Agua calidad MiliQ</b>	0,259 ml/ml
<b>Buffer Acetato de Sodio 50mM - pH 5.5</b>	0,656 ml/ml
<b>Etanol 96°</b>	0,08 ml/ml

En función de los parámetros obtenidos, se determinó que el extracto de yema de huevo permitía preparar partículas de muy bajo costo por no requerir casi ningún componente comercial. Además, permitía obtener partículas en forma reproducible y acortar los tiempos de extrusión, siendo este un paso clave en la preparación. Se confirmó que ISPA YOLK, está constituido por partículas con una media de 120 nm según la técnica DLS y se determinó que su potencial Z es de -24,3 MV. La ultra estructura de las partículas fue determinada por TEM lo que indica que se han formado partículas en forma de jaula de 40 a 50 nm en todos los casos (Figura 23). Los tamaños mediante esta técnica corresponden a partículas de 42 nm aproximadamente. La diferencia de tamaño observada por DLS puede deberse a la presencia de otro tipo de partículas mayores a las jaulas lipídicas o a la agregación de partículas que

constituyen poblaciones minoritarias pero que al ser más grandes tienen mucha influencia en el resultado final de la medición de DLS.



**Figura 23:** Microscopia electrónica de transferencia (TEM) de las nanopartículas obtenidas. A: ISPA original; B: ISPA YOLK; C: ISPA original (detalle de referencias de tamaños de nanopartículas de forma individual).

Esta formulación, a diferencia de las anteriores, tuvo como particularidad la presencia de fosfolípidos acompañados de lisofosfolípidos y también colesterol. Esta mezcla, que solo utiliza cantidades mínimas de  $\alpha$ -tocoferol y esterilamina como aditivos comerciales, a los fines económicos ya habría suplido el primer objetivo de estudio. Sin embargo, la particularidad de poseer estos componentes de los cuales tampoco se han desarrollado estudios previos nos llevó a indagar en su comportamiento. Se observaron ciertas facilidades prácticas que han llevado a facilitar tiempos de trabajo. Primero, la mezcla de lípidos obtenida no necesitaría de aditivos, por lo que una vez obtenido el extracto podría utilizarse de forma inmediata para su formulación, esto significaría en nuestro caso eliminar los costos de adquisición como así también los tiempos de suministro de los insumos, sabiendo que mayoritariamente son de importación. Segundo, en el proceso de preparación, conllevan temperaturas de trabajo

menores, por lo que no han supuesto una dificultad de adaptación a las técnicas de trabajo optimizadas. Tercero, pueden formularse por las dos metodologías sin presentar cambios en la estructura o tamaño de la nanopartículas obtenida.

#### **3.3.2.4 Determinación de las actividades hemolíticas y la toxicidad in vitro de los adyuvantes ISPA obtenidos con los distintos lípidos**

Una de las propiedades de las saponinas es su capacidad de producir hemólisis. Si bien esta propiedad genera cierta toxicidad para ser usada en adyuvantes, la misma se encuentra muy disminuida cuando las saponinas se encuentran asociadas a jaulas lipídicas. Al incorporarse a las partículas dicha actividad disminuye debido a su interacción con el colesterol pero su actividad inmunoestimulante no disminuye y por el contrario aumenta (Fleck et al., 2019). Por eso se midió la disminución de hemólisis que presenta la saponina utilizada como criterio de evaluación de la disminución de toxicidad del adyuvante. Para determinar las actividades hemolíticas y la toxicidad in vitro de las partículas obtenidas cargadas con saponina y compararlas con las saponina libres, se realizó una titulación de la actividad hemolítica de las partículas ISPA obtenidas, el extracto de Kerry® dializado y el producto comercial Quil-A® como control, tal como se describió para el capítulo 1 (ítem 3.3.2.2.2.). La concentración mínima con la que Quil-A® presentó hemólisis fue de 3,9 µg / ml, mientras que el extracto de Kerry® presentó hemólisis con concentraciones de hasta 7,8 µg / ml. Las saponinas cargadas en nanopartículas disminuyeron sus niveles de hemólisis, requiriendo una concentración de 125 µg / ml de extracto de Kerry® semirrefinado cargado en partículas ISPA YOLK y 62,44 µg / ml de Quil-A® cargado en partículas ISPA original, respectivamente para lograr la hemólisis.

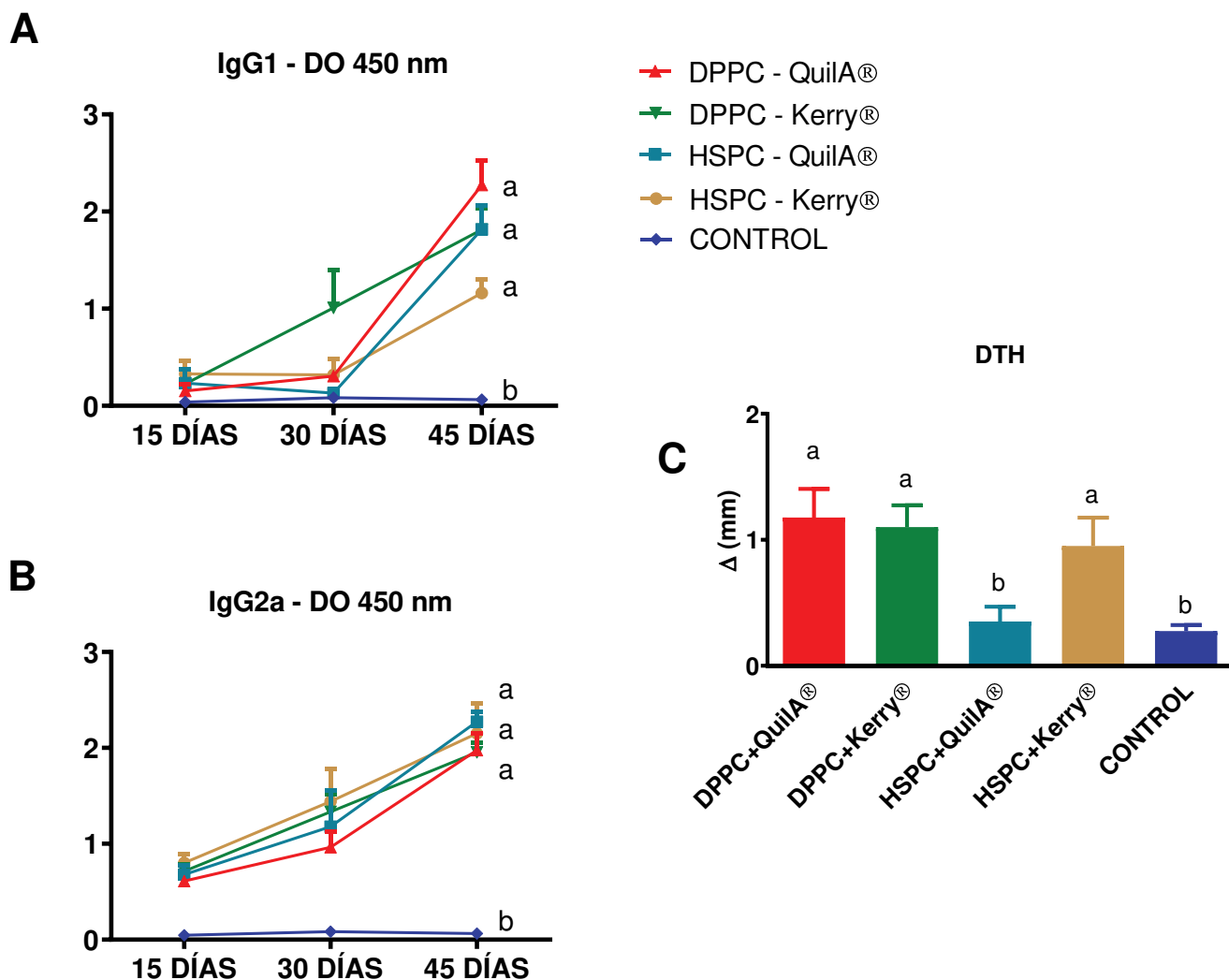
#### **4.4.3. Evaluación del desempeño inmunológico**

##### **4.4.3.1. Uso alternativo de lípidos sintéticos DPPC y HSPC en combinación con saponinas comerciales Quil-A® y saponina semirrefinada Kerry®**

En este ensayo se compararon las formulaciones obtenidas mediante la técnica del precursor liposomal, combinando alternativamente DPPC con saponina Quil-A® o DPPC con saponina Kerry® semirrefinada y HSPC con saponina Quil-A® o HSPC con saponina Kerry® semirrefinada. Con este fin, se utilizaron 5 grupos de ratones y OVA como antígeno formulado respectivamente con el adyuvante ISPA original o DPPC - Quil-A® (grupo 1); ISPA CON SP. KERRY® o DPPC - Kerry® (grupo 2); HSPC - Quil-A® (grupo 3); HSPC - Kerry® (grupo 4) y CONTROL tratado con PBS (grupo 5), con tres dosis separadas por 14 días según el protocolo detallado en el ítem 4.3.3.1.1. Dos semanas después de cada inmunización se midieron anticuerpos anti OVA de tipo IgG1 e IgG2a. Todos los grupos mostraron aumento de la DO para los niveles de anticuerpos específicos IgG1 (figura 24-A) e IgG2a (figura 24-B), no



observándose diferencias significativas entre grupos. Para completar el análisis de la respuesta a lo largo del tiempo luego de las distintas inmunizaciones, se han calculado además las AUC para los anticuerpos obtenidos, IgG1 (tabla 14) e IgG2a (tabla 15). También se midió la hipersensibilidad retardada (DTH) (figura 24-C) luego de la última inmunización para evidenciar respuesta inmunológica celular. En este ensayo se observó una menor respuesta en el grupo “Quil-A® – HSPC” respecto del resto de grupos.



**Figura 24:** Evaluación funcional de las nuevas formulaciones obtenidas.

En A y B se muestran los niveles obtenidos para las IgG1 e IgG2a respectivamente. Se observaron niveles notables de DO para cada tipo de nanopartículas evaluadas con ovoalbúmina como antígeno modelo, no observándose diferencias significativas entre los grupos tratados (la relación a-a indica  $p > 0,05$ ). Todos los grupos presentaron diferencia estadística significativa respecto del grupo control (la relación a-b indica  $p < 0,05$ ). C: la respuesta a la prueba DTH fue notable a las 48 horas, salvo para el grupo inoculado con saponina Quil-A® y fosfolípido HSPC como constituyentes de las partículas (la relación a-b indica  $p < 0,05$ ).

**Tabla 14:** Estadística de las áreas bajo la curva (AUC) para IgG1.  
Se determinaron las AUC para la cinética de IgG1 obtenidos para cada adyuvante.

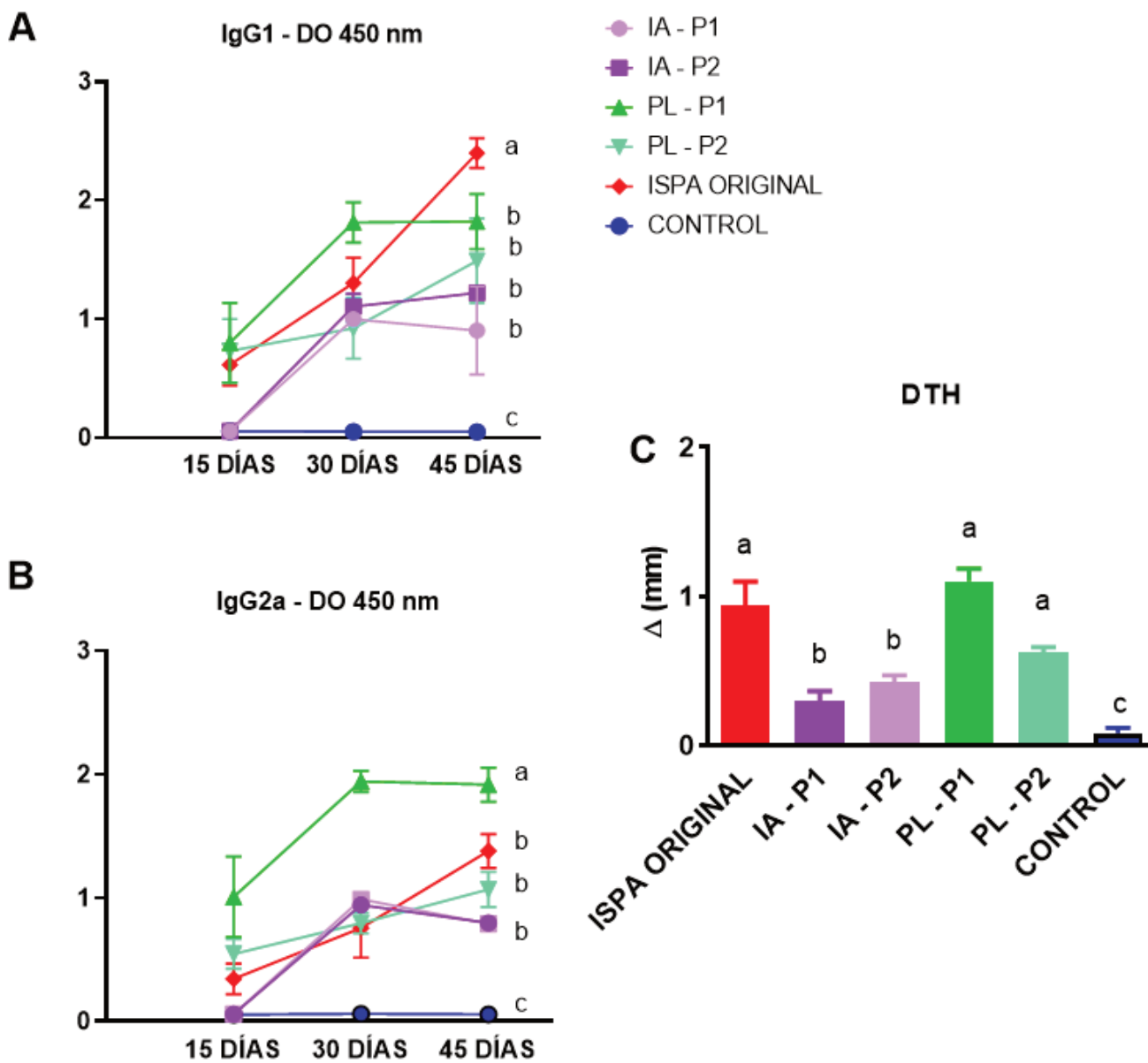
<i>AUC para IGg1</i>	<b>QuilA®+DPPC</b>	<b>Kerry®+DPPC</b>	<b>QuilA®+HSPC</b>	<b>Kerry®+HSPC</b>	<b>CONTROL</b>
<b>Área Total</b>	1,519	2,031	1,157	1,066	0,1344
<b>Error Estándar</b>	0,2754	0,5946	0,2894	0,3005	0,03233
<b>Intervalo de confianza (95%)</b>	0,9795 a 2,059	0,8650 a 3,196	0,5895 a 1,724	0,4766 a 1,655	0,07104 a 0,1978

**Tabla 15:** Estadística de las áreas bajo la curva (AUC) para IgG2a.  
Se determinaron las AUC para la cinética de IgG2a obtenidos para cada adyuvante.

<i>AUC para IGg1</i>	<b>QuilA®+DPPC</b>	<b>Kerry®+DPPC</b>	<b>QuilA®+HSPC</b>	<b>Kerry®+HSPC</b>	<b>CONTROL</b>
<b>Área Total</b>	2,256	2,666	2,654	2,919	0,1382
<b>Error Estándar</b>	0,3042	0,2938	0,5507	0,5718	0,03113
<b>Intervalo de confianza (95%)</b>	1,660 a 2,852	2,090 a 3,242	1,574 a 3,733	1,799 a 4,040	0,07718 a 0,1992

#### 4.4.3.2. Uso alternativo de lípidos purificados a partir de yema de huevo en combinación con saponina semirrefinada Kerry® bajo distintas técnicas de formulación

En este caso se realizó el mismo ensayo de inmunización de ratones con las formulaciones desarrolladas a partir de las dos técnicas de estudio: IAP1 (inyección alcohólica partida 1); IAP2 (inyección alcohólica partida 2); PLP1 (precursor liposomal partida 1); PLP2 (precursor liposomal partida 2), donde en todos los casos las nanopartículas se formularon, independientemente del método, según la fórmula descrita en la tabla 13. Finalizado el plan de inmunizaciones, se observó un mejor desempeño para la respuesta de anticuerpos IgG1 mediante el uso de ISPA original (ver figura 25-A), en tanto que para los anticuerpos de tipo IgG2a, el desempeño observado fue mayor para el adyuvante nuevo, ISPA YOLK, formulado por la técnica del precursor liposomal (PLP1) (ver figura 25-B). Para completar el análisis de la respuesta a lo largo del tiempo luego de las distintas inmunizaciones, se han calculado además las AUC para los anticuerpos obtenidos IgG1 (tabla 16) e IgG2a (tabla 17). La respuesta DTH presentó las mismas características que la determinaciones de anticuerpos (ver figura 25-C). Se observó un mejor desempeño en los grupos tratados con partículas formuladas mediante la técnica del precursor liposomal aunque el resultado no se reprodujo en las dos partidas. Todos los grupos presentaron significancia respecto del control ( $p < 0,001$ ).



**Figura 25:** Respuesta de anticuerpos IgG1 e IgG2a anti- OVA luego de inmunizar animales con 10ug de antígeno y cada formulación adyuvante respectivamente. A) indica la cinética de respuesta de los anticuerpos IgG1 a distintos tiempos para las distintas formulaciones. B) indica la cinética de respuesta de los anticuerpos IgG2a a distintos tiempos para las distintas formulaciones. C) indica la respuesta DTH para los distintos grupos tratados. La relación a-b indica una diferencia estadística con  $p < 0,05$ ; a-c indica una diferencia estadística con  $p < 0,001$ .

**Tabla 16:** Estadística de las áreas bajo la curva (AUC) para IgG1.  
Se determinaron las AUC para la cinética de IgG1 obtenidos para cada adyuvante.

<i>AUC para IgG1</i>	<b>IA - P1</b>	<b>IA - P2</b>	<b>PL - P1</b>	<b>PL - P2</b>	<b>ISPA ORIGINAL</b>	<b>CONTROL</b>
<i>Área Total</i>	1,480	1,745	3,126	2,036	2,811	0,1043
<i>Error Estándar</i>	0,2624	0,1105	0,5295	0,6414	0,4140	0,004626
<i>Intervalo de confianza (95%)</i>	0,9658 a 1,994	1,528 a 1,961	2,088 a 4,163	0,7784 a 3,293	1,999 a 3,622	0,09523 a 0,1134

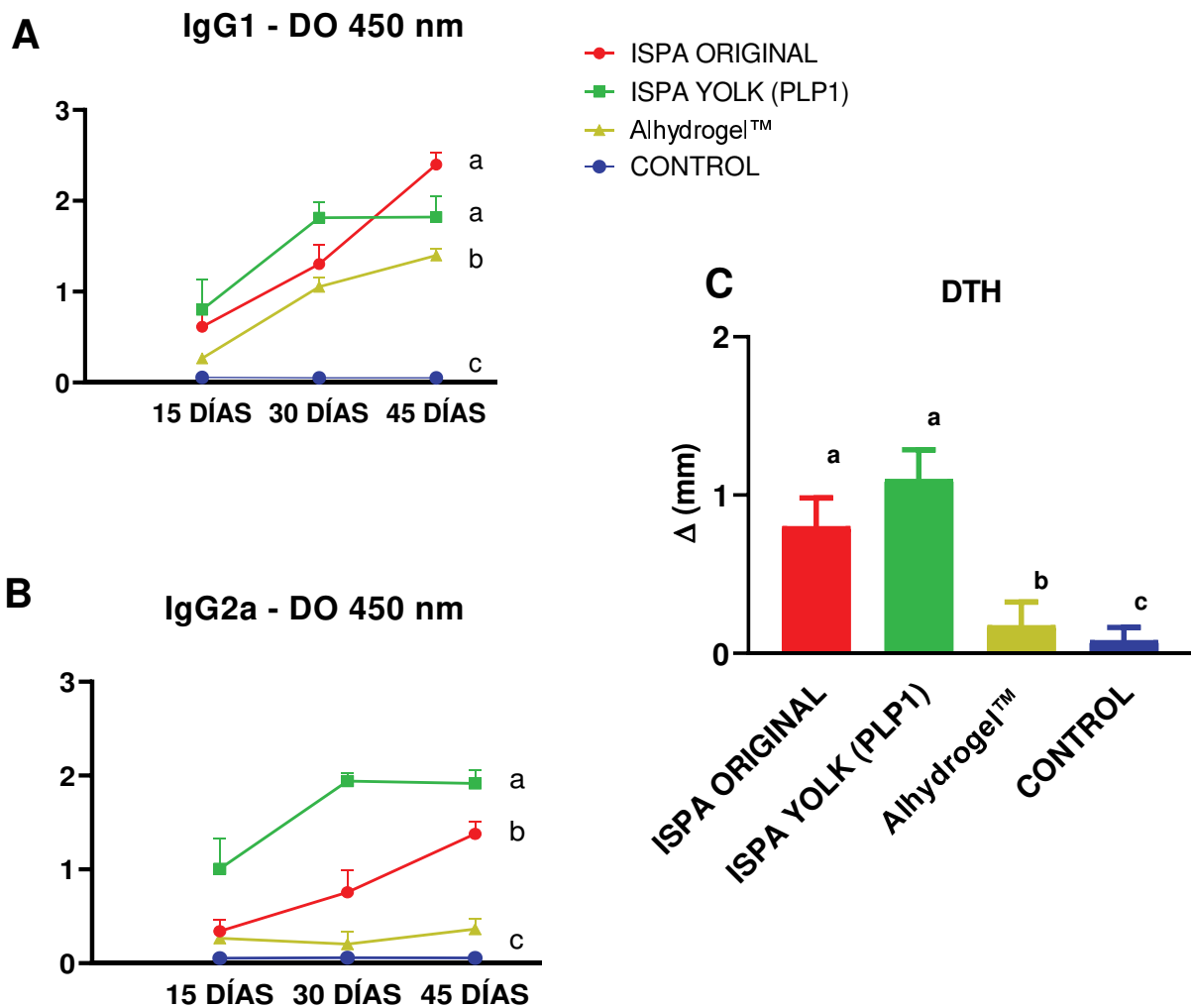
**Tabla 17:** Estadística de las áreas bajo la curva (AUC) para IgG2a.  
Se determinaron las AUC para la cinética de IgG2a obtenidos para cada adyuvante.

