



ANÁLISIS DE NUEVOS VEHÍCULOS Y ADYUVANTES PARA INMUNIZACIÓN CON ANTÍGENOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* UTILIZANDO DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTALES

Ivana Gabriela Reidel

Doctorado en Ciencias Biológicas

Directora: Dra. Carolina M. I. Veaute; co-Directora: Dra. Cecilia M. Camussone; director de co-tutela: Dr. Jean-François Jégou.

Lugar de realización: Laboratorio de Inmunología Experimental - FBCB – UNL, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela – INTA, Laboratoire Inflammation, Tissus Epithéliaux et Cytokines (LITEC) – UP

Fecha de la defensa: 1 de diciembre de 2020.

ireidel@fbc.unl.edu.ar

Resumen

Se estima que la bacteria *Staphylococcus aureus*, es la responsable del 20-25% de las infecciones intra-hospitalarias. Por otra parte, la mastitis bovina es un claro ejemplo de los efectos de este patógeno en el ámbito veterinario. *Staphylococcus aureus* fue incluido en la lista de “patógenos prioritarios” resistentes a antibióticos publicada por la OMS, convirtiendo al desarrollo de una vacuna contra esta bacteria en una prioridad mundial. La combinación apropiada de antígenos y adyuvantes resulta clave en la formulación de vacunas eficaces contra *S. aureus*. Entre los adyuvantes de nueva generación se encuentran los liposomas, vesículas fosfolipídicas capaces de transportar al antígeno junto con moléculas inmunostimulantes.

En la presente tesis se estudió la respuesta inmune generada en terneras, vaquillonas y vacas preñadas tras la inmunización con una vacuna a subunidades, con antígenos recombinantes de *S. aureus*, formulados con adyuvantes liposomales. Además, se generaron diversas formulaciones liposomales conteniendo distintos inmunostimulantes junto a un antígeno de *S. aureus* recombinante y se estudió su capacidad de inducir una respuesta inmune en un modelo murino.

En el primer capítulo se presentaron los resultados obtenidos en bovinos tras la inmunización con una vacuna a subunidades contra *S. aureus*. Primero, se inmunizaron terneras de 6-8 meses de edad con 3 dosis de los antígenos recombinantes de *S. aureus*, proteína de unión a fibronectina (rFnBPA) y rClfA, formulados alternativamente con liposomas (Lip), ODN-CpG, liposomas con ODN-CpG, o hidróxido de aluminio. Un año más tarde recibieron una cuarta dosis y 21 días previos al primer parto un refuerzo. Se evaluó la respuesta humoral inducida, en sangre y en leche. Los resultados permitieron concluir que

la inmunización con proteínas recombinantes formuladas con liposomas catiónicos y un ODN-CpG, indujo una fuerte respuesta inmune humoral, con producción de IgG2 específica y generación de respuesta inmune de memoria. Esto permitió seleccionar este adyuvante para continuar con su evaluación. En esta segunda instancia, se inmunizaron vaquillonas y vacas preñadas, en el último trimestre de gestación, las cuales fueron divididas al azar en dos grupos. El grupo tratado fue inmunizado con la formulación Lip+ODN-CpG+Rec, que contuvo los antígenos recombinantes de *S. aureus*, rFnBPA, rClfA, α -toxina y β -toxina, mientras que el grupo restante actuó como control sin inmunizar. El grupo tratado recibió 2 dosis previas al parto. Se evaluó la respuesta humoral inducida, en sangre durante todo el protocolo y en muestra de leche, hasta 1 mes post parto.

En conjunto, estos resultados permitieron concluir que es posible inducir una respuesta inmune humoral específica en bovinos con producción de anticuerpos neutralizantes, utilizando como adyuvante, liposomas catiónicos suplementados con ODN-CpG. Asimismo, sugerimos la implementación de planes de vacunación que comiencen a temprana edad.