<i>AUC para IgG1</i>	<b>IA - P1</b>	<b>IA - P2</b>	<b>PL - P1</b>	<b>PL - P2</b>	<b>ISPA ORIGINAL</b>	<b>CONTROL</b>
<i>Área Total</i>	1,368	1,410	3,403	1,600	1,616	0,1149
<i>Error Estándar</i>	0,04298	0,04807	0,4193	0,2468	0,4335	0,007426
<i>Intervalo de confianza (95%)</i>	1,284 a 1,452	1,316 a 1,505	2,581 a 4,225	1,117 a 2,084	0,7659 a 2,465	0,1003 a 0,1295

#### 4.4.3.3. Comparación de la nueva formulación ISPA YOLK versus una formulación comercial

Considerando el buen rendimiento del adyuvante obtenido con extracto de yema, se realizó un nuevo ensayo para compararlo en paralelo al previamente descrito por nuestro grupo (Bertona et al., 2017) y un adyuvante comercial de amplio uso en vacunas veterinarias como es Alhydrogel™. Se procedió igual que en los casos antes descritos realizando la inmunización de ratones con OVA y respectivamente ISPA YOLK, ISPA original y Alhydrogel™. Se obtuvo plasma después de la primera, segunda y tercera dosis para la determinación de niveles de anticuerpos. Además, se realizó una prueba DTH una vez finalizado el esquema de inmunización. Al analizar la respuesta de los anticuerpos IgG1 (figura 26-A) e IgG2a (figura 26-B), se determinó que tanto ISPA original como ISPA YOLK superaron el rendimiento del adyuvante comercial Alhydrogel™ ( $p < 0,001$ ). A su vez, ISPA YOLK presentó niveles mayores de anticuerpos que ISPA original después de la primera y segunda dosis ( $p < 0,05$ ). Solo después de la tercera dosis, IgG1 presentó niveles más altos para ISPA original en relación a ISPA YOLK ( $p < 0,05$ ). En el caso de IgG2a, la respuesta ISPA YOLK presentó niveles de anticuerpos levemente mayores aunque no significativos en relación a ISPA original. Además, se determinó que después de la segunda dosis la respuesta de ISPA YOLK preparado con el método de precursor liposomal utilizando el extracto 1, los niveles de IgG1 e IgG2a alcanzaron una meseta que superó los niveles obtenidos con Alhydrogel™ y fue similar al obtenido con ISPA original. Al analizar la respuesta de DTH (ver figura 26-C) para los diferentes grupos, puede verse que todos presentaron significancia estadística con respecto al control ( $p < 0,001$ ). La respuesta DTH

de ISPA YOLK fue muy significativa en relación con el grupo CONTROL y Alhydrogel<sup>TM</sup> (figura 26-C). En esta determinación se observó un desempeño similar en los grupos tratados con ISPA original e ISPA YOLK. Finalmente, para comparar todos los adyuvantes a lo largo de los protocolos de inmunizaciones, se calculó el área bajo la curva (AUC) de la DO versus el tiempo después de la primera, la segunda y la tercera inmunización. En la respuesta global analizada de esa manera, la respuesta de IgG2a fue mayor a lo largo del tiempo para ISPA YOLK (tabla 19) ( $p < 0,05$ ) y tanto ISPA original como ISPA YOLK presentaron valores similares de respuesta de anticuerpos IgG1 (tabla 18) ( $p > 0,05$ ), siendo la respuesta con ambos adyuvantes mayor que con hidrogel o el control.



**Figura 26:** Respuesta humoral y celular de ISPA YOLK vs ISPA original y Alhydrogel<sup>TM</sup>: IgG1 y B) IgG2a anti-OVA respuesta de anticuerpos después de inmunizar ratones en diferentes días con 10 µg de antígeno y cada adyuvante respectivamente. Para cada adyuvante, se utilizaron grupos de 5 ratones. Los anticuerpos se midieron 15 días después cada inmunización por ELISA indirecto. En el eje X, se indica el tiempo correspondiente a la primera, segunda y tercera dosis del plan de inmunización. En el eje Y, se indica la DO obtenido a 450 nm para cada anticuerpo. C) Respuesta DTH de ISPA YOLK frente a ISPA original y Alhydrogel<sup>TM</sup>. 15 días después de la última vacunación se inocularon ratones con 5 µg de OVA en las almohadillas plantares y se midió la DTH en los diferentes grupos 48 horas después de la inoculación. . La relación a-b indica una diferencia estadística con  $p < 0,05$ ; a-c indica una diferencia estadística con  $p < 0,001$ .

**Tabla 17:** Estadística de las áreas bajo la curva (AUC) para IgG1.  
Se determinaron las AUC para la cinética de IgG1 obtenidos para cada adyuvante.

<i>AUC para IGg1</i>	<b>ISPA ORIGINAL</b>	<b>ISPA YOLK</b>	<b>Alhydrogel™</b>	<b>CONTROL</b>
<i>Área Total</i>	2,80	3,10	1,90	0,10
<i>Error Estándar</i>	0,40	0,50	0,20	0,00
<i>Intervalo de confianza (95%)</i>	1,99 a 3,66	2,08 a 4,16	1,54 a 2,23	0,09 a 0,11

**Tabla 18:** Estadística de las áreas bajo la curva (AUC) para IgG2a.  
Se determinaron las AUC para la cinética de IgG2a obtenidos para cada adyuvante.

<i>AUC para IGg2a</i>	<b>ISPA ORIGINAL</b>	<b>ISPA YOLK</b>	<b>Alhydrogel™</b>	<b>CONTROL</b>
<i>Área Total</i>	1,60	3,40	0,50	0,11
<i>Error Estándar</i>	0,40	0,4	0,20	0,01
<i>Intervalo de confianza (95%)</i>	0,76 a 2,46	2,58 a 4,22	0,05 a 0,97	0,10 a 0,12

#### 4.5. DISCUSIÓN

El principal objetivo de esta sección del trabajo de tesis consistió en disminuir los costos del adyuvante utilizando lípidos alternativos y una metodología de preparación que permita prever un escalado del mismo. Los métodos descritos en la introducción de este capítulo que incluyen la ultracentrifugación (Morein et al., 1984), la diálisis (Höglund et al., 1989), la hidratación de la película lipídica (Copland et al., 2000) o la inyección de etanol (Lendemans et al., 2005b), indican que este tipo de nanopartículas presentan una amplia capacidad de adaptación para su proceso de formulación. Sin embargo, todas estas metodologías suponen dificultades particulares. El trabajo de Myschik y sus colaboradores (Myschik et al., 2006) es el que mejor resume estas características (tabla 19).

**Tabla 19:** Resumen de métodos de preparación de nanopartículas ISCOM y sus particularidades. Adaptado de: (Myschik et al., 2006) (Myschik et al., 2006).

<i>Método de preparación</i>	<b>Tiempo de preparación</b>	<b>Equipo requerido</b>	<b>Posible contaminante</b>	<b>Atrapamiento de antígeno</b>
<i>Método de centrifugación</i>	Largo	Ultracentrífuga	Surfactante	Posible, proteínas e membranas de organismos completos
<i>Método de diálisis</i>	Largo	Cassetes o membranas de diálisis	Surfactante	Posible, proteínas de membrana altamente purificadas y antígenos
<i>Método de hidratación de la película lipídica</i>	Largo	Secadora de hielo	Ninguna	Descrito para ova lipidificado
<i>Método de inyección de etanol</i>	Corto	Dispositivo de inyección	Etanol**	No descrito
<i>Método de inyección en éter</i>	Corto	Dispositivo de inyección	Éter**	No descrito

\*El tiempo de preparación es corto, sin embargo, parece ser necesario un mayor tiempo para lograr el equilibrio de las formulaciones.

\*\*Se puede eliminar mediante un paso adicional de diálisis o liofilización.

\*\*\* Se puede eliminar con un calentamiento suave.

En nuestro caso, dada la falta de equipamiento como el utilizado en la metodología original de ultracentrifugación (Morein et al., 1984) y que no es un método adaptable a un escalamiento, hemos adaptado metodologías como la inyección etanólica que puede efectuarse con dispositivos automatizados pero también de forma manual. De hecho, se informó que esta técnica da como resultado la formación de un gran número de partículas en forma de jaula en 2 horas y constituye la técnica de formación de ISCOM más rápida (Lendemans et al., 2005b).

De la misma forma, la síntesis de liposomas que dan lugar a la técnica del precursor liposomal (Bertona et al., 2017) es una metodología relativamente sencilla de formulación que como equipamiento accesorio solo requiere de un extrusor para la formación de liposomas. En cuanto a las metodologías como la diálisis (Höglund et al., 1989), una de sus grandes desventajas es la duración del proceso de preparación debido a los frecuentes cambios de tampón. Una segunda desventaja es que puede haber detergente residual en la preparación de ISCOMs, y los tensioactivos no iónicos residuales pueden influir en la formación y prevalencia de las estructuras coloidales (Myschik et al., 2006). Finalmente, una desventaja muy importante es el alto costo de los detergentes que utiliza para su aplicación, como el MEGA-10. En cuanto al método hidratación de la película lipídica (Copland et al., 2000) presenta varias desventajas, ya que se obtienen muestras más heterogéneas en comparación con la diálisis y la inyección de etanol. Además, las muestras requieren tiempos de equilibrio prolongados.

En lo que respecta a los componentes de estas formulaciones, han sido estudiadas una gran cantidad de variables como ser las variaciones de tipo y cantidad de saponinas y / o fosfolípidos (Sun et al., 2009), sin embargo, los enfoques de estos estudios no han sido orientados a la reducción de costos de la fórmula final, lo que impacta directamente en su uso en veterinaria. En nuestra experiencia, el fosfolípido comercial que mejor se adaptó a la metodología de trabajo fue DPPC, con el que se optimizó la fórmula original desarrollada por Bertona et al., 2017 (Bertona et al., 2017). Sin embargo, en la búsqueda de opciones de menor costo se consideró un derivado hidrogenado de soja (HSPC) con el que obtuvimos resultados que indican la factibilidad de su uso, pero sin que presente ventajas en relación al DPPC. Desde el punto de vista práctico, DPPC ha dado lugar a partículas estables, de tamaños homogéneos y de síntesis sencilla, mientras que HSPC ha resultado un fosfolípido que conlleva un manejo de mayor dificultad, con temperaturas de trabajo que no se adaptan a la técnica del precursor liposomal desarrollada con anterioridad, partidas con baja reproducibilidad y partículas con baja estabilidad en el tiempo (resultados no mostrados). Además, si bien el costo del insumo es menor, no se reduce considerablemente el costo final del adyuvante.

Este problema nos condujo a la búsqueda de fuentes de lípidos de tipo natural como derivados de soja o huevo. Por un lado, con el objetivo de obtener fracciones de fosfolípidos ricas en fosfatidilcolina (PC) para la fabricación del adyuvante se han ensayado extracciones sucesivas del residuo del desgomado de aceites de soja empleando como solventes extractores alcoholes y acetona. De esta manera se propuso obtener una fuente de PC de bajo costo de forma sencilla y aprovechando residuos industriales de origen local. A partir de las técnicas extractivas optimizadas se obtuvieron fracciones de fosfolípidos ricas en fosfatidilcolina. El extracto obtenido se adaptó con facilidad a la técnica del precursor liposomal y mostro resultados promisorios dada su alta reproducibilidad. Resultó interesante que, cuanto fueron



utilizados estos lípidos en relación al comercial DPPC, la concentración de colesterol necesaria para formular las nanopartículas se redujo en una proporción de un 87% (ISPA original: 1,05 mg/ml vs ISPA 0,13 mg/ml). Esto podría explicarse considerando que los lípidos vegetales, aunque no contengan colesterol, si presentan esteroides vegetales propios que podrían compensar esta característica y darles cierta estabilidad. De todas formas, el colesterol ha resultado necesario para la formulación de las nanopartículas, lo que significa un costo adicional.

Finalmente, optamos por la yema de huevo de gallina, dado que es una fuente de lípidos económica y ampliamente disponible. Debido a que este insumo presenta una mezcla de fosfolípidos y colesterol, constituye una materia prima prometedora para la preparación de nanopartículas (Gil & Barroeta, 2016; Kondratowicz et al., 2018; Kondratowicz, Weiss, et al., 2019). Aunque las fuentes animales de reactivos utilizados para producir vacunas pueden ser una preocupación, los huevos se utilizan tradicionalmente para cultivar partículas virales para producir, por ejemplo, vacunas contra la influenza de forma histórica debido a sus costos (Pérez Rubio & Eiros, 2018; Rajaram et al., 2020). El uso de estas vacunas ha demostrado ser seguro, incluso en personas alérgicas al huevo que requieren una cantidad mínima de proteína de huevo de 30 µg para desarrollar reacciones alérgicas (Kelso, 2014). Esta cantidad es muy superior a la obtenida en el proceso de fabricación de vacunas derivadas del huevo (Kelso, 2014). Como ejemplo, durante el proceso de fabricación de vacunas contra el virus de la fiebre amarilla, el virus atenuado se inocula en huevos de gallina y los niveles de ovoalbúmina detectados después del cultivo oscilan entre 0,067 µg / 0,5 ml y 2,21 µg / 0,5 ml (Gerhardt et al., 2020). Teniendo en cuenta la cantidad de extracto que utilizamos para obtener las partículas y que se detectan valores incluso menores de 0,5 µg por mg de extracto de yema, la cantidad de proteína que contiene sería de aproximadamente unos 1,02 µg/ml en concentración final por ml de adyuvante. Esta cantidad es incluso inferior a 2 µg/ml, que se ha establecido por la legislación de la Unión Europea como la concentración máxima permisible de proteína de huevo en seres humanos que presentan anafilaxia por huevo (Cancado et al., 2019). Además el adyuvante se utiliza diluido, lo que disminuye aún más la cantidad de proteína presente en la formulación final. Por tanto, aunque se deben realizar más estudios en las especies para las que se desarrollarán vacunas con este adyuvante, la cantidad de extracto de huevo utilizada en la formulación no sería una limitación.

Para obtener mezclas de lípidos con diferentes proporciones y por tanto diferentes propiedades, se puede utilizar la aplicación de diferentes procedimientos de extracción. Muchos estudios anteriores se centraron principalmente en la extracción de lípidos totales mediante sistemas multidisolventes, basados en el principio de diferentes solubilidades de lípidos neutros y lípidos polares en diversos disolventes orgánicos, como acetona, éter dietílico, hexano, cloroformo y etanol (Su et al., 2015). Sin embargo, la mayoría de los disolventes orgánicos

utilizados en el proceso de extracción son tóxicos y sus residuos presentan un riesgo potencial para la salud. Recientemente, se reportó un método novedoso para el fraccionamiento de fosfolípidos, triacilgliceroles y colesterol mediante la combinación de extracción con etanol y cristalización a baja temperatura, lo que constituye una metodología práctica y económica (Su et al., 2015). A partir de este método de separación de lípidos, al que hemos introducido modificaciones, hemos obtenido extractos con las características químicas requeridas para nuestro propósito. Determinamos el rendimiento de extracción de lípidos en tres partidas de extractos de yema de huevo, obteniendo valores equivalentes a los reportados por otros autores utilizando el mismo sistema solvente (Kondratowicz et al., 2018; Su et al., 2015). El extracto obtenido presentó una relación de fosfolípidos y colesterol que permitió la formación de partículas en forma de jaula sin el agregado de colesterol (relación Colesterol / Fosfolípidos = 0,32 mol / mol). El mismo está compuesto principalmente por fosfolípidos, colesterol y acilgliceroles. Los fosfolípidos que componen el extracto son en su mayoría una mezcla de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. En proporciones menores, también se recuperaron esfingomiolina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina. Es notable que se detectaran proporciones bajas pero no despreciables de lisofosfolípidos, principalmente L-PC y L-PE, en todos los lotes. Estos componentes son comúnmente encontrados en menores concentraciones en los lípidos totales de los huevos, y por lo tanto probablemente fueron parcialmente generados a partir de los principales PC y PE durante la extracción de lípidos o en el proceso de liofilización. La aparición de estos lisofosfolípidos, aunque en bajas proporciones, podría contribuir a las propiedades biofísicas que permitieron la formación de partículas en forma de jaula. Las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos fueron similares en tres purificaciones independientes de tres lotes de huevos obtenidos en diferentes momentos. Es de destacar que las cadenas laterales de ácidos grasos insaturados predominantes presentes en los fosfolípidos derivados de huevo permiten una flexibilidad de las partículas obtenidas que no se consigue con el componente DPPC con el que se obtuvo el ISPA original. Esta diferencia se puede ver claramente por la facilidad con la que las partículas formadas pasan a través del extrusor, mientras que las del ISPA original son más difíciles de pasar (resultados no mostrados). Esta propiedad ya había sido descrita por Kondratowicz et al. 2019, quienes informaron que los liposomas realizados con lípidos de huevo son más fluidos que los obtenidos de otras fuentes (Bryła et al., 2015; Kondratowicz, Dopierała, et al., 2019; Kondratowicz et al., 2018; Kondratowicz, Weiss, et al., 2019). En relación a la reproducibilidad de la composición de diferentes extractos obtenidos a partir de distintas fuentes de yema de huevo, se puede decir que los principales componentes necesarios para formar partículas en forma de jaula se conservaron en diferentes purificaciones (fosfolípidos, colesterol y sus proporciones). Sin embargo, algunos componentes minoritarios como lisofosfolípidos y acilglicéridos neutros (TAG y DAG)

mostraron una ligera variabilidad en sus proporciones en los diferentes lotes de purificación. Como se utilizaron huevos de diferente origen, estas pequeñas diferencias podrían atribuirse a las de la alimentación de las gallinas. Por tanto, conviene utilizar huevos del mismo origen para garantizar una composición constante de lípidos. En caso contrario, la determinación de la composición relativa de lípidos en los huevos se puede realizar fácilmente antes del procedimiento de extracción.

Hasta el presente trabajo, no se habían estudiado las ventajas o desventajas de incorporar mezclas de fosfolípidos y acilgliceroles en la obtención de partículas en forma de jaula. Como se muestra en las pruebas funcionales, los componentes lipídicos adicionales a los comúnmente utilizados en la formación de jaulas lipídicas no alteraron la funcionalidad del adyuvante, que presentó un desempeño similar, e incluso mejor, que las partículas obtenidas con componentes comerciales. Es de destacar el papel inmunoestimulador que podrían incorporar los lisofosfolípidos a través del reconocimiento por receptores que estimulan la expresión de quimiocinas como MIP-1-Beta (Shao et al., 2017). Por ejemplo, se ha informado que la lisofosfatidilcolina se genera fisiológicamente como una respuesta de alarma del cuerpo a una lesión tisular, un trauma o una infección y puede proporcionar señales de "peligro" que son detectadas por las células dendríticas derivadas de monocitos para mejorar la presentación de antígenos y la posterior respuesta por inmunidad adaptativa (Shao et al., 2017).

En este trabajo, se han reemplazado los fosfolípidos comerciales y solo se agregaron esterilamina y tocoferol como componentes comerciales de la formulación. Se agregó tocoferol ya que fue utilizado en ISPA original para actuar como antioxidante y teniendo en cuenta el efecto beneficioso que tiene en la respuesta de anticuerpos (Bertona et al., 2017). El extracto de lípido de yema utilizado para construir las partículas analizadas correspondió al lote 1 que permitió obtener las partículas más pequeñas analizadas por DLS (datos no mostrados). Una posible explicación a este hecho es que este lote presentó la menor cantidad de TAG, lo que podría interferir en la formación de partículas ya que un alto contenido de TAG disminuye la estabilidad de las monocapas de fosfolípidos de huevo según se ha reportado previamente (Konratowicz, Weiss, et al., 2019). La obtención de partículas a partir de extractos que contienen diferentes proporciones de lípidos requiere de una caracterización adicional. El análisis de la respuesta humoral y DTH en ratones inmunizados con ovoalbúmina y las distintas formulaciones adyuvantes determinó que los lípidos de la yema de huevo y la saponina extraída del Kerry® refinado eran capaces de generar una respuesta inmune similar a la obtenida con componentes comerciales. Además, se pudo observar una respuesta de IgG2a más alta para el adyuvante ISPA YOLK que para el ISPA original. Este resultado es de gran interés teniendo en cuenta que la presencia de este isotipo es indicativa de una respuesta de tipo Th1 que es importante para la resolución de muchos tipos de infecciones y, en particular, de

microorganismos intracelulares (Lazarevic & Glimcher, 2011). Además, la respuesta de hipersensibilidad retardada fue notable con el adyuvante, observándose una inflamación muy importante 48 horas después de la inoculación con ovoalbúmina. Este resultado indica una fuerte respuesta celular contra el antígeno inoculado promovido por el adyuvante. También es compatible con el perfil de respuesta Th1 indicado anteriormente en base a la respuesta del isotipo de anticuerpos IgG2a. Por tanto, la respuesta obtenida fue muy similar a la obtenida con nuestro desarrollo anterior utilizando compuestos comerciales (Bertona et al., 2017).

#### 4.6. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 2

- ❖ En el caso de los fosfolípidos comerciales derivados de soja (HSPC), los mismos han sido utilizados por otros autores en formulación de liposomas. Sin embargo, en este trabajo encontramos que son difíciles de adaptar a las técnicas de obtención de liposomas que puedan usarse para preparar jaulas lipídicas.
- ❖ El uso de fosfolípidos de soja derivados de residuos industriales da como resultados nanopartículas con estabilidad y tamaño adecuados. Una comparación de dicho adyuvante con los otros obtenidos en este trabajo está pendiente. Sin embargo el uso de componentes comerciales disminuye el interés por dicha formulación.
- ❖ Se determinó que los extractos lipídicos derivados de yema de huevo permiten generar una respuesta inmunológica similar a la de los componentes comerciales (al menos en los parámetros medidos), cuando el adyuvante desarrollado se preparó con saponina Kerry® y mediante la técnica del precursor liposomal.
- ❖ Se obtuvo una mayor respuesta en ISPA original y las partidas formuladas mediante el método del precursor liposomal de la formulación ISPA YOLK (PLP1), confirmando un mejor desempeño de las partículas con el uso de esta técnica.
- ❖ Se formularon partidas de volúmenes escalables, lo que resulta promisorio para la comercialización del producto y su uso masivo.

## **5. CAPÍTULO 3**

# **Obtención de variantes potenciadas del adyuvante ISPA**

## 5.1. INTRODUCCIÓN

Como se describe en la introducción, los adyuvantes actúan mediante la estimulación de receptores que activan vías de respuestas del sistema inmune innato así como mediante la entrega controlada de los antígenos (Sarkar et al., 2019). En particular, las jaulas lipídicas se caracterizan por favorecer la entrega al interior de las células dendríticas para lograr un procesamiento y presentación del antígeno por las vías endocítica y cruzada (Sun et al., 2009). Además, generan la activación celular estimulando receptores tipo NOD (Wilson et al., 2014). Las distintas sustancias que componen los adyuvantes estimulan uno o más receptores generando una respuesta inmunológica acorde con dicha estimulación. Un ejemplo son los derivados de la aluminio que activan IL-1 vía NLRP3, generando una respuesta de tipo Th2 (Shi et al., 2019). Una opción para potenciar los adyuvantes es conjugar componentes que presenten distintos modos de acción activando una mayor diversidad de receptores. Dicha estrategia ha sido utilizada por ejemplo por la empresa GSK que ha desarrollado una línea de adyuvantes basada en mezclas de componentes a los que han llamado Adjuvant System, muchos de los cuales ya se encuentran aprobados para uso humano. Así por ejemplo AS04 contiene sales de aluminio y MPLA que sumado al efecto del aluminio estimula TLR4, potenciando ampliamente la respuesta siendo este el adyuvante utilizado en la vacuna Cervarix® para Herpes virus de GSK (Garçon et al., 2013). A partir de esto, se desprende que el potencial de un adyuvante, entre otras propiedades, radica también en su capacidad de ser complementado con otros compuestos con el fin de aumentar o dirigir su poder inmunoestimulante. En este trabajo, hemos propuesto suplementar el adyuvante con compuestos disponibles en el mercado que han mostrado aumentar la respuesta inmune. Se han utilizado diferentes enfoques, por un lado, combinando el adyuvante mediante mezcla simple en la formulación de la inmunización o bien, utilizando estrategias de derivatización química de las jaulas lipídicas que permitan una entrega del antígeno y el adyuvante en forma conjunta al sistema inmune.

Las sustancias elegidas para suplementar el adyuvante ISPA original, fueron rapamicina, c-diAMPc y un antagonista de CCR4:

La rapamicina es un macrólido producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* que fue descubierta en muestras de suelo de la isla de Pascua. Aunque la rapamicina se describió originalmente como un agente antifúngico, pronto se descubrió que tiene actividad inmunosupresora, siendo capaz de inhibir la proliferación de células T y de suprimir la incorporación de aminoácidos en las proteínas celulares, inhibiendo la traducción de proteínas (Arriola Apelo & Lamming, 2016). Sin embargo, estudios recientes han descrito que la rapamicina, utilizada en bajas dosis es capaz de aumentar la memoria inmunológica de las células CD8+ (Gammon et al., 2017). En base a estas características, la rapamicina se ha

utilizado comúnmente en el trasplante de órganos para prevenir el rechazo del injerto, pero también varios estudios han informado que la inhibición de mTOR mediante el tratamiento con dosis bajas y continuas de rapamicina durante el desafío inmunitario de las células T CD8+ podría mejorar la función y la formación de la memoria después de infecciones virales o desafíos (Moraschi et al., 2021). Esta característica la hace sumamente interesante, considerando que podría estimular la generación de memoria inmunológica, suplementando al adyuvante ISPA.

En relación a los dinucleótidos cíclicos como el c-di-AMPC, estos son segundos mensajeros sintetizados por las bacterias que han comenzado a utilizarse como adyuvantes para potenciar candidatos vacunales por su capacidad de estimular los receptores STING, (stimulator of interferon). Dichos receptores activan cascadas de señalización que inducen la expresión de IFN- $\beta$  y el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Libanova et al., 2012). Recientemente, ha sido descrito que esta molécula actúa activando la producción de interferones de tipo 1 y se ha mostrado que esta vía es responsable de fomentar la presentación cruzada por parte de las células dendríticas, lo que estimula la respuesta citotóxica específica cuando se lo usa como adyuvante (Lirussi et al., 2017). Es interesante que estas moléculas constituyan, junto con las jaulas lipídicas, un grupo muy reducido de candidatos a adyuvantes que fomentan la respuesta citotóxica pero presentan vías de activación diferentes de las CPAs (los dinucleótidos cíclicos como AMP estimulan a STING mientras que las partículas tipo jaula estimulan a NOD y la formación de cuerpos lipídicos), por lo que su utilización conjunta podría potenciar la respuesta obtenida.

Otra estrategia para potenciar la respuesta inmune de las vacunas que comienza a considerarse cada vez más, es inhibir la participación de células con capacidad supresora como las células T regulatorias Foxp3 (Treg) durante el proceso de inmunización. Dado que las células Treg emplean el receptor CCR4 para migrar e inhibir células dendríticas durante la etapa de inmunización, se ha propuesto el uso de un antagonista de dicho receptor (anti-CCR4) como modo de aumentar la eficacia de un prototipo vacunal (Pere et al., 2011). En un trabajo previo del grupo del LTI se ha establecido una colaboración con el Dr. Jagadeesh Bayry, quien ha desarrollado un inhibidor de dicho receptor para evaluar su uso vacunas. En este trabajo se ha utilizado dicha molécula como complemento del adyuvante (Bayry et al., 2008).

Finalmente, como se describe en la introducción, una limitación importante de la tecnología ISCOM es que la mayoría de las proteínas hidrosolubles no suelen contener regiones hidrófobas expuestas y, por lo tanto, son difíciles de incorporar a la estructura. Aunque es posible insertar moléculas no anfipáticas en los ISCOM, o al menos asociarlas, se requieren modificaciones estructurales como la desnaturalización parcial de las proteínas para exponer regiones hidrófobas normalmente internas dentro de las mismas. Sin embargo, estos métodos pueden conducir a una pérdida de epítopos de células B conformacionalmente dependientes.



Una estrategia alternativa es unir ácidos grasos covalentemente a proteínas solubles. La bioconjugación de tales moléculas normalmente se logra químicamente mediante el uso de cloruros ácidos o derivados de éster activados de estos ácidos grasos. Mediante el uso de esta estrategia química, una serie de proteínas hidrosolubles, entre ellas la ovoalbúmina (OVA), se han incorporado con éxito en los ISCOM (Cruz-Bustos et al., 2012). Por tal motivo, hemos trabajado en la optimización de este tipo de nanopartículas ligando ISPA e ISPA YOLK a OVA mediante las técnicas descritas por Cruz-Bustos et al., 2012 (Cruz-Bustos et al., 2012) a lípidos tipo vinil-sulfona. Con las estructuras obtenidas, hemos evaluado el desempeño inmunológico de las versiones derivatizadas del adyuvante ISPA y la nueva formulación ISPA YOLK, comparándolas con las formulaciones no derivatizadas.

## **5.2. OBJETIVO ESPECÍFICO**

- ❖ Obtener variantes potenciadas del adyuvante que permitan mayores respuestas inmunológicas en el caso de ser necesario para el desarrollo de vacunas con inmunógenos que no respondan a ISPA o en poblaciones no respondedoras.

### **5.3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **5.3.1. Formulación de nanopartículas adyuvantes**

Las partículas adyuvantes ISPA original e ISPA YOLK fueron formuladas tal como se describe en el capítulo 2, mediante la técnica optimizada por Bertona et al., 2017 (Bertona et al., 2017).

#### **5.3.2. Derivatización de las nanopartículas adyuvantes con lípidos tipo vinil sulfona**

Las nanopartículas se funcionalizaron según lo informado por Cruz-Bustos et al (Cruz-Bustos et al., 2012). La lípido vinil sulfona (LVS) se sintetizó como lo describen Cruz-Bustos et al. y Morales-Sanfrutos et al. (Cruz-Bustos et al., 2012; Morales-Sanfrutos et al., 2010). Brevemente, para vincular la LVS a las nanopartículas ISPA e ISPA YOLK, estos se solubilizaron en una relación 1:1, en solución de 2 mg / ml de lípido sulfona en metanol mezclada en partes iguales con tampón carbonato 0,125 mM (pH 9,3) en agitación a 4°C toda la noche. Después, la solución se mezcló en un agitador orbital con 1 ml de una solución de 0 3,3 mg / ml de OVA (ISPA original) o 1,6 mg / ml de OVA (ISPA YOLK) en tampón carbonato en una proporción de 1:1, y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 4 horas. Las diferentes concentraciones de OVA, utilizadas en la preparación de ISPA original e ISPA YOLK respectivamente, fueron diferentes debido a que se tuvo en cuenta la misma para inocular la misma concentración de antígeno independientemente de la cantidad de adyuvante que es posteriormente utilizado; es decir: 10 µg OVA / 3µl de ISPA Original y 10 µg OVA / 6 µl de ISPA YOLK. Luego, los grupos vinilsulfona sin reaccionar se bloquearon con una solución de glicina 1 M en tampón de carbonato durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Por último se dializaron a través de la Membrana de Diálisis-50 (corte de peso molecular 5000-10000) frente a acetato de amonio 0,1 M, pH 7,0 durante toda la noche a 4° C, se concentraron mediante el uso de Polietilenglicol 10000 g/mol (PEG 10000), finalmente se liofilizaron y almacenaron hasta su uso (Rodríguez-Serrano et al., 2016).

#### **5.3.2.1. Caracterización de partículas obtenidas**

##### **5.3.2.1.1. Determinaciones Estructurales**

Para determinar si las partículas obtenidas presentaban las características esperadas, se determinó el tamaño de las partículas mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS), el potencial zeta ( $\zeta$ ) y finalmente la ultra estructura de las mismas mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM). La distribución del tamaño de partícula y la movilidad electroforética (transformada a valores de potencial  $\zeta$ ) en función del pH se analizaron con un analizador Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Reino Unido)

utilizando cubetas de poliestireno desechables que contenían las partículas suspendidas en agua desionizada a 25°C. La viscosidad del medio disperso a 25°C se fijó en 0.8872 cp. (Correspondiente al agua) (Bertona et al., 2017; Gómez-Morales et al., 2019). La ultraestructura se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Libra 120 Plus de Carl Zeiss SMT). Esta técnica se llevó a cabo depositando 5 µl de la suspensión adsorbida directamente sobre una rejilla de cobre recubierta con Formvar, teñido con acetato de uranilo al 1% y observado directamente bajo el microscopio (Gómez Samblás, 2017).

#### **5.3.2.1.2. Determinaciones Funcionales**

Se calculó el índice hemolítico adaptando el protocolo utilizado por Mac Donald et al., 2017 (Mac Donald et al., 2017) como se describió con anterioridad en el apartado 3.3.2.2.2. del capítulo 1.

#### **5.3.3. Evaluación del desempeño inmunológico**

##### **5.3.3.1. Evaluación inmunológica de la suplementación de nanopartículas ISPA con compuestos potenciadores de la respuesta adyuvante**

Se diseñaron cuatro nuevas formulaciones que consistieron en complementar las partículas ISPA formuladas mediante la técnica optimizada en Bertona et. al., 2017 con compuestos potenciadores siendo estas: rapamicina (Sigma-Aldrich®), c-di-AMPC (Sigma-Aldrich®) y un antagonista de CCR4 (gentilmente provisto por el Dr. Bayry) (Bayry et al., 2008). Se utilizaron ratones como modelo animal con las mismas características que en capítulos anteriores. Los protocolos de trabajo fueron similares a los descriptos previamente. Se utilizaron tres a cinco ratones por grupo y se aplicaron tres dosis por animal de acuerdo con el siguiente esquema:

- GRUPO 1: ISPA - (10 µg de OVA + 3µl de ISPA en 100 µl de PBS)
- GRUPO 2: ISPA-rapamicina - 1 (10 µg de OVA + 3 µl de ISPA + 2 µg rapamicina en 100 µl de PBS)
- GRUPO 3: ISPA-rapamicina - 2 (10 µg de OVA + 3 µl de ISPA + 10 µg rapamicina en 100 µl de PBS)
- GRUPO 4: ISPA-antagonista de CCR4 - (10 µg de OVA + 3 µl de ISPA+ 1,5 µg de antagonista de CCR4 en 100 µl de PBS)
- GRUPO 5: ISPA-c-diAMPC - (10 µg de OVA + 3 µl de ISPA+ 5 µg de c-diAMPC en 100 µl de PBS)
- GRUPO 6: CONTROL - (100 µl PBS)

#### **5.3.3.1.1. Determinación de la respuesta inmunológica**

**ELISA:** los anticuerpos desarrollados en los diferentes tiempos se evaluaron mediante ELISA indirecto adaptando protocolos de trabajo descritos en el apartado 3.3.3.2. del capítulo 1.

**DTH:** la respuesta de hipersensibilidad retardada se determinó como se describe en capítulos anteriores (3.3.3.2., del capítulo 1).

**ACTIVACIÓN CELULAR:** Para el análisis de la activación celular a largo plazo, fueron sacrificados cuatro animales por grupo experimental a los 165 días DPI y luego se prepararon suspensiones celulares de bazo tal como se describió previamente (Prochetto et al., 2017). Brevemente, los bazos se recolectaron asépticamente y se homogeneizaron. Se eliminaron los glóbulos rojos y se resuspendieron los esplenocitos en medio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina al 2% (100 µg/ml), estreptomycin (100 U/ml) y 2-mercaptoetanol 0,4 mM. Posteriormente, se cultivaron  $1 \times 10^6$  células por pocillo en placa de 96 pocillos en un volumen final de 200 µl de medio completo de cultivo (RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino y penicilina 100 U/ml - estreptomycin 100 µg / ml). A cada pocillo se agregó OVA 5 µg / ml y Concanavalina A 5 µg / ml. Luego de 72hs de cultivo a 37°C las células fueron recuperadas y marcadas con anticuerpos BD-Pharmingen® anti-CD4 conjugado a fluoresceína isotiocianato (FITC) y anti-CD44 conjugado a ficoeritrinacianina 5.5 (PE-Cy5.5), en PBS/suero fetal bovino 3% y azida 0,1%. Las marcaciones se realizaron durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad con 1µg/millón de células y luego de dos lavados con PBS/Suero fetal bovino 3% y azida 0,1%, las células se resuspendieron en paraformaldehído 0,5% y fueron adquiridas en un citómetro Attune NxT. Los resultados se analizaron utilizando el programa FlowJo.

#### **5.3.3.2. Evaluación inmunológica de la derivatización de las nanopartículas adyuvantes con lípidos tipo vinil sulfona y su posible uso para ligación a proteínas de interés vacunal**

Siguiendo los protocolos y reglamentación de la legislación española vigente, para el bienestar animal, se utilizó OVA como antígeno modelo y grupos de animales tal como se describió en los capítulos anteriores. Los protocolos de inmunización fueron semejantes a los detallados previamente (ítem 3.3.3.1., capítulo 1.), pero se utilizaron ratones CD1, correspondiente a los animales disponibles en el laboratorio en el que se realizó el ensayo (Laboratorio de Bioquímica y Parasitología Molecular – Departamento de Parasitología – Facultad de Ciencias – Universidad de Granada - ESPAÑA). Se aplicaron 3 dosis descritas a continuación, de acuerdo a lo indicado en cada apartado.

- GRUPO 1: ISPA – (10 µg de OVA + 3 µl de ISPA en 100 µl de PBS)
- GRUPO 2: ISPA YOLK - (10 µg de OVA + 6 µl de ISPA en 100 µl de PBS)
- GRUPO 3: ISPA FUNCIONALIZADO - (10 µg de OVA + 3 µl de ISPA en 100 µl de PBS)
- GRUPO 4: ISPA YOLK FUNCIONALIZADO - (10 µg de OVA + 6 µl de ISPA en 100 µl de PBS)
- GRUPO 5: CONTROL - (100 µl PBS)

#### 5.3.3.2.1. Determinación de la respuesta inmunológica

**ELISA:** A los 15, 30 y 45 días posteriores a la primera inmunización (DPI) se obtuvieron muestras de plasma para la determinación de la respuesta inmune humoral. Los anticuerpos desarrollados en los diferentes tiempos se evaluaron mediante ELISA indirecto adaptando protocolos de trabajo descritos con anterioridad (Gómez Samblás, 2017). Brevemente, se recubrieron placas de microtitulación (Nunc A/S – Thermo Scientific®) con OVA (5 µg / pocillo) en tampón carbonato-bicarbonato (0,1 M; pH 9,3), luego se bloquearon con PBS / leche (5%). Las muestras de plasma de ratones inmunizados fueron utilizadas como anticuerpo primario diluidas 1:100 en PBS / leche (1%), se incubaron por triplicado durante dos horas a 37°C. Después del lavado, se incubaron con 100 µl de una dilución de 1/1000 de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (Reactivos de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón - ISO2 - Sigma-Aldrich®) durante media hora a temperatura ambiente en agitador orbital. Después del lavado, se agregó el IgG anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa (Dako, Denmark – P0447) a una dilución de 1/5000 y se incubó nuevamente media hora a temperatura ambiente en agitador orbital. Finalmente para el revelado de la placa se añadieron 100 µl de solución sustrato de peroxidasa (tampón citrato pH 5 + O-fenil diaminobenzidina + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 v/v) que se dejó actuar durante 20 minutos a temperatura ambiente al resguardo de la luz. La reacción colorimétrica se detuvo con 50 µl de solución de ácido clorhídrico (HCl) 3 M. Se determinó la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA (Thermo, Multiskan Spectrum).

#### 5.3.4. Análisis de datos

Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism Software 8.0.1 (GraphPad, California, EE. UU.). Las diferencias entre grupos se analizaron aplicando los estadísticos no paramétricos prueba U de Mann Whitney y prueba de Kruskal – Wallis.