En el segundo capítulo se obtuvieron una serie de formulaciones compuestas por liposomas cargados con distintos inmunoestimulantes; un ODN-CpG, un surfactante aminoacídico de tipo gemini (AG2-C16) y un oligosacárido hidrofobizado, O-palmitoilmanano (OPM), así como su combinación. Se estudió la capacidad adyuvante de las distintas formulaciones en dos modelos murinos, BALB/c y C57BL/6J. Se estudió la respuesta inducida al inmunizar el antígeno libre (rClfA), así como incorporado en 5 formulaciones liposomales; Lip+ODN-CpG+rClfA; Lip+AG2-C16+rClfA, Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA, Lip+OPM+rClfA y Lip+OPM+ODN-CpG+rClfA. Se estudió la cinética de la respuesta inmune humoral, en sangre y mucosa vaginal, a lo largo de un protocolo de 2 dosis distanciadas tres semanas y hasta pasadas 3 semanas de la última dosis y la respuesta celular inducida luego de aplicado un refuerzo pre-sacrificio 10 días post segunda dosis. Las células de los ganglios linfáticos, obtenidos al sacrificio, se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar la producción de IL-4, IL-17 e IFN- γ en los linfocitos T CD4+ y CD8+. Los 3 inmunoestimulantes probados, al ser formulados en liposomas fueron capaces de estimular una respuesta inmune humoral, en sangre, con altos títulos de IgG específicas y aumento de este isotipo en lavado vaginal. Respecto a la respuesta celular, la formulación Lip+AG2-C16+ODN-CpG+rClfA, fue capaz de inducir los tres perfiles celulares evaluados Th1, Th2 y Th17, y de linfocitos Tc IFN- γ ⁺. Considerando que esta respuesta coincide con el perfil deseado para el control de las infecciones causadas por *S. aureus*, los resultados permiten sugerir a este adyuvante como un potencial candidato para posteriores ensayos en bovinos. Asimismo, el incremento de los niveles de linfocitos T CD8+ productores de IFN- γ , permiten proponerlo como una alternativa en el diseño de vacunas para la prevención de infecciones virales o cáncer.

Los resultados presentados en esta tesis muestran que los liposomas catiónicos constituyen un sistema adyuvante de gran versatilidad, que permiten la selección de los inmunoestimulantes a incluir, en función de las características de la respuesta inmune necesaria.

Abstract

ANALYSIS OF NOVEL VEHICLES AND ADJUVANTS FOR IMMUNIZATION WITH ANTIGENS FROM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* USING DIFFERENT ANIMAL MODELS

It is estimated that *Staphylococcus aureus* is responsible for 20-25% of nosocomial infections. In addition, bovine mastitis is a clear example of the effects of this pathogen in the veterinary field. *Staphylococcus aureus* was included in the global priority list of antibiotic-resistant bacteria published by the WHO, making the development of a vaccine against it, a prime concern. The appropriate combination of antigens and adjuvants becomes crucial to formulate an effective vaccine against *S. aureus*. One of the new generation adjuvants are liposomes, phospholipid vesicles able to promote the development of specific immune responses, by transporting the antigen together with immunostimulant molecules. Considering this background, we work on two main objectives. Firstly, the induced immune response was studied in calves, heifers and pregnant cows after immunization with a subunit vaccine, which included different recombinant *S. aureus* antigens, formulated with the liposomal adjuvants previously evaluated in mice by our group. Secondly, various liposomal formulations containing different immunostimulants were generated, in combination with the recombinant *S. aureus* surface antigen. Then, their ability to induce an efficient immune response in a murine experimental model was studied. Moreover, the liposomal formulations capacity as carrier and adjuvant in transdermal and intradermal vaccine administration was evaluated. The results presented in this thesis, demonstrate that cationic liposomes constitute a versatile adjuvant system, which allows the selection of the proper immunostimulants, depending on the needed immune response characteristics.