## 5.4. RESULTADOS

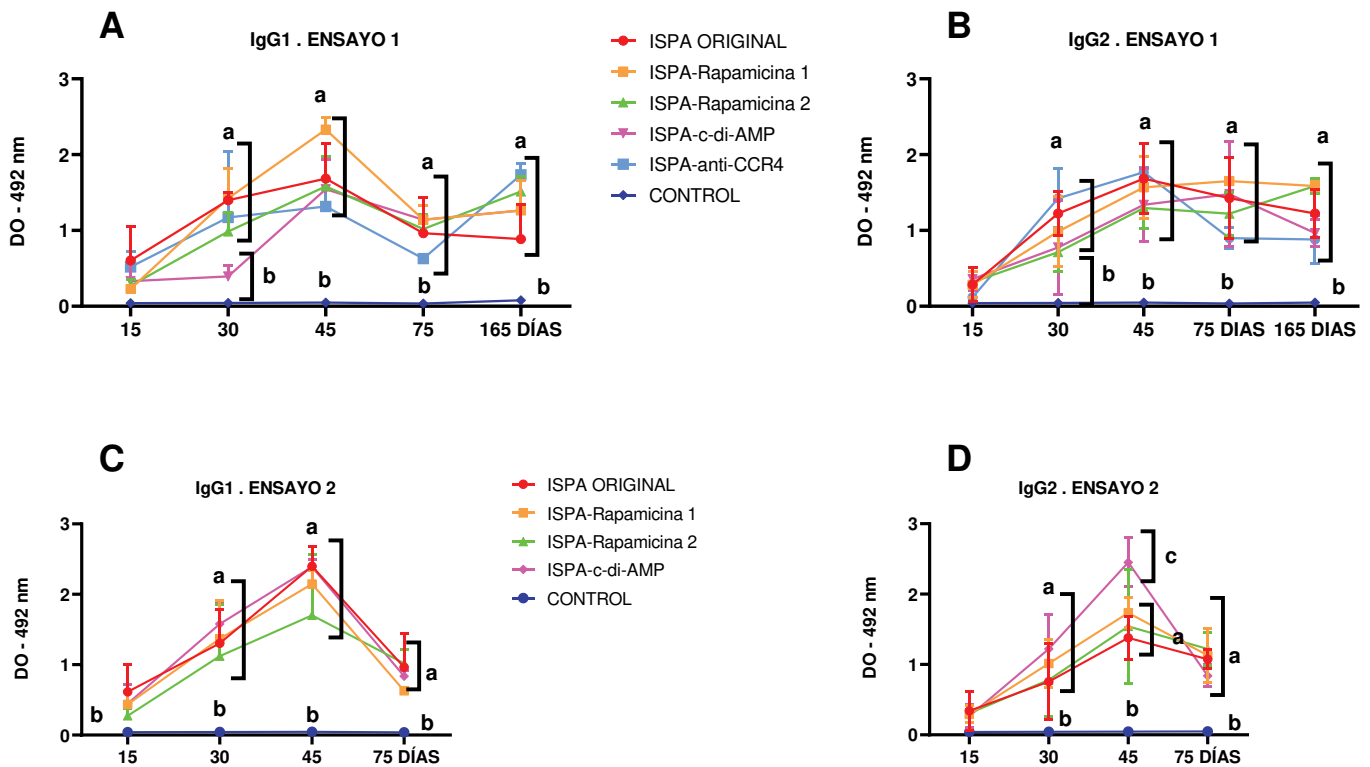
### 5.4.1. Suplementación de nanopartículas ISPA con compuestos potenciadores de la respuesta adyuvante

El experimento se repitió dos veces. El 1er experimento se siguió hasta el día 165 y 2do experimento se siguió hasta el día 75. En los dos casos se midieron anticuerpos a distintos tiempos y respuesta celular a los 165 (Experimento 1) y 75 (Experimento 2) días respectivamente. Los anticuerpos generados en los diferentes tiempos se evaluaron por ELISA indirecto. En el Experimento 1, todos los grupos mostraron aumento de la DO con respecto al grupo CONTROL (OVA sin adyuvante) a partir de los 15 días DPI, tanto de IgG1 (figura 27-A) como IgG2a (figura 27-B). En el Experimento 2, se observó el mismo patrón de curva cuando se analizaron los niveles de anticuerpos IgG1 (figura 27-C) e IgG2a (figura 27-D). Las respuestas humorales obtenidas con las diferentes formulaciones fueron similares cuando se analizaron en los distintos tiempos luego de cada dosis de inmunización (figura 27-A). Para IgG2a, se observó un aumento significativo de la formulación suplementada c-di-AMP respecto a ISPA ( $p= 0,007$ ) pero solo a los 45 DPI y luego la respuesta es similar para todos los grupos (figura 27-D). En esta instancia y para analizar la respuesta a lo largo del esquema de inmunización, se realizó el análisis de AUC para cada grupo de estudio tanto en los niveles de anticuerpos IgG1 (Experimento 1: tabla 20 y Experimento 2: tabla 22) como de IgG2a (Experimento 1: tabla 21 y Experimento 2: tabla 23). Mediante este análisis, se observó una tendencia, aunque no significativa, de un mejor rendimiento del grupo suplementado con rapamicina en su menor concentración en los dos experimentos y también para c-di-AMP en el segundo experimento (se puede observar una respuesta mayor de anticuerpos en el AUC para este grupo, pero el IC 95% se superpone con las demás condiciones).

En el experimento 1, la prueba de hipersensibilidad retardada (DTH) fue realizada en tres instancias: a los 45, 75 y 165 días DPI (figura 28-A). Se determinó en todos los grupos una alta respuesta DTH que no disminuyó con el tiempo y que 45 días DPI fue mayor para ISPA-rapamicina 2 (grupo de suplementación con rapamicina en su mayor concentración) ( $p<0,05$ ). Sin embargo esa diferencia deja de ser significativa en los días 75 y 165 ( $p>0,05$ ). En el experimento 2 (figura 28-B) la prueba DTH fue realizada en dos instancias: a los 45 y 75 días, observándose un patrón de columnas comparable al del ensayo 1.

Dados los resultados obtenidos en estos ensayos, como criterio para determinar la memoria de los Linfocitos T hacia el antígeno vacunal, se evaluó la capacidad de generar activación celular del adyuvante ISPA luego de 75 y 165 días DPI respectivamente y del mismo complementado con rapamicina en sus dos formas así como con c-di-AMPc y anti-CCR4 (Ensayo 1). A los 165 días DPI, los animales de los grupos de estudio fueron sacrificados y se

prepararon suspensiones celulares del bazo tal como se describe en el apartado 5.3.3.1.1. Luego del cultivo celular, se realizó una marcación para diferenciar las células T CD4+ activadas CD44hi y se estudiaron por citometría de flujo. Se observó que los grupos inmunizados con OVA y complementados con los adyuvantes ISPA-rapamicina 1 e ISPA-rapamicina 2 presentaron un porcentaje mayor, aunque no significativo, de linfocitos T CD4+ de cultivo con un perfil activado (CD44high), mientras que los demás grupos no presentaron mayor porcentaje de células activadas (figura 29). Este experimento se repitió una segunda vez (Experimento 2) a los 75 días DPI y nuevamente se encontró la misma tendencia (figura 30).



**Figura 27:** Respuesta humoral de ISPA original vs ISPA original con los distintos suplementos: A) Respuesta de IgG1 para el experimento 1; B) Respuesta de IgG2a para el experimento 1; C) Respuesta de IgG1 para el experimento 2; D) Respuesta de IgG2a para el experimento 2. Se utilizó ovoalbúmina como antígeno modelo que fue administrada con el adyuvante en todas las formulaciones. Se analizó el desempeño de las distintas formulaciones inmunizando ratones BALB/c (n=5/grupo). Se realizaron tres inoculaciones, una cada catorce días, obteniéndose muestras de sangre a los 15, 30, 45, 75, 165 DPI (Experimento 1) o a los 15, 30, 45, 75 DPI (Experimento 2). La relación a-b / a-c indica una diferencia estadística con  $p < 0,05$ . Sobre cada muestra se determinaron los niveles de IgG1 e IgG2a específicas anti-OVA mediante ELISA.



**Tabla 20:** Estadística de las áreas bajo la curva (AUC) para IgG1 (EXPERIMENTO 1).  
Se determinaron las AUC para la cinética de IgG1 obtenidos para cada adyuvante.

<i>AUC para IGg1</i>	<b>ISPA ORIGINAL</b>	<b>ISPA-Rapamicina 1</b>	<b>ISPA-Rapamicina 2</b>	<b>ISPA-anti-CCR4</b>	<b>ISPA-c-di-AMP</b>	<b>CONTROL</b>
<i>Área Total</i>	4,791	5,643	4,479	4,242	3,877	0,1893
<i>Error Estándar</i>	0,5742	0,3809	0,3726	0,6807	0,4077	0,01455
<i>Intervalo de confianza (95%)</i>	3,666 a 5,917	4,896 a 6,389	3,749 a 5,209	2,908 a 5,576	3,077 a 4,676	0,1608 a 0,2178

**Tabla 21:** Estadística de las áreas bajo la curva (AUC) para IgG2a (EXPERIMENTO 1).  
Se determinaron las AUC para la cinética de IgG2a obtenidos para cada adyuvante.

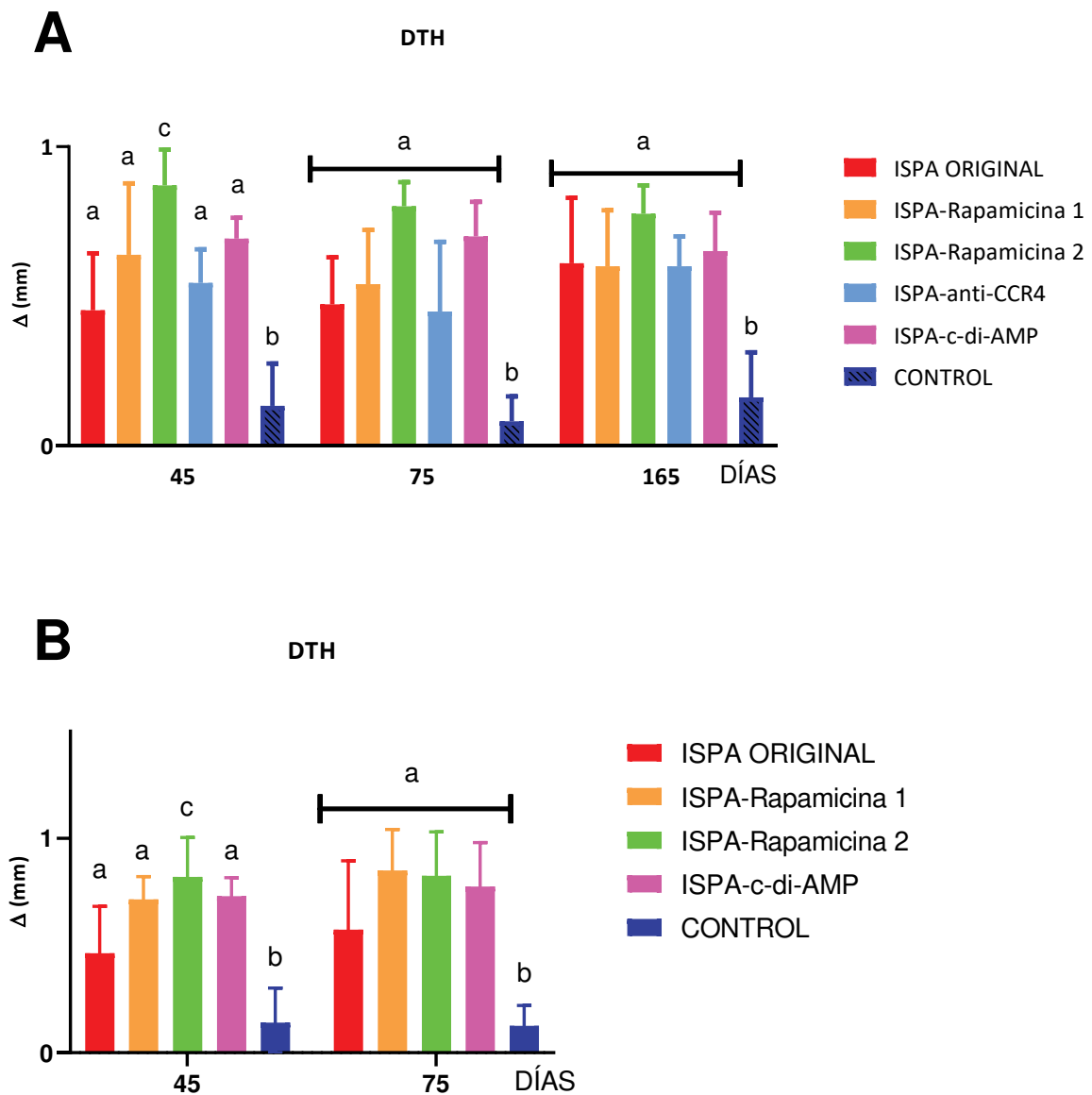
<i>AUC para IGg2a</i>	<b>ISPA ORIGINAL</b>	<b>ISPA-Rapamicina 1</b>	<b>ISPA-Rapamicina 2</b>	<b>ISPA-anti-CCR4</b>	<b>ISPA-c-di-AMP</b>	<b>CONTROL</b>
<i>Área Total</i>	5,089	5,143	4,180	4,593	4,258	0,1743
<i>Error Estándar</i>	0,5764	0,4464	0,3351	0,3339	0,7504	0,004425
<i>Intervalo de confianza (95%)</i>	3,959 a 6,219	4,268 a 6,018	3,524 a 4,837	3,939 to 5,248	2,787 a 5,729	0,1657 a 0,1830

**Tabla 22:** Estadística de las áreas bajo la curva (AUC) para IgG1 (EXPERIMENTO 2).  
Se determinaron las AUC para la cinética de IgG1 obtenidos para cada adyuvante.

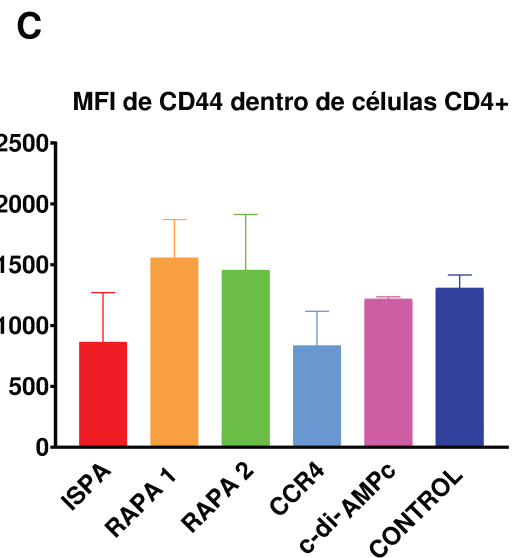
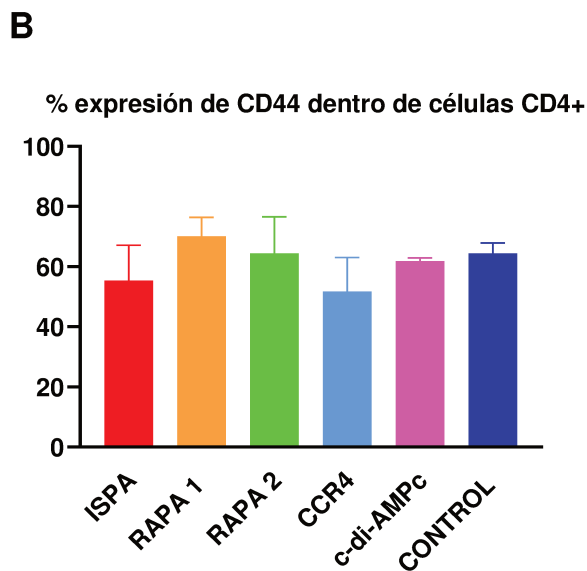
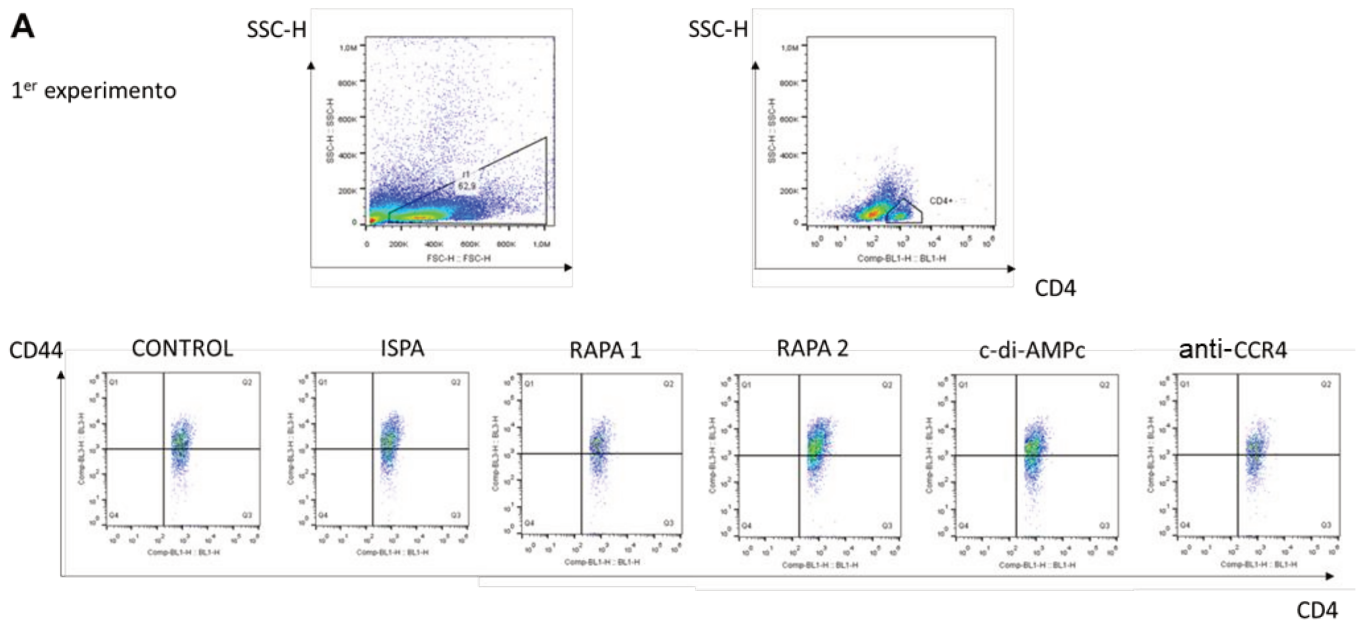
<i>AUC para IGg1</i>	<b>ISPA ORIGINAL</b>	<b>ISPA-Rapamicina 1</b>	<b>ISPA-Rapamicina 2</b>	<b>ISPA-c-di-AMP</b>	<b>CONTROL</b>
<i>Área Total</i>	4,492	4,049	3,470	4,607	0,1292
<i>Error Estándar</i>	0,4972	0,4142	0,8084	0,2736	0,003821
<i>Intervalo de confianza (95%)</i>	3,517 a 5,467	3,238 a 4,861	1,885 a 5,054	4,071 a 5,143	0,1217 a 0,1367

**Tabla 23:** Estadística de las áreas bajo la curva (AUC) para IgG2a (EXPERIMENTO 2).  
Se determinaron las AUC para la cinética de IgG2a obtenidos para cada adyuvante.

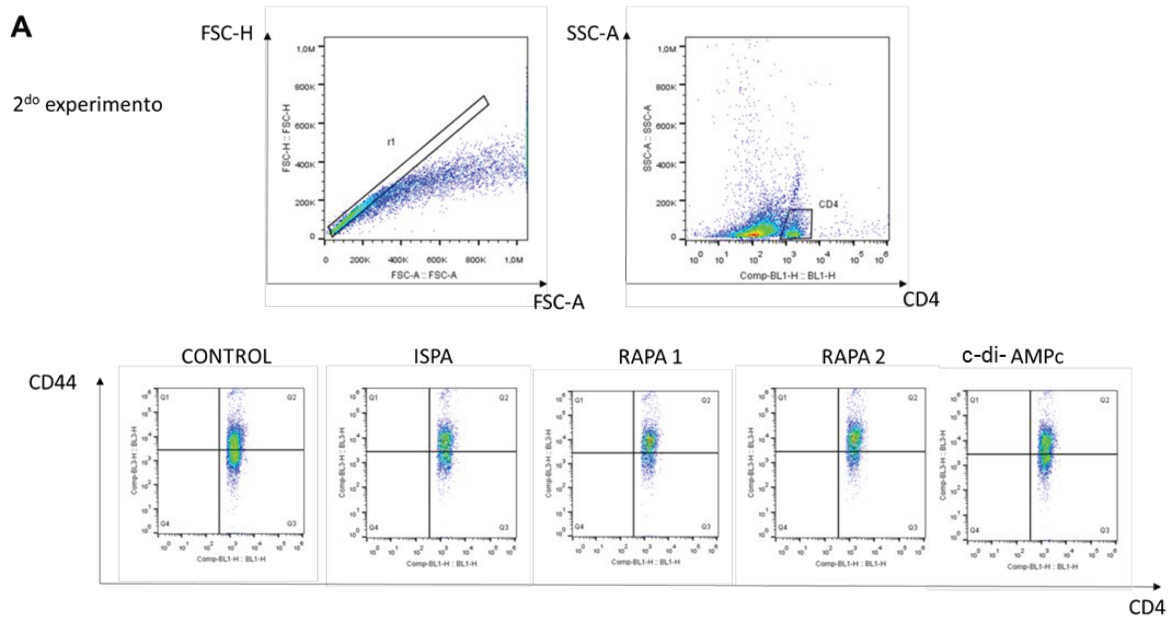
<i>AUC para IGg2a</i>	<b>ISPA ORIGINAL</b>	<b>ISPA-Rapamicina 1</b>	<b>ISPA-Rapamicina 2</b>	<b>ISPA-c-di-AMP</b>	<b>CONTROL</b>
<i>Área Total</i>	2,842	3,458	3,086	4,224	0,1350
<i>Error Estándar</i>	0,4645	0,3507	0,6906	0,4406	0,003442
<i>Intervalo de confianza (95%)</i>	1,932 a 3,753	2,770 a 4,145	1,732 a 4,439	3,360 a 5,087	0,1283 a 0,1417



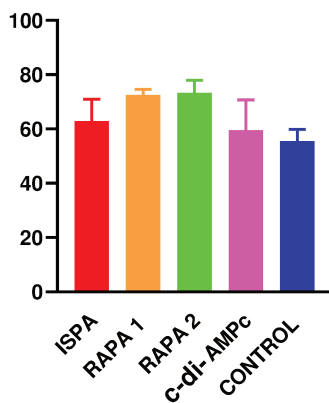
**Figura 28:** Con el objeto de determinar la respuesta celular que generan los distintos tipos de formulaciones se realizó la prueba de DTH. Esta fue realizada en tres instancias, a los 45, 75 y 165 días DPI (A - experimento 1) y a los 45 y 75 días DPI (B – experimento 2), registrándose las diferencias entre el miembro inoculado vs no inoculado mediante medición manual con calibre. La relación a-b / a-c / b-c indica una diferencia estadística con  $p < 0,05$ .



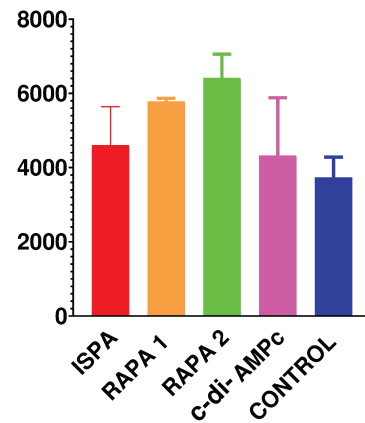
**Figura 29:** Estimación preliminar de la memoria celular obtenida con las diferentes formulaciones mediante la evaluación de la activación de células CD4+ estimuladas in vitro con OVA en esplenocitos obtenidos 165 días DPI 1: A: Dot plots representativos de las regiones y cuadrantes utilizados para los análisis. B: Porcentaje de expresión del marcador de activación CD44<sup>high</sup> dentro de las células CD4+; C: Intensidad de Fluorescencia media (MFI) de CD44 en células T CD4+. Se analizó el desempeño para lograr la activación de células CD4 de las distintas formulaciones a largo plazo inmunizando ratones BALB/c con OVA y las respectivas formulaciones (n=4/grupo). Se realizaron tres inoculaciones, una cada catorce días, obteniéndose esplenocitos 165 DPI. Para cada ratón se determinaron los porcentajes de células CD44+ dentro de CD4+ así como la intensidad de fluorescencia media (MFI) de estas poblaciones y se graficó la media de los valores obtenidos con el desvío SEM para cada formulación estudiada.



**B** % expresión de CD44 dentro de células CD4+



**C** MFI de CD44 dentro de células CD4+



**Figura 29:** Estimación preliminar de la memoria celular obtenida con las diferentes formulaciones mediante la evaluación de la activación de células CD4+ estimuladas in vitro con OVA en esplenocitos obtenidos 75 días DPI. 1: A: Dot plots representativos de las regiones y cuadrantes utilizados para los análisis. B: Porcentaje de expresión del marcador de activación CD44<sup>high</sup> dentro de las células CD4+; C: Intensidad de Fluorescencia media (MFI) de CD44 en células T CD4+. Se analizó el desempeño para lograr la activación de células CD4 de las distintas formulaciones a largo plazo inmunizando ratones BALB/c con OVA y las respectivas formulaciones (n=4/grupo). Se realizaron tres inoculaciones, una cada catorce días, obteniéndose esplenocitos 75 días DPI. Para cada ratón se determinaron los porcentajes de células CD44+ dentro de CD4+ así como la intensidad de fluorescencia media (MFI) de estas poblaciones y se graficó la media de los valores obtenidos con el desvío SEM para cada formulación estudiada.

#### 5.4.2. Derivatización de las nanopartículas adyuvantes con lípidos tipo vinil sulfona y su posible uso para ligación a proteínas de interés vacunal

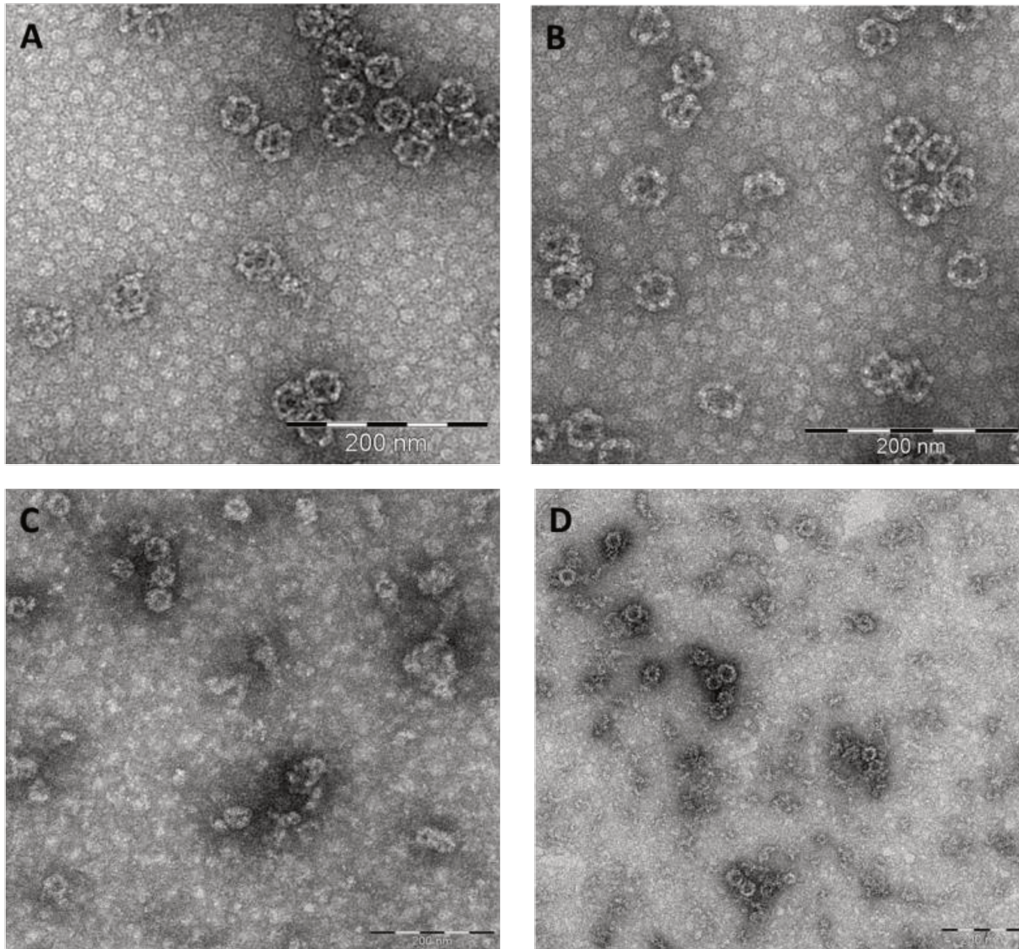
Se determinó que ISPA original estaba constituido por partículas con una media de 70 nm según medidas realizadas por DLS y que el potencial Z de las partículas fue de +24,5 MV. ISPA YOLK, estaba constituido por partículas con una media de 120 nm según la técnica DLS y su potencial Z fue de -24,3 MV (tabla 14).

El adyuvante ISPA ORIGINAL FUNCIONALIZADO, estaba constituido por partículas con una media de 491,3 nm según medidas realizadas por DLS y el potencial Z de las partículas fue de -17,4 MV. Por último, se determinó que ISPA YOLK FUNCIONALIZADO estaba constituido por partículas con una media de 250 nm según medidas realizadas por DLS mientras que el potencial Z fue de -26,6 MV (tabla 24).

La ultra estructura de las partículas fue determinada por TEM, lo que indica que se han formado partículas en forma de jaula de 40 a 50 nm en todos los casos (figura 30).

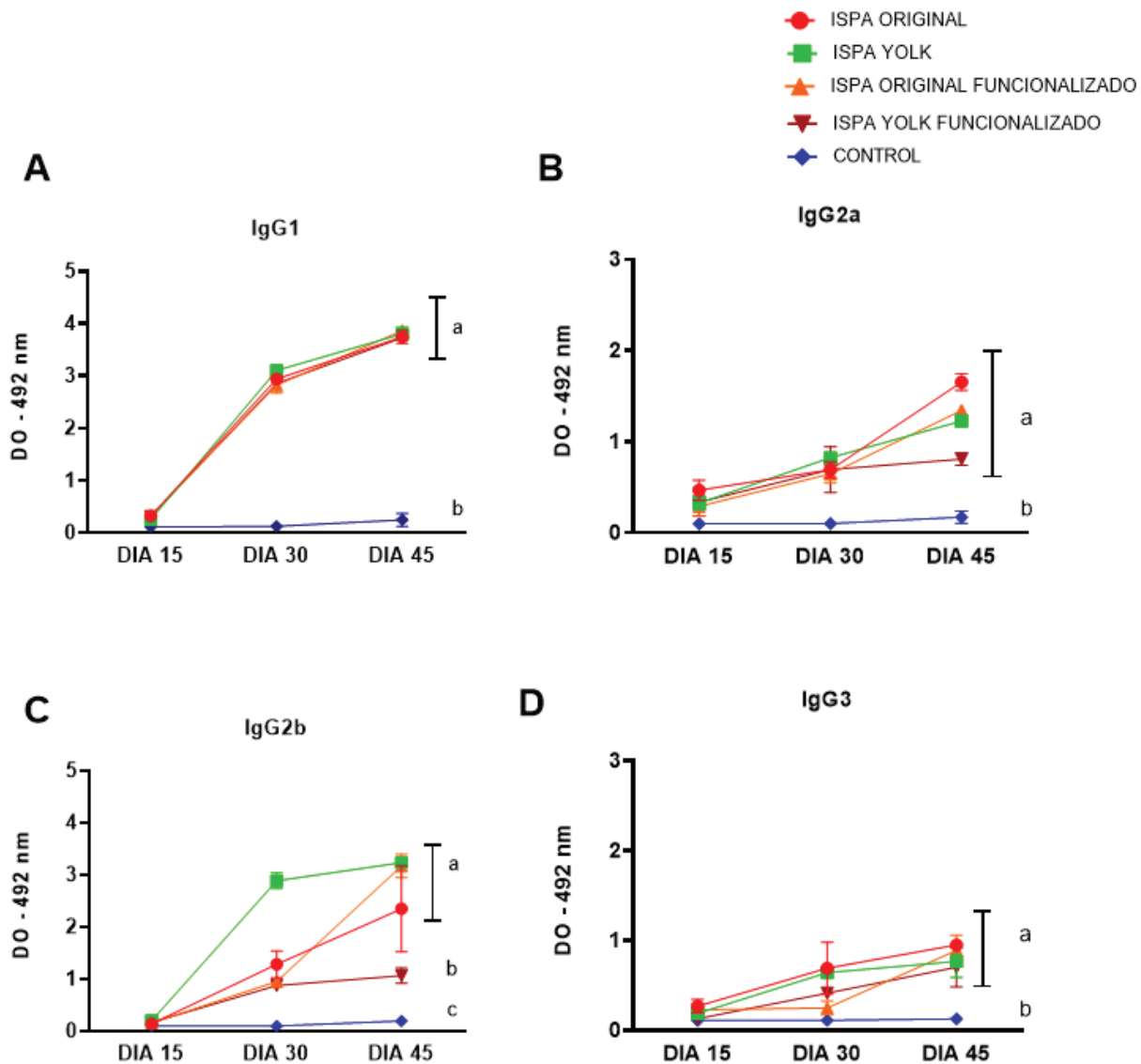
**Tabla 24: Detalle de tamaño de nanopartículas obtenidas medidas por la técnica DLS.**

<b>TIPO DE NANOPARTÍCULAS</b>	<b>Tamaño medio por DLS en nm</b>	<b>Potencial Zeta en MV</b>
<i>ISPA ORIGINAL</i>	70	+24,5
<i>ISPA YOLK</i>	120	-24,3
<i>ISPA ORIGINAL DERIVATIZADO</i>	491,3	-17,4
<i>ISPA YOLK DERIVATIZADO</i>	250	-26,6



**Figura 30:** Microscopia electrónica de transferencia (MET) de las nanopartículas obtenidas. A: ISPA original; B: ISPA YOLK; C: ISPA ORIGINAL FUNCIONALIZADO; D: ISPA YOLK FUNCIONALIZADO.

La respuesta humoral desarrollada por los distintos grupos de ratones inmunizados con las diferentes preparaciones se determinó mediante ELISA. Todos los grupos mostraron aumento de la DO con respecto al grupo CONTROL a partir de los 15 días DPI para los distintos tipos de anticuerpos (IgG1 – IgG2a – IgG2b – IgG3) (figura 31). Las respuestas humorales obtenidas con las diferentes formulaciones fueron similares en el tiempo no encontrándose significancia estadística entre los grupos tratados para los anticuerpos IgG1 (4.7-A), IgG2a (4.7-B) e IgG3 (4.7-D) ( $p > 0,05$ ) pero si entre todas las formulaciones respecto del grupo control ( $p < 0,05$ ). Cabe aclarar que se observó que la formulación ISPA YOLK DERIVATIZADO disminuye su desempeño para IgG2b respecto de las formulaciones ISPA ORIGINAL DERIVATIZADO e ISPA YOLK (4.7-C) ( $p < 0,05$ ), sin embargo esa disminución no resulta significativa probablemente debido a que ISPA original presentó mucha desviación de dichos anticuerpos específicos entre los distintos ratones del grupo.



**Figura 31:** Respuesta humoral de ISPA original, ISPA YOLK, ISPA ORIGINAL FUNCIONALIZADO E ISPA YOLK FUNCIONALIZADO. A) Respuesta de IgG1, B) Respuesta de IgG2a, C) Respuesta de IgG2b y D) Respuesta de IgG3. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante los estadísticos Kruskal-Wallis y la prueba U de Mann Whitney. No se observó significancia estadística entre los grupos tratados con las distintas formulaciones adyuvantes con o sin el proceso de derivatización química (con  $p > 0,05$ ). Todos los grupos mostraron significancia estadística respecto del grupo control tratado con PBS, la relación a-b indica una diferencia estadística con  $p < 0,05$ .



**Tabla 25:** Estadística de las áreas bajo la curva (AUC) para IgG1.  
Se determinaron las AUC para la cinética de IgG1 obtenidos para cada adyuvante.

<i>AUC para IGg1</i>	<b>ISPA ORIGINAL</b>	<b>ISPA YOLK</b>	<b>ISPA ORIGINAL FUNCIONALIZADO</b>	<b>ISPA YOLK FUNCIONALIZADO</b>	<b>CONTROL</b>
<i>Área Total</i>	4,975	5,132	4,912	4,878	0,3065
<i>Error Estándar</i>	0,07838	0,07906	0,1172	0,05566	0,06656
<i>Intervalo de confianza (95%)</i>	4,821 to 5,129	4,977 a 5,287	4,682 a 5,142	4,769 a 4,987	0,1761 a 0,4370

**Tabla 26:** Estadística de las áreas bajo la curva (AUC) para IgG2a.  
Se determinaron las AUC para la cinética de IgG2a obtenidos para cada adyuvante.

<i>AUC para IGg2a</i>	<b>ISPA ORIGINAL</b>	<b>ISPA YOLK</b>	<b>ISPA ORIGINAL FUNCIONALIZADO</b>	<b>ISPA YOLK FUNCIONALIZADO</b>	<b>CONTROL</b>
<i>Área Total</i>	1,753	1,600	1,462	1,266	0,2354
<i>Error Estándar</i>	0,09504	0,04868	0,09057	0,1973	0,03466
<i>Intervalo de confianza (95%)</i>	1,566 a 1,939	1,505 a 1,695	1,285 a 1,640	0,8792 a 1,653	0,1675 a 0,3033

**Tabla 27:** Estadística de las áreas bajo la curva (AUC) para IgG2b.  
Se determinaron las AUC para la cinética de IgG2b obtenidos para cada adyuvante.

<i>AUC para IGg1</i>	<b>ISPA ORIGINAL</b>	<b>ISPA YOLK</b>	<b>ISPA ORIGINAL FUNCIONALIZADO</b>	<b>ISPA YOLK FUNCIONALIZADO</b>	<b>CONTROL</b>
<i>Área Total</i>	2,521	4,600	2,614	1,485	0,2383
<i>Error Estándar</i>	0,4521	0,1196	0,1178	0,08167	0,04252
<i>Intervalo de confianza (95%)</i>	1,634 a 3,407	4,365 a 4,834	2,383 a 2,845	1,325 a 1,645	0,1549 a 0,3216

**Tabla 28:** Estadística de las áreas bajo la curva (AUC) para IgG3.  
Se determinaron las AUC para la cinética de IgG3 obtenidos para cada adyuvante.

<i>AUC para IGg2a</i>	<b>ISPA ORIGINAL</b>	<b>ISPA YOLK</b>	<b>ISPA ORIGINAL FUNCIONALIZADO</b>	<b>ISPA YOLK FUNCIONALIZADO</b>	<b>CONTROL</b>
<i>Área Total</i>	1,302	1,121	0,8095	0,8309	0,2299
<i>Error Estándar</i>	0,3636	0,1574	0,1846	0,1909	0,06429
<i>Intervalo de confianza (95%)</i>	0,5894 a 2,015	0,8126 a 1,429	0,4476 a 1,171	0,4568 a 1,205	0,1039 a 0,3559



## 5.5. DISCUSIÓN

A lo largo de los últimos años, en el laboratorio de Tecnología Inmunológica de la FBCB-UNL, se ha colaborado con distintos grupos haciendo uso del adyuvante ISPA original con diferentes modelos de inmunización. El mismo ha sido ensayado con resultados muy favorables en vacunas que afectan al ganado bovino y ovino (tesis en curso, resultados no publicados) (Bidart et al., 2020, 2021; Moran et al., 2022) como así también en vacunas dirigidas contra *Trypanosoma cruzi*, ensayadas en modelos murinos (Bertona et al., 2017; Gamba et al., 2021; Pacini et al., 2022; Prochetto et al., 2017). A pesar de su notable desempeño, se presentan casos en los que la respuesta inmune a la vacuna podría requerir ser complementada. Esto es el caso por ejemplo, en poblaciones con un sistema inmunológico debilitado o incapaz de responder de una manera adecuada, tales como ser adultos mayores, niños, enfermos crónicos o pacientes inmunocomprometidos (Coffman et al., 2010).

En el marco de la suplementación con componentes que pudieran potenciar la capacidad adyuvante de la formulación ISPA original, se evaluaron diferentes estrategias. Un primera opción fue usar en forma conjunta componentes que presenten distintos modos de acción. Dicha estrategia ya ha sido utilizada por la farmacéutica GSK que ha desarrollado una línea de adyuvantes que han llamado sistemas adyuvantes (AS1, AS02, AS03 y AS04) que se basa en mezclas de componentes (dichos compuestos son diferentes a los ensayados en esta tesis). Como criterio para seleccionar compuestos que complementen la acción de ISPA, seleccionamos tres candidatos que han sido descriptos por su importante capacidad para aumentar la respuesta inmune como rapamicina, c-di-AMPC y antagonista de CCR4. Las distintas moléculas fueron combinadas con el adyuvante ISPA en forma de mezcla simple en la formulación utilizada para la inmunización. Se evaluaron para esto 4 fórmulas alternativas: i) ISPA con rapamicina en dosis baja ii) ISPA con rapamicina en dosis alta iii) ISPA con c-di-AMPC e iiiii) ISPA con antagonista de CCR4.

La propuesta de incorporar rapamicina se basó en resultados previos que indican su utilidad para fortalecer la respuesta inmune y generar memoria (Gammon et al., 2017). El receptor mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero) es una serina treonina quinasa conservada evolutivamente que está presente en al menos dos complejos de proteínas: mTOR Complejo 1 y mTOR Complejo2. En los últimos años, se ha vuelto cada vez más claro que estos complejos son parte de una red de moléculas que censa e integra a la vez la disponibilidad de nutrientes a nivel intra y extracelular junto con el estímulo de factores de crecimiento y también con las señales producidas por los receptores de reconocimientos de patrones (PRR) (Sukhbaatar et al., 2016). Interesantemente, se ha encontrado que el bloqueo de mTOR/mTORC1 conduce a una mayor expresión de IL12 y CCR7 en células dendríticas (Sordi

et al., 2006), lo que puede facilitar la migración a los tejidos linfáticos para proporcionar estimulación antigénica a las células T. Por lo tanto, el bloqueo de mTOR podría potencialmente conferir, al menos en algunos contextos, una protección mejorada contra infecciones virales y de otro tipo. Esto es contrario al hecho de que la inhibición de mTOR generalmente se considera inmunosupresora porque disminuye el metabolismo celular. Sin embargo, a dosis bajas administradas durante un corto plazo (6 semanas) se ha reportado que una combinación de los inhibidores de mTOR redujo la infección y mejoró las respuestas de vacunación antiviral en personas sanas de edad avanzada (Mannick et al., 2018). Además, varios estudios demuestran que la administración regular y sistémica de rapamicina aumenta el periodo de tiempo de la expansión de células T específicas del antígeno (Araki et al., 2009). En particular, las células T de memoria central poseen una capacidad altamente proliferativa necesaria para generar rápidamente grandes cantidades de células específicas T efectoras luego de una infección que se produce en un tiempo alejado de la inmunización. En conjunto, estos hechos indican la administración de rapamicina en bajas dosis podría proporcionar poblaciones de células T específicas de memoria activadas al momento de enfrentar una infección o un estímulo inmunológico (Gammon et al., 2017). Confirmando esta hipótesis, se ha demostrado que cuando se administra rapamicina a dosis bajas, en forma conjunta con el péptido Trp2 (un antígeno común asociado al melanoma humano) en una re-exposición al mismo antígeno, es capaz de promover una respuesta proliferativa mayor, lo que podría mejorar las respuestas de las células T durante la vacunación (Gammon et al., 2017). Aunque es necesario dilucidar mejor algunos mecanismos, estos hallazgos sugieren que la estrategia de un tratamiento con rapamicina puede mejorar el desarrollo de células efectoras y de memoria en respuesta a los protocolos de vacunación, ofreciendo un nuevo método para ajustar la respuesta inmunitaria deseada, así como la plasticidad, el fenotipo y la función celular (Moraschi et al., 2021).

En este trabajo, considerando uno de los antecedentes mencionados en los que se ha utilizado rapamicina en bajas dosis para potenciar la respuesta inmune (Gammon et al., 2017), hemos ensayado dos dosis de rapamicina. Se trabajó con dos dosis bajas, pero diferentes en un orden de magnitud, de modo de determinar qué concentración produce el mejor efecto en el contexto del modelo de ratón y el esquema de inmunización utilizado. En las respuestas humorales obtenidas con la dosis más baja de rapamicina, hubo una tendencia a una mejor respuesta a lo largo del esquema de inmunización al analizar la AUC, aunque dicha diferencia no es significativa teniendo en cuenta que los IC del 95% se superponen. Por otro lado, se determinó en ambos grupos una alta respuesta DTH que no disminuyó con el tiempo y que a los 45 días DPI fue mayor para ISPA-rapamicina 2 con respecto a ISPA original ( $p < 0,05$ ). Finalmente, a los 165 días DPI, luego de cultivar esplenocitos estimulados con OVA, se observó que los grupos inmunizados con OVA y complementados con los adyuvantes ISPA-rapamicina

1 e ISPA-rapamicina 2, presentaron una tendencia a aumentar el porcentaje de linfocitos T CD4+ CD44high. Los mismos resultados se reprodujeron cuando las poblaciones de CD4+CD44+ se evaluaron a los 75 días DPI. En conjunto, todos estos resultados sugieren, tal como reportaron otros autores, que la rapamicina podría potenciar la respuesta a las vacunas por lo que sería buen candidato para complementar el adyuvante ISPA utilizado en la dosis correcta. Sin embargo, cabe destacar que en el ensayo de respuesta celular realizado a los 165 días DPI se observó un comportamiento semejante en el grupo de control para las poblaciones de CD4+CD44+, por lo que el estudio de respuesta celular a los 165 dpi debería repetirse para confirmar el resultado. Por otra parte, dado que solo se ensayaron dos dosis y que el mejor resultado se obtuvo con la dosis alta para la respuesta celular, pero en dosis bajas para la respuesta humoral, en futuros trabajos podrían ensayarse nuevas concentraciones de rapamicina para determinar la dosis óptima a utilizar. Además, creemos que es importante confirmar la memoria inmunológica celular mediante nuevos ensayos teniendo en cuenta que tanto la DTH como los anticuerpos obtenidos con esa formulación indican la persistencia de la memoria inmunológica en ese tiempo.

Por otra parte, determinamos que el grupo ISPA-c-di-AMPc presentó una tendencia de una mayor respuesta de anticuerpos en el segundo experimento cuando se analizó el AUC a lo largo de estudio (aunque dicha deferencia no llega a ser significativa). Además en ese ensayo, para IgG2a, se observó un aumento muy significativo de la formulación suplementada c-di-AMP respecto a ISPA (  $p= 0,007$ ) a los 45 DPI. Previamente se ha descrito que el c-di-AMPc activa la vía del “estimulador de genes de interferón ” (STING), desencadenando la liberación de interferones de tipo I (IFN-s) y otras citocinas pro inflamatorias (Dubensky et al., 2013). En general, los dinucleótidos cíclicos pueden actuar como PAMPs que funcionan como potenciadores inmunes en el contexto de infecciones. Los dinucleótidos cíclicos como c-di-AMPc y cGAMP mejoran las respuestas humorales específicas de antígeno, inducen respuestas equilibradas de células T del tipo Th1/Th2/Th17, y promueven la activación de linfocitos T citotóxicos cuando se formulan con un antígeno y se administran mediante rutas sistémicas o mucosas. Tales respuestas Th y LTc son críticas para controlar los patógenos que no pueden ser neutralizados por anticuerpos. Sin embargo, el desarrollo de dinucleótidos cíclicos como componentes de vacunas o terapias requiere aún de una evaluación cuidadosa de su perfil de seguridad y su capacidad para promover posibles efectos adversos. Esto es así ya que la inducción de inflamación es necesaria para los efectos inmunomoduladores de los mismos, pero este estímulo proinflamatorio debe ser autolimitado y de una entidad discreta para evitar condiciones inmunopatológicas (Rueckert et al., 2017). La capacidad de un adyuvante para proporcionar un estímulo proinflamatorio autolimitado y restringido localmente en el sitio inductivo representa un claro objetivo en términos de seguridad de la vacuna (Rueckert et al.,

2017). En ese sentido, estudios de imágenes in vivo han demostrado que, en contraste con otros estimuladores inmunes, la activación de IFN tipo I después de la administración de dinucleótidos cíclicos está restringida localmente en lugar de ser sistémica (Škrnjug et al., 2014). Esta característica indica un alto potencial de estas moléculas como adyuvantes candidatos. En particular, c-di-AMPc se usó con éxito en los últimos años como adyuvante para promover una respuesta inmune al virus de la influenza, virus de la hepatitis C y el virus de la inmunodeficiencia simia. También se ha utilizado para desarrollar las vacunas contra la tuberculosis (Yin et al., 2020) y el protozoario *Trypanosoma cruzi* (Bivona et al., 2020; Matos et al., 2017). En particular, en el laboratorio de Tecnología Inmunológica de la FBCB-UNL, en colaboración con los grupos de la Dra. Ana Rosa Pérez y Christian Magni del CONICET de Rosario, se ha ensayado su utilidad para una vacuna basada en la expresión conjunta de c-di-AMPc y el antígeno Transilidasa en *Lactococcus lactis* para proteger contra *Trypanosoma cruzi* (Quintana et al., 2018). Más recientemente dichos grupos han evaluado el uso de c-di-AMPc en una formulación nasal de Transialidasa recombinante, logrando una importante protección frente a infecciones orales por el parásito (Pacini et al., 2022). El c-di-AMPc ha sido particularmente evaluado como inmunopotenciador a nivel de las mucosas (Bivona et al., 2020; Matos et al., 2017; Quintana et al., 2018). Incluso a nivel de mucosas c-di-AMPc ha mostrado promover mayores respuestas inmunes humorales y celulares que ISPA (Pacini et al., 2022). En esta tesis la vía de inmunización utilizada fue la subcutánea que ha sido poco explorada para c-di-AMPc. Si bien no se compararon por separado el efecto del uso de c-di-AMPc vs ISPA si se analizó el efecto de adicionar c-di-AMPc a ISPA. Los estudios que hemos desarrollado con este adyuvante en forma de suplemento de ISPA han sido preliminares y no hemos podido dar continuidad a nuevos ensayos por la falta de suministro de la molécula. Sería interesante repetir estos ensayos, así como también usar distintas vías de administración, tanto de los dos adyuvantes de forma individual como así también de forma conjunta para poder indagar mejor sobre su rol inmunopotenciador.

En relación al uso de CCR4, cabe mencionar que los receptores de quimiocinas son dianas viables para el descubrimiento de adyuvantes. En este contexto, CCR4 es de particular interés porque es expresado por células T reguladoras (Tregs), un subconjunto de células T que normalmente funciona suprimiendo las respuestas inmunitarias. De esta forma, un antagonista de CCR4 podría mejorar las respuestas inmunitarias al interferir con la función inhibidora de las Tregs. Además, los antagonistas de CCR4 pueden poseer la capacidad de alterar el tipo de respuesta inmunitaria generada teniendo en cuenta que la expresión de CCR4 es diferente en los subconjuntos de células T efectoras. En particular, CCR4 se expresa en células CD4+ de tipo Th2 siendo estas las células T que se han relacionado con enfermedades inflamatorias alérgicas como el asma, la dermatitis atópica y la rinitis alérgica. Por el contrario no se expresan en las

células T Th1 que normalmente están involucradas en la protección contra patógenos intracelulares. De acuerdo con el papel de CCR4 en las células Th2, se ha observado que el tratamiento con los anticuerpos anti-CCL17 y anti-CCL22 (las chemoquinas ligando de CCR4), tienen eficacia en modelos murinos de asma. Dado que las respuestas Th1 y Th2 son antagónicas entre sí, los antagonistas de CCR4 pueden actuar como adyuvantes que dirigen la respuesta inmunitaria hacia una respuesta de tipo Th1 (Davies et al., 2009). Por tanto, como las células T vírgenes y los subconjuntos Th1 carecen de CCR4, los antagonistas para CCR4 podrían usarse para mejorar las respuestas inmunes celulares, que son cruciales en enfermedades virales y en cánceres (Bayry, 2014b). Sin embargo, en las condiciones evaluadas en este trabajo, no se obtuvieron resultados que muestren una mejora significativa cuando la formulación ISPA original fue suplementada con la molécula antagonista de CCR4. Se ha sugerido que es necesario seguir trabajando en la farmacocinética de los antagonistas de CCR4, el estudio de búsqueda de dosis óptima y los experimentos en primates no humanos antes de llevar los antagonistas de CCR4 a las clínicas y su uso como adyuvante de las vacunas (Bayry, 2014a). Una consideración que se debe hacer con respecto a esta estrategia es que, aunque los modelos experimentales proporcionaron evidencia de que inhibir a las células Treg mejoraría la magnitud y la duración de la inmunidad protectora proporcionada por las vacunas, la traducción de estos resultados a la clínica se ve obstaculizada debido a que inclinar el equilibrio de Treg podría ser perjudicial. Además, el CCR4 también es expresado por células Th17. Por lo tanto, los antagonistas de CCR4 podrían inhibir las respuestas de tipo Th17. A su vez los antagonistas de CCR4 podrían también inhibir la formación de algunas subclases de anticuerpos que dependen de la activación de las células Th2.

La segunda estrategia para potenciar el efecto del adyuvante fue la de conjugar los antígenos a las partículas con el objetivo de lograr una entrega del antígeno con el inmestimulador en un mismo tiempo y espacio. Como se describe con anterioridad, las nanopartículas tipo ISCOM fueron desarrolladas originalmente como portadores en los sistemas de inmunización (Chanlun et al., 2006). De esta forma, constituyen nanosistemas de presentación antigénica en los que las proteínas de los antígenos se unen a las nanocápsulas a través de los dominios hidrofóbicos de sus secuencias. Sin embargo, este aspecto de su actividad presenta una seria desventaja para las proteínas o péptidos hidrofílicos (Cruz-Bustos et al., 2012). Se han reportado estudios con la finalidad de solucionar este inconveniente diseñando un sistema capaz de unir las proteínas a los ISCOM a través de sus grupos amino o tiol utilizando compuestos novedosos formados por una cadena lipídica unida a un grupo vinilsulfona sintetizados específicamente para este propósito (Cruz-Bustos et al., 2012). En este trabajo, se utilizó la técnica optimizada por Cruz-Bustos et al., 2012 y empleada más tarde por Rodríguez-Serrano et al., 2016 (Cruz-Bustos et al., 2012; Rodríguez-Serrano et al., 2016). Los

resultados obtenidos fueron comparables con los de estos autores. Las nanopartículas ISPA original e ISPA YOLK, tanto en sus composiciones originales como posteriormente derivatizadas, mostraron características similares. Sin embargo, los tamaños obtenidos para las nanopartículas, estimados por la técnica DLS arrojaron valores muy variables como se muestra en la tabla 24. Hay que destacar que el tamaño de las partículas medido por DLS depende de las poblaciones de nanopartículas que se sometan a análisis. Es decir, cuando se produce la incidencia de la luz sobre la muestra, esta incide sobre las nanopartículas y luego se dispersa. Cuando la luz, impacta sobre una partícula de mayor tamaño, la dispersión es mayor, aunque partículas de este tipo sean muy minoritarias. Muchas veces, esto lleva a pensar que las nanopartículas son más grandes, sin embargo, esto puede deberse a la presencia de precipitados o aglomerados constituidos por restos de proteínas no ligadas o contaminantes. Esto sugiere, que la técnica DLS es una herramienta válida para ensayos preliminares de determinación de presencia o no de poblaciones de nanopartículas, pero no determina su forma y / o constitución (aunque estaría indicando la presencia de poblaciones no homogéneas de partículas). Para confirmar la obtención de partículas, se utilizó en este caso microscopía electrónica de transferencia. Se observó mediante la técnica de microscopía electrónica que las nanopartículas conservaron la forma de matrices en forma de jaula y tamaños homogéneos en todas las muestras. En el caso de las nanopartículas formuladas con lípidos de huevo, las mismas presentaron carga de mayor negatividad cuando se determinó su potencial Z, aunque esto no influyó en los resultados de funcionalidad. A pesar del haber obtenidas partículas derivatizadas del tamaño correcto, no se encontró que las mismas presenten una mejora en el desempeño inmunológico en relación a las no derivatizadas y en el caso de la formulación de ISPA YOLK DERIVATIZADO los resultados desmejoraron. Cabe destacar que existen dificultades técnicas que pueden haber influido en el resultado del ensayo inmunológico y que deberían considerarse. Como hemos visto en el capítulo 2, las nanopartículas como ISPA pueden formularse mediante distintas técnicas. Aquí, se adaptó la técnica del precursor liposomal para la síntesis de las mismas (Bertona et al., 2017) y luego se ligó OVA a las nanopartículas neo formuladas mediante la técnica descrita por Cruz-Bustos et.al., 2012 (Cruz-Bustos et al., 2012). Cruz-Bustos y colaboradores emplearon la técnica basada en detergentes y procesos de ultra centrifugación para la producción de partículas tipo ISCOM (Cruz-Bustos et al., 2012) y luego procedieron a la funcionalización de las mismas. Este tipo de técnicas, requiere la liofilización en su último paso debido a la baja concentración con la que se obtienen las partículas. Luego de re-suspender el liofilizado mediante la técnica de Cruz-Bustos, se obtiene una solución homogénea de partículas. En este trabajo se utilizó el método de obtención de partículas de Bertona y col. 2017 (Bertona et al., 2017) que pudo no haber sido óptimo para el proceso de liofilización y reconstitución ya que se observaron en muchos casos dificultades de re

suspensión de los componentes, e incluso precipitados, lo que podría explicar los tamaños observados en la técnica de DLS e inclusive en la microscopia. Por eso, si bien, los resultados obtenidos no arrojaron diferencias significativas a nivel inmunológico, deberían evaluarse otras alternativas de derivatización sin la necesidad de liofilizar las mismas, lo que podría permitir una mayor estabilidad o inclusive una mejor respuesta inmunológica.

## 5.6. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 3

- ❖ Cuando ISPA se suplementó con rapamicina o c-di-AMPc, los ratones inmunizados con dichas formulaciones presentaron una tendencia de una respuesta mayor en los niveles de anticuerpos, aunque el aumento no fue significativo (salvo para c-di-AMPc a los 45 DPI). Además, cuando ISPA se suplementó con rapamicina en su mayor concentración, los ratones inmunizados con dicha formulación presentaron una mayor respuesta DTH con respecto al grupo ISPA a los 45 DPI. Dicha respuesta sigue siendo mayor para este grupo en los días día 75 y 165 DPI, aunque no en forma significativa. Estos resultados sugieren que el agregado de rapamicina o c-di-AMPc, podrían potenciar al adyuvante ISPA.
- ❖ El análisis de activación de linfocitos T a los 75 y 165 DPI para determinar activación específica hacia el antígeno mostró un aumento (aunque no significativo) del porcentaje de linfocitos activados a largo plazo luego de la inmunización para los grupos vacunados con rapamicina respecto de los otros grupos. Sin embargo, dado que en el primer ensayo, el control no vacunado también presenta un aumento en relación a las otras condiciones, dicho estudio requiere ser repetido.
- ❖ Se observó que las nanopartículas ISPA en su versión original y YOLK se adaptan a procesos de derivatización química sin sufrir cambios en su estructura microscópica pero no mejoraron el desempeño inmunológico.



## 6. CONCLUSIONES

## 6.1. CONCLUSIONES

- ❖ Los extractos semirrefinados obtenidos a partir de saponinas Kerry® constituyen un insumo con un desempeño comparable al de las saponinas Quil-A® de tipo comercial.
- ❖ El uso de saponinas semirrefinadas de bajo costo en lugar de saponinas comerciales permitiría el desarrollo de vacunas veterinarias contra una amplia variedad de patógenos a un valor económico accesible.
- ❖ El fosfolípido de soja del tipo HSPC presenta dificultades técnicas para la adaptación a la técnica del precursor liposomal y consiguiente formulación de ISPA.
- ❖ Los fosfolípidos de soja derivados de residuos industriales permiten la formulación de partículas ISPA pero el uso adicional de componentes comerciales en la formulación disminuye el interés por dichas moléculas.
- ❖ Los extractos de lípidos derivados de yema de huevo generan una respuesta inmunológica similar a la de los componentes comerciales cuando el adyuvante desarrollado se preparó con saponina Kerry® mediante la técnica del precursor liposomal.
- ❖ Mediante el método del precursor liposomal se obtiene una mayor respuesta en ISPA original e ISPA YOLK, confirmando un mejor desempeño de las partículas con el uso de esta técnica.
- ❖ Mediante la obtención de ISPA YOLK se logró la producción de una formulación que cumple con los objetivos propuestos de obtener un adyuvante similar a ISCOMATRIX™ pero de bajo costo.
- ❖ La suplementación del adyuvante ISPA con sustancias como rapamicina y o c-di-AMPC induce resultados prometedores para mejorar la respuesta inmunológica y permiten programar nuevas evaluaciones para evaluar confirmar su desempeño.
- ❖ No han sido observadas diferencias significativas al menos en los parámetros aquí estudiados cuando el adyuvante ISPA fue suplementado con anti-CCR4.
- ❖ Las nanopartículas ISPA original e ISPA YOLK son capaces de adaptarse a procesos de funcionalización, liofilizado y reconstitución, sin embargo no se observó mejor desempeño de las mismas luego de estos procesos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, M. M., Damani, P., Perl, N. R., Won, A., Hong, F., Livingston, P. O., Ragupathi, G., & Gin, D. Y. (2010). Design and Synthesis of Potent *Quillaja* Saponin Vaccine Adjuvants. *Journal of the American Chemical Society*, *132*(6), 1939-1945. <https://doi.org/10.1021/ja9082842>
2. Ahmed, F. K., Clark, B. E., Burton, D. R., & Pantophlet, R. (2012). An engineered mutant of HIV-1 gp120 formulated with adjuvant Quil A promotes elicitation of antibody responses overlapping the CD4-binding site. *Vaccine*, *30*(5), 922-930. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.089>
3. Akkaya, B., Oya, Y., Akkaya, M., Souz, J. A., Holstein, A. H., Kamenyeva, O., Kabat, J., Matsumura, R., Dorward, D. W., Glass, D. D., & Shevach, E. M. (2019). T regulatory cells mediate specific suppression by depleting peptide-MHC class II from dendritic cells. *Nature immunology*, *20*(2), 218-231. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0280-2>
4. Allison, A. C., & Gregoriadis, G. (1974). Liposomes as immunological adjuvants. *Nature*, *252*(5480), Art. 5480. <https://doi.org/10.1038/252252a0>
5. Alving, C. R., Matyas, G. R., Torres, O., Jalah, R., & Beck, Z. (2014). Adjuvants for Vaccines to Drugs of Abuse and Addiction. *Vaccine*, *32*(42), 5382-5389. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.085>
6. Apostólico, J. de S., Lunardelli, V. A. S., Coirada, F. C., Boscardin, S. B., & Rosa, D. S. (2016, mayo 4). *Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing* [Review Article]. *Journal of Immunology Research*; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2016/1459394>
7. Araki, K., Turner, A. P., Shaffer, V. O., Gangappa, S., Keller, S. A., Bachmann, M. F., Larsen, C. P., & Ahmed, R. (2009). mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature*, *460*(7251), 108-112. <https://doi.org/10.1038/nature08155>
8. Arora, N., C Anbalagan, L., & Pannu, A. K. (2021). Towards Eradication of Malaria: Is the WHO's RTS,S/AS01 Vaccination Effective Enough? *Risk Management and Healthcare Policy*, *14*, 1033-1039. <https://doi.org/10.2147/RMHP.S219294>
9. Arriola Apelo, S. I., & Lamming, D. W. (2016). Rapamycin: An InhibiTOR of Aging Emerges From the Soil of Easter Island. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, *71*(7), 841-849. <https://doi.org/10.1093/gerona/glw090>
10. Balan, S., Saxena, M., & Bhardwaj, N. (2019). Chapter One—Dendritic cell subsets and locations. En C. Lhuillier & L. Galluzzi (Eds.), *International Review of Cell and*

- Molecular Biology* (Vol. 348, pp. 1-68). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.07.004>
11. Banchereau, J., Klechevsky, E., Schmitt, N., Morita, R., Palucka, K., & Ueno, H. (2009). Harnessing Human Dendritic Cell Subsets to Design Novel Vaccines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1174, 24-32. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04999.x>
  12. Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 238-277. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6)
  13. Bastola, R., Noh, G., Keum, T., Bashyal, S., Seo, J.-E., Choi, J., Oh, Y., Cho, Y., & Lee, S. (2017). Vaccine adjuvants: Smart components to boost the immune system. *Archives of Pharmacal Research*, 40(11), 1238-1248. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0969-z>
  14. Batista Duharte, A., González, M., Tamargo Santos, B., Bouzac, J., Sierra, G., & Pérez, O. (2016). *Avances en la comprensión de los mecanismos de acción/toxicidad de adyuvantes vacunales y estrategias de evaluación para vacunas más seguras en Cuba*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5022.2961>
  15. Batista-Duharte, A., Lastre, M., & Pérez, O. (2014). Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(2), 106-114. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.11.012>
  16. Batzri, S., & Korn, E. D. (1973). Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 298(4), 1015-1019. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(73\)90408-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90408-2)
  17. Bayry, J. (2014a). Regulatory T cells as adjuvant target for enhancing the viral disease vaccine efficacy. *VirusDisease*, 25(1), 18-25. <https://doi.org/10.1007/s13337-013-0187-3>
  18. Bayry, J. (2014b). Regulatory T cells as adjuvant target for enhancing the viral disease vaccine efficacy. *Virusdisease*, 25(1), 18-25. <https://doi.org/10.1007/s13337-013-0187-3>
  19. Bayry, J., Tchilian, E. Z., Davies, M. N., Forbes, E. K., Draper, S. J., Kaveri, S. V., Hill, A. V. S., Kazatchkine, M. D., Beverley, P. C. L., Flower, D. R., & Tough, D. F. (2008). In silico identified CCR4 antagonists target regulatory T cells and exert adjuvant activity in vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29), 10221-10226. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803453105>
  20. Becker, P. S. A., Suck, G., Nowakowska, P., Ullrich, E., Seifried, E., Bader, P., Tonn,

- T., & Seidl, C. (2016). Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 65, 477-484. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1792-y>
21. Bengtsson, K. L., Morein, B., & Osterhaus, A. D. (2011). ISCOM technology-based Matrix M<sup>TM</sup> adjuvant: Success in future vaccines relies on formulation. *Expert Review of Vaccines*, 10(4), 401-403. <https://doi.org/10.1586/erv.11.25>
  22. Bertona, D., Pujato, N., Bontempi, I., Gonzalez, V., Cabrera, G., Gugliotta, L., Hozbor, D., Nicastro, A., Calvino, L., & Marcipar, I. S. (2017). Development and assessment of a new cage-like particle adjuvant. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(10), 1293-1303. <https://doi.org/10.1111/jphp.12768>
  23. Bidart, J., Kornuta, C., Gammella, M., Gnazzo, V., Soria, I., Langellotti, C., Mongini, C., Galarza, R., Calvino, L., Lupi, G., Quattrocchi, V., Marcipar, I., & Zamorano, P. (2020). A New Cage-Like Particle Adjuvant Enhances Protection of Foot-and-Mouth Disease Vaccine. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00396>
  24. Bidart, J., Mignaquí, A., Kornuta, C., Lupi, G., Gammella, M., Soria, I., Galarza, R., Ferella, A., Cardillo, S., Langellotti, C., Quattrocchi, V., Durocher, Y., Wigdorovitz, A., Marcipar, I., & Zamorano, P. (2021). FMD empty capsids combined with the Immunostant Particle Adjuvant -ISPA or ISA206 induce protective immunity against foot and mouth disease virus. *Virus Research*, 198339. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198339>
  25. Bigaeva, E., Doorn, E. van, Liu, H., & Hak, E. (2016). Meta-Analysis on Randomized Controlled Trials of Vaccines with QS-21 or ISCOMATRIX Adjuvant: Safety and Tolerability. *PLOS ONE*, 11(5), e0154757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154757>
  26. Bivona, A. E., Alberti, A. S., Cerny, N., Trinitario, S. N., & Malchiodi, E. L. (2020). Chagas disease vaccine design: The search for an efficient Trypanosoma cruzi immune-mediated control. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(5), 165658. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165658>
  27. Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
  28. Bonam, S. R., Partidos, C. D., Halmuthur, S. K. M., & Muller, S. (2017). An Overview of Novel Adjuvants Designed for Improving Vaccine Efficacy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(9), 771-793. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.06.002>
  29. Bontempi, I. A., Vicco, M. H., Cabrera, G., Villar, S. R., González, F. B., Roggero, E.

- A., Ameloot, P., Callewaert, N., Pérez, A. R., & Marcipar, I. S. (2015). Efficacy of a trans-sialidase-ISCOMATRIX subunit vaccine candidate to protect against experimental Chagas disease. *Vaccine*, 33(10), 1274-1283. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.044>
30. Brito, L. A., Malyala, P., & O'Hagan, D. T. (2013). Vaccine adjuvant formulations: A pharmaceutical perspective. *Seminars in Immunology*, 25(2), 130-145. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.05.007>
31. Brun, A. (2016). Vaccines and Vaccination for Veterinary Viral Diseases: A General Overview. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1349, 1-24. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3008-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3008-1_1)
32. Brunner, L., Barnier-Quer, C., & Collin, N. (2017). QS-21 Adjuvant: Laboratory-Scale Purification Method and Formulation Into Liposomes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1494, 73-86. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6445-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6445-1_5)
33. Bryła, A., Juzwa, W., Weiss, M., & Lewandowicz, G. (2017). Lipid nanoparticles assessment by flow cytometry. *International Journal of Pharmaceutics*, 520(1), 149-157. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.047>
34. Bryła, A., Lewandowicz, G., & Juzwa, W. (2015). Encapsulation of elderberry extract into phospholipid nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 167, 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.025>
35. Burakova, Y., Madera, R., McVey, S., Schlup, J. R., & Shi, J. (2018). Adjuvants for Animal Vaccines. *Viral Immunology*, 31(1), 11-22. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0049>
36. Cancado, B., Aranda, C., Mallozi, M., Weckx, L., & Sole, D. (2019). Yellow fever vaccine and egg allergy. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(8), 812. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30355-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30355-X)
37. Canouï, E., & Launay, O. (2019). Histoire et principes de la vaccination. *Revue des Maladies Respiratoires*, 36(1), 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2018.02.015>
38. Carter, D., & Reed, S. G. (2010). Role of Adjuvants in Modeling the Immune Response. *Current opinion in HIV and AIDS*, 5(5), 409-413. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833d2cdb>
39. Castellino, F., Galli, G., Del Giudice, G., & Rappuoli, R. (2009). Generating memory with vaccination. *European Journal of Immunology*, 39(8), 2100-2105. <https://doi.org/10.1002/eji.200939550>
40. Celis-Giraldo, C. T., López-Abán, J., Muro, A., Patarroyo, M. A., & Manzano-Román, R. (2021). Nanovaccines against Animal Pathogens: The Latest Findings. *Vaccines*, 9(9), 988. <https://doi.org/10.3390/vaccines9090988>

41. Chanlun, A., Emanuelson, U., Aiumlamai, S., & Björkman, C. (2006). Variations of *Neospora caninum* antibody levels in milk during lactation in dairy cows. *Veterinary Parasitology*, *141*(3-4), 349-355. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.05.010>
42. Christensen, D. (2016). Vaccine adjuvants: Why and how. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *12*(10), 2709-2711. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1219003>
43. Christodoulides, M., Humbert, M. V., & Heckels, J. E. (2021). The potential utility of liposomes for *Neisseria* vaccines. *Expert Review of Vaccines*, *20*(10), 1235-1256. <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1981865>
44. Cibulski, S., Rivera, M., Suárez, N., Pérez Schirmer, V., Rossi, S., Yendo, A., de Costa, F., Gosmann, G., Fett-Neto, A., Roehe, P., & Silveira, F. S. (2017). Leaf saponins of *Quillaja brasiliensis* enhance long-term specific immune responses and promote dose-sparing effect in BVDV experimental vaccines. *Vaccine*, *36*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.030>
45. Cibulski, S., Rivera-Patron, M., Mourglia-Ettlin, G., Casaravilla, C., Yendo, A. C. A., Fett-Neto, A. G., Chabalgoity, J. A., Moreno, M., Roehe, P. M., & Silveira, F. (2018). *Quillaja brasiliensis* saponin-based nanoparticulate adjuvants are capable of triggering early immune responses. *Scientific Reports*, *8*(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31995-1>
46. Coffman, R. L., Sher, A., & Seder, R. A. (2010). Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity*, *33*(4), 492-503. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>
47. Çokçalışkan, C., Türkoğlu, T., Sareyyüpoğlu, B., Uzunlu, E., Babak, A., Özbilge, B. B., & Gülyaz, V. (2016). QS-21 enhances the early antibody response to oil adjuvant foot-and-mouth disease vaccine in cattle. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, *5*(2), 138-147. <https://doi.org/10.7774/cevr.2016.5.2.138>
48. Comité Asesor de Vacunas de la AEP. (2022, septiembre 6). *1. Generalidades de las vacunas* | Comité Asesor de Vacunas de la AEP. <https://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-1#3>
49. Copland, M. J., Rades, T., & Davies, N. M. (2000). Hydration of lipid films with an aqueous solution of Quil A: A simple method for the preparation of immune-stimulating complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, *196*(2), 135-139. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00407-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00407-X)
50. Coria, M. L. (2014). *Estudio de la capacidad adyuvante de la proteína Omp19 de Brucella spp. Sobre la respuesta inmune adaptativa* [Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales].

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n5460\\_Coria](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5460_Coria)

51. Cribbs, D. H., Ghochikyan, A., Vasilevko, V., Tran, M., Petrushina, I., Sadzikava, N., Babikyan, D., Kessler, P., Kieber-Emmons, T., Cotman, C. W., & Agadjanyan, M. G. (2003). Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. *International Immunology*, 15(4), 505-514. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxg049>
52. Cruz-Bustos, T., González-González, G., Morales-Sanfrutos, J., Megía-Fernández, A., Santoyo-González, F., & Osuna, A. (2012). Functionalization of immunostimulating complexes (ISCOMs) with lipid vinyl sulfones and their application in immunological techniques and therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5941-5956. <https://doi.org/10.2147/IJN.S35556>
53. Dalsgaard, K. (1974). Saponin adjuvants. 3. Isolation of a substance from Quillaja saponaria Molina with adjuvant activity in food-and-mouth disease vaccines. *Archiv Fur Die Gesamte Virusforschung*, 44(3), 243-254.
54. Dalsgaard, K. (1978). A study of the isolation and characterization of the saponin Quil A. Evaluation of its adjuvant activity, with a special reference to the application in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease. *Acta Veterinaria Scandinavica. Supplementum*, 69, 7-40.
55. Davies, M. N., Bayry, J., Tchilian, E. Z., Vani, J., Shaila, M. S., Forbes, E. K., Draper, S. J., Beverley, P. C. L., Tough, D. F., & Flower, D. R. (2009). Toward the discovery of vaccine adjuvants: Coupling in silico screening and in vitro analysis of antagonist binding to human and mouse CCR4 receptors. *PloS One*, 4(11), e8084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008084>
56. Demana, P. H., Davies, N. M., Berger, B., Vosgerau, U., & Rades, T. (2004). A comparison of pseudo-ternary diagrams of aqueous mixtures of Quil A, cholesterol and phospholipid prepared by lipid-film hydration and dialysis. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(5), 573-580. <https://doi.org/10.1211/0022357023259>
57. Demana, P. H., Davies, N. M., Hook, S., & Rades, T. (2005). Quil A-lipid powder formulations releasing ISCOMs and related colloidal structures upon hydration. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 103(1), 45-59. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.11.027>
58. Dempsey, P. W., Vaidya, S. A., & Cheng, G. (2003). The Art of War: Innate and adaptive immune responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(12), 2604-2621. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3180-y>
59. Djuricic, S., Jakobsen, J. C., Petersen, S. B., Kenfelt, M., Klingenberg, S. L., & Gluud, C. (2018). Aluminium adjuvants used in vaccines. *The Cochrane Database of*



- Systematic Reviews*, 2018(7), CD013086. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013086>
60. Dubensky, T. W., Kanne, D. B., & Leong, M. L. (2013). Rationale, progress and development of vaccines utilizing STING-activating cyclic dinucleotide adjuvants. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 1(4), 131-143. <https://doi.org/10.1177/2051013613501988>
  61. Fleck, J. D., Betti, A. H., da Silva, F. P., Troian, E. A., Olivaro, C., Ferreira, F., & Verza, S. G. (2019). Saponins from *Quillaja saponaria* and *Quillaja brasiliensis*: Particular Chemical Characteristics and Biological Activities. *Molecules*, 24(1). <https://doi.org/10.3390/molecules24010171>
  62. Fontana, D., Marsili, F., Etcheverrigaray, M., Kratje, R., & Prieto, C. (2020). Rabies VLPs adjuvanted with saponin-based liposomes induce enhanced immunogenicity mediated by neutralizing antibodies in cattle, dogs and cats. *Journal of Virological Methods*, 286, 113966. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113966>
  63. Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: A review. *The British Journal of Nutrition*, 88(6), 587-605. <https://doi.org/10.1079/BJN2002725>
  64. Friede, M., & Garçon, N. (2003). *Vaccine comprising an iscom consisting of sterol and saponin which is free of additional detergent* (United States Patent N.º US6506386B1). <https://patents.google.com/patent/US6506386B1/en>
  65. Furland, N. E., Maldonado, E. N., & Aveldaño, M. I. (2003). Very long chain PUFA in murine testicular triglycerides and cholesterol esters. *Lipids*, 38(1), 73-80. <https://doi.org/10.1007/s11745-003-1033-9>
  66. G. R. List, Northern Regional Research Center, Federal Research, Science and Education, & Administration, U.S. Department of Agriculture. (1977). *Factor for converting elemental phosphorus to acetone insolubles in crude soybean oil*. 2.
  67. Gamba, J. C., Roldán, C., Prochetto, E., Lupi, G., Bontempi, I., Poncini, C. V., Vermeulen, M., Pérez, A. R., Marcipar, I., & Cabrera, G. (2021). Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Enhance a Trans-Sialidase-Based Vaccine Against *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 671104. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.671104>
  68. Gammon, J. M., Gosselin, E. A., Tostanoski, L. H., Chiu, Y.-C., Zeng, X., Zeng, Q., & Jewell, C. M. (2017). Low-dose controlled release of mTOR inhibitors maintains T cell plasticity and promotes central memory T cells. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 263, 151-161. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.02.034>
  69. Garçon, N., Chomez, P., & Van Mechelen, M. (2007). GlaxoSmithKline Adjuvant

- Systems in vaccines: Concepts, achievements and perspectives. *Expert Review of Vaccines*, 6(5), 723-739. <https://doi.org/10.1586/14760584.6.5.723>
70. Garçon, Nathalie., Hem, Stanley., & Friede, Martin. (2013). 5—Evolution of adjuvants across the centuries. En S. A. Plotkin, W. A. Orenstein, & P. A. Offit (Eds.), *Vaccines (Sixth Edition)* (pp. 58-70). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0090-5.00020-3>
  71. Geall, A., & Settembre, E. (2018). *Composiciones de combinación inmunogénica y usos de las mismas* (Patent N.º ES2656050T3). <https://patents.google.com/patent/ES2656050T3/es>
  72. Gerhardt, C. M. B., Castro, A. P. B. M., Pastorino, A. C., Dorna, M. de B., Nunes-Santos, C. de J., Aquilante, B. P., Miyaji, K. T., & Lopes, M. H. (2020). Safety of yellow fever vaccine administration in confirmed egg-allergic patients. *Vaccine*, 38(42), 6539-6544. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.08.020>
  73. Ghaffarifar, F. (2018). Plasmid DNA vaccines: Where are we now? *Drugs of Today*, 54(5), 315. <https://doi.org/10.1358/dot.2018.54.5.2807864>
  74. Gil, P., & Barroeta, A. C. (2016). *EL HUEVO COMO ALIMENTO FUNCIONAL Y SUS COMPONENTES*. 6.
  75. Gin, D. Y., & Slovin, S. F. (2011). Enhancing Immunogenicity of Cancer Vaccines: QS-21 as an Immune Adjuvant. *Current Drug Therapy*, 6(3), 207-212. <https://doi.org/10.2174/157488511796391988>
  76. Glenny, A. T., Pope, C. G., Waddington, H., & Wallace, U. (1926). Immunological notes. XVII-XXIV. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29(1), 31-40. <https://doi.org/10.1002/path.1700290106>
  77. Gómez Samblás, M. M. G. (2017). *Inmunoprotección de un antígeno recombinante y del lipopéptido derivado del mismo frente a nematodos intestinales: Estudios de la inmunomodulación* [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidad de Granada]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=71143>
  78. Gómez-Morales, J., Verdugo-Escamilla, C., Fernández-Penas, R., Maria Parra-Milla, C., Drouet, C., Iafisco, M., Oltolina, F., Prat, M., & Fernández-Sánchez, J. F. (2019). Bioinspired crystallization, sensitized luminescence and cytocompatibility of citrate-functionalized Ca-substituted europium phosphate monohydrate nanophosphors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 538, 174-186. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.11.083>
  79. Groot, C., Müsken, M., Bleckmann, M., Ebensen, T., Guzman, C. A., & Müller-Goymann, C. (2019). Novel colloidal associations of soyasaponins and lipid components (DPPC, cholesterol) as potential adjuvants for vaccines. *Vaccine*, 37.

- <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.020>
80. Gros, M., & Amigorena, S. (2019). Regulation of Antigen Export to the Cytosol During Cross-Presentation. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00041>
81. Hill, A., Beitelshes, M., & Pfeifer, B. A. (2021). Vaccine Delivery and Immune Response Basics. En B. A. Pfeifer & A. Hill (Eds.), *Vaccine Delivery Technology: Methods and Protocols* (pp. 1-8). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0795-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0795-4_1)
82. Hoebe, K., Janssen, E., & Beutler, B. (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nature Immunology*, 5(10), Art. 10. <https://doi.org/10.1038/ni1004-971>
83. Höglund, S., Dalsgaard, K., Lövgren, K., Sundquist, B., Osterhaus, A., & Morein, B. (1989). ISCOMs and Immunostimulation with Viral Antigens. En J. R. Harris (Ed.), *Virally Infected Cells* (pp. 39-68). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1675-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1675-4_2)
84. Hope, M. J., Bally, M. B., Mayer, L. D., Janoff, A. S., & Cullis, P. R. (1986). Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 40(2), 89-107. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(86\)90065-4](https://doi.org/10.1016/0009-3084(86)90065-4)
85. Iglesias, L. P., & Michaud, A. V. (2017). *Método para la obtención de saponinas a partir de plantas* (World Intellectual Property Organization Patent N.º WO2017088080A1). <https://patents.google.com/patent/WO2017088080A1/es>
86. Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., & Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(8), Art. 8. <https://doi.org/10.1038/nri3254>
87. Kallerup, R., & Foged, C. (2015). *Advances in Delivery Science and Technology* (pp. 15-29). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1417-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1417-3_2)
88. Karch, C. P., & Burkhard, P. (2016). Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochemical Pharmacology*, 120, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.05.001>
89. Karlsson, I., Borggren, M., Nielsen, J., Christensen, D., Williams, J., & Fomsgaard, A. (2017). Increased humoral immunity by DNA vaccination using an  $\alpha$ -tocopherol-based adjuvant. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 13(8), 1823-1830. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1321183>
90. Kelso, J. M. (2014). Administering influenza vaccine to egg-allergic persons. *Expert Review of Vaccines*, 13(8), 1049-1057. <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.933079>
91. Kensil, C. A. (2001). *Saponin adjuvant compositions* (United States Patent N.º US6231859B1). <https://patents.google.com/patent/US6231859B1/en>

92. Kensil, C. A., & Marciani, D. J. (1991). *Saponin adjuvant* (United States Patent N.° US5057540A). <https://patents.google.com/patent/US5057540A/en>
93. Kensil, C. A., Patel, U., Lennick, M., & Marciani, D. (1991). Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from Quillaja saponaria Molina cortex. *The Journal of Immunology*, *146*(2), 431-437. <https://www.jimmunol.org/content/146/2/431>
94. Kensil, C. A., Soltysik, S., Wheeler, D. A., & Wu, J.-Y. (1996). Structure/Function Studies on QS-21, A Unique Immunological Adjuvant from Quillaja saponaria. En G. R. Waller & K. Yamasaki (Eds.), *Saponins Used in Traditional and Modern Medicine* (pp. 165-172). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1367-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1367-8_15)
95. Kersten, G. F. A., Spiekstra, A., Coen Beuvery, E., & Crommelin, D. J. A. (1991). On the structure of immune-stimulating saponin-lipid complexes (iscoms). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1062*(2), 165-171. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(91\)90388-O](https://doi.org/10.1016/0005-2736(91)90388-O)
96. Kersten, G. F., Teerlink, T., Derks, H. J., Verkleij, A. J., van Wezel, T. L., Crommelin, D. J., & Beuvery, E. C. (1988). Incorporation of the major outer membrane protein of Neisseria gonorrhoeae in saponin-lipid complexes (iscoms): Chemical analysis, some structural features, and comparison of their immunogenicity with three other antigen delivery systems. *Infection and Immunity*, *56*(2), 432-438. <https://doi.org/10.1128/iai.56.2.432-438.1988>
97. Kondratowicz, A., Dopierała, K., & Lewandowicz, G. (2019). Interfacial Behaviour of Egg Yolk Extracts. *Food Biophysics*, *14*(2), 205-213. <https://doi.org/10.1007/s11483-019-09572-4>
98. Kondratowicz, A., Neunert, G., Niezgodą, N., Bryś, J., Siger, A., Rudzińska, M., & Lewandowicz, G. (2018). Egg Yolk Extracts as Potential Liposomes Shell Material: Composition Compared with Vesicles Characteristics. *Journal of Food Science*, *83*(10), 2527-2535. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14341>
99. Kondratowicz, A., Weiss, M., Juzwa, W., Majchrzycki, Ł., & Lewandowicz, G. (2019). Characteristics of liposomes derived from egg yolk. *Open Chemistry*, *17*(1), 763-778. <https://doi.org/10.1515/chem-2019-0070>
100. Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina. (2020). *Wiener lab*. <https://www.wienerlab.com.ar/EN/SitePages/Vademecum.aspx?categoria=0000100001&pais=Corporate#Categoria>
101. Landry, N., Ward, B. J., Trépanier, S., Montomoli, E., Dargis, M., Lapini, G., & Vézina, L.-P. (2010). Preclinical and Clinical Development of Plant-Made Virus-Like

- Particle Vaccine against Avian H5N1 Influenza. *PLOS ONE*, 5(12), e15559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015559>
102. Lazarevic, V., & Glimcher, L. H. (2011). T-bet in disease. *Nature immunology*, 12(7), 597-606. <https://doi.org/10.1038/ni.2059>
  103. Lendemans, D. G., Egert, A. M., Hook, S., & Rades, T. (2007). Cage-like complexes formed by DOTAP, Quil-A and cholesterol. *International Journal of Pharmaceutics*, 332(1-2), 192-195. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.09.029>
  104. Lendemans, D. G., Myschik, J., Hook, S., & Rades, T. (2005a). Cationic cage-like complexes formed by DC-cholesterol, Quil-A, and phospholipid. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(8), 1794-1807. <https://doi.org/10.1002/jps.20394>
  105. Lendemans, D. G., Myschik, J., Hook, S., & Rades, T. (2005b). Immunostimulating complexes prepared by ethanol injection. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(6), 729-733. <https://doi.org/10.1211/0022357056280>
  106. Libanova, R., Becker, P. D., & Guzmán, C. A. (2012). Cyclic di-nucleotides: New era for small molecules as adjuvants. *Microbial Biotechnology*, 5(2), 168-176. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00306.x>
  107. Lindenbergh, M. F. S., & Stoorvogel, W. (2018). Antigen Presentation by Extracellular Vesicles from Professional Antigen-Presenting Cells. *Annual Review of Immunology*, 36(1), 435-459. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055700>
  108. Lirussi, D., Ebensen, T., Schulze, K., Trittel, S., Duran, V., Liebich, I., Kalinke, U., & Guzmán, C. A. (2017). Type I IFN and not TNF, is Essential for Cyclic Dinucleotide-elicited CTL by a Cytosolic Cross-presentation Pathway. *EBioMedicine*, 22, 100-111. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.07.016>
  109. Liu, J., Zheng, A., Peng, B., Xu, Y., & Zhang, N. (2021). Size-Dependent Absorption through Stratum Corneum by Drug-Loaded Liposomes. *Pharmaceutical Research*, 38(8), 1429-1437. <https://doi.org/10.1007/s11095-021-03079-9>
  110. Mac Donald, D., Valencia, E. F., Cuyos, M., & Dueñas, R. (2017). Extracción, identificación y evaluación de saponinas en *Agaricus Bisporus*. *Biotempo*, 5, 3-36. <https://doi.org/10.31381/biotempo.v5i0.889>
  111. Magedans, Y. V., Yendo, A. C., Costa, F. de, Gosmann, G., & Fett-Neto, A. G. (2019). Foamy matters: An update on Quillaja saponins and their use as immunoadjuvants. *Future Medicinal Chemistry*, 11(12), 1485-1499. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0438>
  112. Mannick, joan b, Morris, M., Hockey, H.-U. P., Roma, G., Beibel, M., Kulmatycki, K., Watkins, M., Shavlakadze, T., Zhou, W., Quinn, D., Glass, D. J., & Klickstein, L. B. (2018). TORC1 inhibition enhances immune function and reduces

- infections in the elderly. *Science Translational Medicine*, 10(449), eaaq1564. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaq1564>
113. Maraskovsky, E., Schnurr, M., Wilson, N. S., Robson, N. C., Boyle, J., & Drane, D. (2009). Development of prophylactic and therapeutic vaccines using the ISCOMATRIX adjuvant. *Immunology and Cell Biology*, 87(5), 371-376. <https://doi.org/10.1038/icb.2009.21>
114. Matos, M. N., Cazorla, S. I., Schulze, K., Ebensen, T., Guzmán, C. A., & Malchiodi, E. L. (2017). Immunization with Tc52 or its amino terminal domain adjuvanted with c-di-AMP induces Th17+Th1 specific immune responses and confers protection against *Trypanosoma cruzi*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(2), e0005300. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005300>
115. McBurney, W. T., Lendemans, D. G., Myschik, J., Hennessy, T., Rades, T., & Hook, S. (2008). In vivo activity of cationic immune stimulating complexes (PLUSCOMs). *Vaccine*, 26(35), 4549-4556. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.06.024>
116. McClements, D. J. (2015). Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 219, 27-53. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.02.002>
117. McVey, S., & Shi, J. (2010). Vaccines in Veterinary Medicine: A Brief Review of History and Technology. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 40(3), 381-392. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.02.001>
118. Morales-Sanfrutos, J., Lopez-Jaramillo, J., Ortega-Muñoz, M., Megia-Fernandez, A., Perez-Balderas, F., Hernandez-Mateo, F., & Santoyo-Gonzalez, F. (2010). Vinyl sulfone: A versatile function for simple bioconjugation and immobilization. *Org. Biomol. Chem.*, 8(3), 667-675. <https://doi.org/10.1039/B920576D>
119. Moran, M. C., Dominguez, M. P., Bence, A. R., Rodriguez, M. G., Goldbaum, F. A., Zylberman, V., Paola, P. R., Lupi, G., Marcipar, I. S., Lützelshwab, C. M., & Estein, S. M. (2022). Evaluation of the efficacy of polymeric antigen BLSOmp31 formulated in a new cage-like particle adjuvant (ISPA) administered by parenteral or mucosal routes against *Brucella ovis* in BALB/c mice. *Research in Veterinary Science*, 145, 29-39. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.02.001>
120. Moraschi, B. F., Noronha, I. H., Ferreira, C. P., Cariste, L. M., Monteiro, C. B., Denapoli, P., Vrechi, T., Pereira, G. J. S., Gazzinelli, R. T., Lannes-Vieira, J., Rodrigues, M. M., Bortoluci, K. R., & Vasconcelos, J. R. C. (2021). Rapamycin Improves the Response of Effector and Memory CD8+ T Cells Induced by Immunization With ASP2 of *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Cellular and Infection*

- Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2021.676183>
121. Morein, B., Sundquist, B., Höglund, S., Dalsgaard, K., & Osterhaus, A. (1984). Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature*, 308(5958), Art. 5958. <https://doi.org/10.1038/308457a0>
  122. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., & Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 136(7), 2348-2357.
  123. Mufamadi, S., Pillay, V., Choonara, Y., du Toit, L., Modi, G., Naidoo, D., & Ndesendo, Ph. D., Valence. (2011). A Review on Composite Liposomal Technologies for Specialized Drug Delivery. *Journal of drug delivery*, 2011, 939851. <https://doi.org/10.1155/2011/939851>
  124. Myszchik, J., Lendemans, D. G., McBurney, W. T., Demana, P. H., Hook, S., & Rades, T. (2006). On the preparation, microscopic investigation and application of ISCOMs. *Micron*, 37(8), 724-734. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.03.016>
  125. Naziris, N., Pippa, N., Meristoudi, A., Pispas, S., & Demetzos, C. (2017). Design and development of pH-responsive HSPC:C12H25-PAA chimeric liposomes. *Journal of Liposome Research*, 27(2), 108-117. <https://doi.org/10.3109/08982104.2016.1166512>
  126. Organización Mundial de la Salud. (2022, julio 24). *Todo lo que se debe saber sobre la vacuna de Novavax contra la COVID-19* . <https://www.who.int/es/news-room/feature-stories/detail/the-novavax-vaccine-against-covid-19-what-you-need-to-know>
  127. Özel, M., Håglund, S., Gelderblom, H. R., & Morein, B. (1989). Quaternary structure of the immunostimulating complex (Iscom). *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research*, 102(3), 240-248. [https://doi.org/10.1016/0889-1605\(89\)90018-9](https://doi.org/10.1016/0889-1605(89)90018-9)
  128. Pacini, M. F., González, F. B., Dinatale, B., Bulfoni Balbi, C., Villar, S. R., Farré, C., Lupi, G., Espariz, M., Blancato, V. S., Magni, C., Marcipar, I., & Pérez, A. R. (2022). Nasal immunization with a *L. lactis*-derived trans-sialidase antigen plus c-di-AMP protects against acute oral *T. cruzi* infection. *Vaccine*, S0264-410X(22)00223-7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.02.071>
  129. Pashine, A., Valiante, N. M., & Ulmer, J. B. (2005). Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nature Medicine*, 11(4 Suppl), S63-68. <https://doi.org/10.1038/nm1210>
  130. Pedersen, J. S., Oliveira, C. L. P., Hübschmann, H. B., Arleth, L., Manniche, S.,

- Kirkby, N., & Nielsen, H. M. (2012). Structure of Immune Stimulating Complex Matrices and Immune Stimulating Complexes in Suspension Determined by Small-Angle X-Ray Scattering. *Biophysical Journal*, *102*(10), 2372-2380. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.03.071>
131. Pere, H., Montier, Y., Bayry, J., Quintin-Colonna, F., Merillon, N., Dransart, E., Badoual, C., Gey, A., Ravel, P., Marcheteau, E., Batteux, F., Sandoval, F., Adotevi, O., Chiu, C., Garcia, S., Tanchot, C., Lone, Y.-C., Ferreira, L. C., Nelson, B. H., ... Tartour, E. (2011). A CCR4 antagonist combined with vaccines induces antigen-specific CD8+ T cells and tumor immunity against self antigens. *Blood*, *118*(18), 4853-4862. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-329656>
132. Pérez Rubio, A., & Eiros, J. M. (2018). Cell culture-derived flu vaccine: Present and future. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *14*(8), 1874-1882. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1460297>
133. Pham, H. L., Ross, B. P., McGeary, R. P., Shaw, P. N., & Davies, N. M. (2009). Synthesis of cationic derivatives of Quil A and the preparation of cationic immune-stimulating complexes (ISCOMs). *International Journal of Pharmaceutics*, *376*(1-2), 123-133. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.011>
134. Pham, H. L., Shaw, P. N., & Davies, N. M. (2006). Preparation of immunostimulating complexes (ISCOMs) by ether injection. *International Journal of Pharmaceutics*, *310*(1-2), 196-202. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.11.011>
135. Plotkin, S. (2014). History of vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(34), 12283-12287. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400472111>
136. Plotkin, S. L., & Plotkin, S. A. (2013). 1—A short history of vaccination. En S. A. Plotkin, W. A. Orenstein, & P. A. Offit (Eds.), *Vaccines (Sixth Edition)* (pp. 1-13). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0090-5.00017-3>
137. Pons, M., Foradada, M., & Estelrich, J. (1993). Liposomes obtained by the ethanol injection method. *International Journal of Pharmaceutics*, *95*(1), 51-56. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90389-W](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90389-W)
138. Prochetto, E., Roldán, C., Bontempi, I. A., Bertona, D., Peverengo, L., Vicco, M. H., Rodeles, L. M., Pérez, A. R., Marcipar, I. S., & Cabrera, G. (2017). Transsialidase-based vaccine candidate protects against *Trypanosoma cruzi* infection, not only inducing an effector immune response but also affecting cells with regulatory/suppressor phenotype. *Oncotarget*, *8*(35), 58003-58020. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18217>
139. Pulendran, B., & Ahmed, R. (2011). Immunological mechanisms of



- vaccination. *Nature Immunology*, 12(6), 509-517.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3253344/>
140. Quintana, I., Espariz, M., Villar, S. R., González, F. B., Pacini, M. F., Cabrera, G., Bontempi, I., Prochetto, E., Stülke, J., Perez, A. R., Marcipar, I., Blancato, V., & Magni, C. (2018). Genetic Engineering of *Lactococcus lactis* Co-producing Antigen and the Mucosal Adjuvant 3' 5'- cyclic di Adenosine Monophosphate (c-di-AMP) as a Design Strategy to Develop a Mucosal Vaccine Prototype. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02100>
  141. Quitral, V., Donoso, M. L., & Acevedo, N. (2009). COMPARACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y SENSORIAL DE HUEVOS DE CAMPO, ORGÁNICOS Y COMERCIALES. *RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición*, 10(2), Art. 2. <http://respyn.uanl.mx/index.php/respyn/article/view/235>
  142. Rajaram, S., Wojcik, R., Moore, C., Ortiz de Lejarazu, R., de Lusignan, S., Montomoli, E., Rossi, A., Pérez-Rubio, A., Trilla, A., Baldo, V., Jandhyala, R., & Kassianos, G. (2020). The impact of candidate influenza virus and egg-based manufacture on vaccine effectiveness: Literature review and expert consensus. *Vaccine*, 38(38), 6047-6056. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.06.021>
  143. Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N., & Forsthuber, T. G. (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, 74(1), 5-17. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>
  144. Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N., & Friede, M. (2009). New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology*, 30(1), 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.09.006>
  145. Reichert, C. L., Salminen, H., & Weiss, J. (2019). Quillaja Saponin Characteristics and Functional Properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10(1), 43-73. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-122010>
  146. Reina, J. (2012). Las vacunas de la gripe basadas en las partículas virus-like obtenidas mediante sistemas de expresión génica en células de insectos. *Vacunas*, 13(2), 64-68. [https://doi.org/10.1016/S1576-9887\(12\)70039-0](https://doi.org/10.1016/S1576-9887(12)70039-0)
  147. Reyes, N. J., & Saban, D. R. (2014). T helper subsets in allergic eye disease. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 14(5), 477-484. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000088>
  148. Rodríguez-Serrano, F., Mut-Salud, N., Cruz-Bustos, T., Gomez-Samblas, M., Carrasco, E., Garrido, J. M., López-Jaramillo, F. J., Santoyo-Gonzalez, F., & Osuna, A. (2016). Functionalized immunostimulating complexes with protein A via lipid vinyl sulfones to deliver cancer drugs to trastuzumab-resistant HER2-overexpressing breast

- cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4777-4785. <https://doi.org/10.2147/IJN.S112560>
149. Rönnerberg, B., Fekadu, M., & Morein, B. (1995). Adjuvant activity of non-toxic Quillaja saponaria Molina components for use in ISCOM matrix. *Vaccine*, 13(14), 1375-1382. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(95\)00105-a](https://doi.org/10.1016/0264-410x(95)00105-a)
  150. Rouser, G., Fkeischer, S., & Yamamoto, A. (1970). Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*, 5(5), 494-496. <https://doi.org/10.1007/BF02531316>
  151. Rueckert, C., Rand, U., Roy, U., Kasmapour, B., Strowig, T., & Guzmán, C. A. (2017). Cyclic dinucleotides modulate induced type I IFN responses in innate immune cells by degradation of STING. *The FASEB Journal*, 31(7), 3107-3115. <https://doi.org/10.1096/fj.201601093R>
  152. San Martín, R., & Briones, R. (2000). Quality control of commercial quillaja (Quillaja saponaria Molina) extracts by reverse phase HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(14), 2063-2068. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200011\)80:14<2063::AID-JSFA750>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200011)80:14<2063::AID-JSFA750>3.0.CO;2-2)
  153. Sarkar, I., Garg, R., & van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2019). Selection of adjuvants for vaccines targeting specific pathogens. *Expert Review of Vaccines*, 18(5), 505-521. <https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1604231>
  154. Schijns, V. E. J. C. (2017). Chapter 1 - Vaccine Adjuvants' Mode of Action: Unraveling "the Immunologist's Dirty Little Secret". En V. E. J. C. Schijns & D. T. O'Hagan (Eds.), *Immunopotentiators in Modern Vaccines (Second Edition)* (pp. 1-22). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804019-5.00001-3>
  155. Schijns, V., Majhen, D., van der Ley, P., Thakur, A., Summerfield, A., Berisio, R., Nativi, C., Fernández-Tejada, A., Alvarez-Dominguez, C., Gizurarson, S., Zamyatina, A., Molinaro, A., Rosano, C., Jakopin, Ž., Gursel, I., & McClean, S. (2021). Rational Vaccine Design in Times of Emerging Diseases: The Critical Choices of Immunological Correlates of Protection, Vaccine Antigen and Immunomodulation. *Pharmaceutics*, 13(4), 501. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040501>
  156. Shao, Y., Nanayakkara, G., Cheng, J., Cueto, R., Yang, W. Y., Park, J.-Y., Wang, H., & Yang, X. (2017). Lysophospholipids and Their Receptors Serve as Conditional DAMPs and DAMP Receptors in Tissue Oxidative and Inflammatory Injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, 28(10), 973-986. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7069>
  157. Shevach, E. M. (2018). Foxp3+ T Regulatory Cells: Still Many Unanswered

- Questions—A Perspective After 20 Years of Study. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01048>
158. Shi, S., Zhu, H., Xia, X., Liang, Z., Ma, X., & Sun, B. (2019). Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine*, 37(24), 3167-3178. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.055>
  159. Silveira, F., Cibulski, S. P., Varela, A. P., Marqués, J. M., Chabalgoity, A., de Costa, F., Yendo, A. C. A., Gosmann, G., Roehle, P. M., Fernández, C., & Ferreira, F. (2011). Quillaja brasiliensis saponins are less toxic than Quil A and have similar properties when used as an adjuvant for a viral antigen preparation. *Vaccine*, 29(49), 9177-9182. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.137>
  160. Škrnjug, I., Rueckert, C., Libanova, R., Lienenklaus, S., Weiss, S., & Guzmán, C. A. (2014). The Mucosal Adjuvant Cyclic di-AMP Exerts Immune Stimulatory Effects on Dendritic Cells and Macrophages. *PLOS ONE*, 9(4), e95728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095728>
  161. Song, W., & Craft, J. (2019). T follicular helper cell heterogeneity: Time, space, and function. *Immunological reviews*, 288(1), 85-96. <https://doi.org/10.1111/imr.12740>
  162. Sordi, V., Bianchi, G., Buracchi, C., Mercalli, A., Marchesi, F., D'Amico, G., Yang, C.-H., Luini, W., Vecchi, A., Mantovani, A., Allavena, P., & Piemonti, L. (2006). Differential Effects of Immunosuppressive Drugs on Chemokine Receptor CCR7 in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells: Selective Upregulation by Rapamycin. *Transplantation*, 82(6), 826-834. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000235433.03554.4f>
  163. Stern, P. L. (2020). Key steps in vaccine development. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 125(1), 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2020.01.025>
  164. Stils, H. F., Jr. (2005). Adjuvants and Antibody Production: Dispelling the Myths Associated with Freund's Complete and Other Adjuvants. *ILAR Journal*, 46(3), 280-293. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.280>
  165. Su, Y., Tian, Y., Yan, R., Wang, C., Niu, F., & Yang, Y. (2015). Study on a novel process for the separation of phospholipids, triacylglycerol and cholesterol from egg yolk. *Journal of Food Science and Technology*, 52(7), 4586-4592. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1513-5>
  166. Sukhbaatar, N., Hengstschlager, M., & Weichhart, T. (2016). MTOR-Mediated Regulation of Dendritic Cell Differentiation and Function. *Trends in Immunology*, 37(11), 778-789. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.08.009>
  167. Sun, H.-X., Xie, Y., & Ye, Y.-P. (2009). ISCOMs and ISCOMATRIX™. *Vaccine*, 27(33), 4388-4401. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.05.032>

168. Tengerdy, R. P., & Lacetera, N. G. (1991). Vitamin E adjuvant formulations in mice. *Vaccine*, 9(3), 204-206. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(91\)90155-Y](https://doi.org/10.1016/0264-410X(91)90155-Y)
169. van Setten, D. C., van de Werken, G., Zomer, G., & Kersten, G. F. (1995). Glycosyl compositions and structural characteristics of the potential immuno-adjuvant active saponins in the Quillaja saponaria Molina extract quill A. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 9(8), 660-666. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290090808>
170. Vandepapelière, P., Horsmans, Y., Moris, P., Van Mechelen, M., Janssens, M., Koutsoukos, M., Van Belle, P., Clement, F., Hanon, E., Wettendorff, M., Garçon, N., & Leroux-Roels, G. (2008). Vaccine adjuvant systems containing monophosphoryl lipid A and QS21 induce strong and persistent humoral and T cell responses against hepatitis B surface antigen in healthy adult volunteers. *Vaccine*, 26(10), 1375-1386. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.12.038>
171. Walport, M. J. (2001). Complement. *New England Journal of Medicine*, 344(14), 1058-1066. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441406>
172. Wang, P., Zhang, Q., Tan, L., Xu, Y., Xie, X., & Zhao, Y. (2020). The Regulatory Effects of mTOR Complexes in the Differentiation and Function of CD4+ T Cell Subsets. *Journal of Immunology Research*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/3406032>
173. Ward, A. I., Lewis, M. D., Taylor, M. C., & Kelly, J. M. (2022). Incomplete Recruitment of Protective T Cells Is Associated with Trypanosoma cruzi Persistence in the Mouse Colon. *Infection and Immunity*, 90(2), e00382-21. <https://doi.org/10.1128/iai.00382-21>
174. Wilson, N. S., Duewell, P., Yang, B., Li, Y., Marsters, S., Koernig, S., Latz, E., Maraskovsky, E., Morelli, A. B., Schnurr, M., & Ashkenazi, A. (2014). Inflammasome-Dependent and -Independent IL-18 Production Mediates Immunity to the ISCOMATRIX Adjuvant. *The Journal of Immunology*, 192(7), 3259-3268. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302011>
175. Yin, W., Cai, X., Ma, H., Zhu, L., Zhang, Y., Chou, S.-H., Galperin, M. Y., & He, J. (2020). A decade of research on the second messenger c-di-AMP. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(6), 701-724. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa019>
176. Zepp, F. (2016). Principles of Vaccination. En S. Thomas (Ed.), *Vaccine Design: Methods and Protocols: Volume 1: Vaccines for Human Diseases* (pp. 57-84). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3387-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3387-7_3)
177. Zheng, Y., Naguib, Y. W., Dong, Y., Shi, Y., Bou, S., & Cui, Z. (2015). Applications of bacillus Calmette-Guerin and recombinant bacillus Calmette-Guerin in vaccine development and tumor immunotherapy. *Expert review of vaccines*, 14(9),

1255-1275. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4920355/>